



Effets de la cyclosporine A sur des poumons porcins reperfusés ex vivo

Stéphane Gennai

► To cite this version:

Stéphane Gennai. Effets de la cyclosporine A sur des poumons porcins reperfusés ex vivo. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENS012 . tel-00949226

HAL Id: tel-00949226

<https://theses.hal.science/tel-00949226>

Submitted on 19 Feb 2014

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

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



THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE

Spécialité : **Modèles Méthodes et Algorithmes en Biologie**

Présentée par
Stéphane François GENNAI

Thèse dirigée par **Raphaël BRIOT**

Préparée au sein du **Laboratoire TIMC-IMAG, Equipe PRETA**

Dans l'Ecole Doctorale **Ingénierie pour la Santé, la Cognition
et l'Environnement**

EFFETS DE LA CYCLOSPORINE A SUR DES POUMONS PORCINS REPERFUSES *EX VIVO*

Thèse soutenue publiquement le **8 juillet 2013**
Devant le jury composé de :

Mr le Professeur François BOUCHER
Mr le Docteur Raphaël BRIOT
Mr le Professeur Marc FISCHLER
Mr le Professeur Michel OVIZE
Mr le Professeur Christophe PISON
Mr le Professeur Patrick PLAISANCE

Examineur
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

**A Florent et Isabella,
Pour m'avoir supporté toutes ces années**

**A Guillaume,
Pour son encouragement indéfectible**

« N'attends pas de mourir pour aller au paradis »

Giuseppe Di Candido

Remerciements

A Messieurs les membres du jury

Monsieur le Professeur François BOUCHER

Je te remercie vivement d'avoir accepté de juger ce travail. Je serai à l'avenir très heureux de poursuivre mon implication scientifique au sein de ton équipe.

Monsieur le Docteur Raphaël BRIOT

Lorsque que tu m'as proposé de me lancer dans un master à grands renforts de mathématiques et de sciences physiques, j'étais dubitatif, puis en affrontant la difficulté des enseignements abordés, je t'en ai même un peu voulu ! Après cette étape difficile, est venu le temps de l'expérimental et là, mon regard s'est transformé. Je n'aurai jamais imaginé passer du temps dans un abattoir à 4 heures du matin ! J'ai aussi aimé la pratique expérimentale dans toute sa diversité. Je te remercie vivement de m'avoir dirigé ces années de master et de thèse et espère que nos liens scientifiques et amicaux perdureront.

Monsieur le Professeur Marc FISCHLER

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites d'accepter de juger ce travail et pour ce faire, de venir de notre belle capitale.

Monsieur le Professeur Michel OVIZE

Vous comptez beaucoup dans le domaine de l'ischémie-reperfusion myocardique et en ce sens, votre présence m'honore. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Christophe PISON

Vous êtes le garant du cap de la transplantation pulmonaire grenobloise. Votre dynamisme et votre enthousiasme sont de réels atouts et un plaisir à chaque fois renouvelé lors de nos échanges. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Patrick PLAISANCE

La médecine d'urgence avance ! Sa force réside en son interdisciplinarité. Je vous remercie d'avoir accepté avec enthousiasme de juger ce travail qui vous semblera peut-être de prime abord éloigné du quotidien de l'urgentiste mais vous verrez qu'*in fine*, il s'y rapporte à bien des égards.

Remerciements

A mes fidèles collaborateurs

Madame Angélique BROUTA

Sans toi, ce travail n'aurait pas été possible. Merci mille fois pour ton dynamisme et ton professionnalisme. A bientôt j'espère dans de nouvelles aventures !

Monsieur Hervé CHAUSSARD

Mon chirurgien thoracique (porcin) préféré ! C'était un plaisir de travailler avec toi. Je te dois chaque prélèvement pulmonaire. Merci aussi pour ton dynamisme et ta gentillesse.

Madame Annie FOQUIN

Merci infiniment pour votre dynamisme et votre professionnalisme. Grâce à vous, la spectrophotométrie n'a plus aucun secret pour moi !

Madame Dorra GUERGOUR

Vous avez été une collaboratrice clef et toujours disponible. Je vous remercie pour votre implication dans ce travail.

Aux indispensables

Madame le Professeur Françoise CARPENTIER

Je vous remercie tout particulièrement pour la confiance que vous m'avez accordée durant ces années où j'ai dû apprendre à jongler entre une activité clinique à temps plein et mon activité recherche.

Monsieur le Docteur Cyril BERNARDET

Notre amitié m'aura permis de franchir des montagnes.

« Mes » secrétaires Annie, Catherine, Jacqueline, Rosa, Sandrine et Yasmina

Vous avez été mes confidentes et mon soutien dans la tourmente. Merci.

Tous mes collègues et amis des Urgences du CHU de Grenoble

Pour votre bonne humeur et le plaisir que j'ai toujours pris en travaillant à vos côtés.

Remerciements

A nos soutiens financiers

Un PHRC inter-régional

Vaincre La Mucoviscidose

Agence de la Biomédecine

Agir à dom

Au Centre de Recherche du Service de Santé des Armées de La Tronche

Pour nous avoir très gentiment accueillis dans leurs locaux.

Résumé

Objectif

De nombreux travaux ont souligné le rôle de la Cyclosporine A (CsA) dans la prévention des lésions d'ischémie-reperfusion (I/R) mais aucun n'a été effectué sur poumons isolés de grands mammifères. Notre objectif était de mesurer pour la première fois les effets de la CsA sur les lésions d'I/R dans un modèle de poumons porcins reperfusés *ex vivo*, en évaluant plusieurs doses de CsA pour différents temps d'ischémie.

Méthodes

L'expérimentation A a été conduite sur 4 groupes de 8 paires de poumons chacune : un groupe contrôle et 3 groupes recevant différentes concentrations de CsA (1, 10 ou 30 μ M) au moment de l'ischémie et au début de la reperfusion, après 2 heures d'ischémie. L'expérimentation B a été conduite sur 3 groupes de 5 paires de poumons chacune. Les poumons de chaque paire étaient séparés juste après le début de l'ischémie. Les premiers poumons étaient évalués après une ischémie de 2 heures (jour 0), sans CsA. Les seconds poumons étaient évalués après une ischémie de 24 heures (jour 1), soit sans soit avec CsA (1 ou 5 μ M), administrée le cas échéant au début de la reperfusion.

Résultats

La CsA augmentait le rapport PO_2/FiO_2 avec un effet dose mais augmentait également la pression artérielle pulmonaire, la pression capillaire et les résistances vasculaires pulmonaires, à 10 et 30 μ M mais pas à 1 ni 5 μ M. Les poumons qui recevaient 30 μ M de CsA affichaient des concentrations élevées en cytokines pro-inflammatoires. La concentration en RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) dans le lavage broncho-alvéolaire diminuait avec la CsA à J1 en comparaison à J0.

Conclusions

Lors de l'I/R pulmonaire, les bénéfices cellulaires des doses élevées de CsA sont contrebalancés par ses effets hémodynamiques sur la microvascularisation. A faibles doses, la CsA semble améliorer la fonction pulmonaire.

Mots clefs

Cyclosporine A, fonction pulmonaire, lésions d'ischémie / reperfusion, transplantation.

Abstract

Objective

Several works highlighted the role of Cyclosporine A (CsA) in the prevention of ischemia reperfusion (I/R) injuries but none on isolated lungs of big mammals. Our objective was to measure for the first time the effects of CsA in I/R injuries in an *ex vivo* reperfused pig lungs model, by evaluating several doses of CsA for different times of ischemia.

Methods

Experimentation A was performed on 4 groups of 8 pairs of lungs each: a control group and 3 groups receiving different concentrations of CsA (1, 10 or 30 μ M) at the time of ischemia and at the beginning of the reperfusion, after a 2 hours ischemia. Experimentation B was performed on 3 groups of 5 pairs of lungs each. Lungs from each pair were separated just after the beginning of ischemia. The first lungs were evaluated after a 2 hours ischemia (day 0), without CsA. The second lungs were evaluated after a 24 hours ischemia (day 1), either without or with CsA (1 or 5 μ M), administered when appropriate at the beginning of the reperfusion.

Results

CsA improved the PO_2/FiO_2 ratio with a dose dependent effect but increased pulmonary arterial pressure, capillary pressure, and pulmonary vascular resistances, at 10 and 30 μ M but neither at 1 or 5 μ M. Lungs receiving 30 μ M of CsA displayed elevated concentrations in pro-inflammatory cytokines. Concentrations in RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) in broncho-alveolar lavage decreased with CsA at day 1 compared to day 0.

Conclusions

During pulmonary I/R, the cellular benefits of high doses of CsA are counterbalanced by its hemodynamic effects on microvascularisation. At low doses, CsA seems to improve lung function.

Key words

Cyclosporine A, ischemia / reperfusion injuries, pulmonary function, transplantation.

Sommaire

I- INTRODUCTION.....	p14
I.1 Contexte.....	p15
I.2 Ex Vivo Lung Perfusion.....	p17
I.2.1 Principes généraux de la procédure d'EVLP	p17
I.2.2 Physiopathologie de la procédure d'EVLP	p19
I.2.2.1 Paramètres vasculaires.....	p19
I.2.2.2 Paramètres ventilatoires.....	p21
I.2.2.3 Composition du perfusat.....	p22
I.2.2.4 Métabolisme pulmonaire durant la perfusion.....	p23
I.2.3 Evaluation des poumons.....	p24
I.2.4 La procédure d'EVLP en pratique clinique.....	P25
I.2.5 Perspectives expérimentales.....	p27
I.3 Ischémie-Reperfusion.....	p28
I.3.1 Définition.....	P28
I.3.2 Conséquences physiopathologiques.....	p29
I.3.2.1 Augmentation du stress oxydatif.....	p29
I.3.2.2 Inactivation de la pompe à sodium.....	p30
I.3.2.3 Surcharge en calcium intracellulaire.....	P30
I.3.2.4 Mort cellulaire et pore de transition de perméabilité mitochondriale.....	p31
I.3.2.5 Libération de médiateurs pro-inflammatoires.....	p32
I.3.3 Prévention de la dysfonction pulmonaire.....	p34
I.3.3.1 Solution de préservation et technique d'administration.....	p34
I.3.3.2 Inflation, oxygénation et température de préservation.....	p34
I.3.3.3 Techniques de reperfusion et de ventilation.....	p35
I.3.3.4 Thérapies impliquant des médiateurs de l'inflammation....	p35
I.3.3.5 Surfactant.....	p35
I.3.3.6 Monoxyde d'azote.....	p36
I.3.3.7 Monoxyde de carbone.....	p36
I.3.3.8 Préconditionnement et postconditionnement	p37

I.4 Cyclosporine A.....	p38
I.4.1 Origine, structure et pharmacologie.....	p38
I.4.2 Mécanismes d'action.....	p39
I.4.2.1 Voie cyclophiline A / calcineurine : effets immunologiques et vasoactifs.....	p39
I.4.2.2 Voie cyclophiline D / PTPm : effet anti-apoptotique.....	p39
 II- MATERIELS ET METHODES.....	p42
II.A Expérimentation A (détermination de doses).....	p43
II.A.1 Préparation animale.....	p43
II.A.2 Préparation pulmonaire <i>ex vivo</i>	p44
II.A.3 Phase de réchauffement.....	p44
II.A.4 Phase d'évaluation.....	p45
II.A.4.1 Paramètres hémodynamiques.....	p45
II.A.4.2 Fonction épithéliale pulmonaire.....	p45
II.A.4.3 Perméabilité capillaro-alvéolaire.....	p46
II.A.4.4 Inflammation pulmonaire.....	p46
II.A.5 Protocole expérimental.....	p46
II.A.6 Analyse statistique.....	p48
II.B Expérimentation B (doses ciblées & ischémie prolongée).....	p49
II.B.1 Préparation animal.....	p49
II.B.2 Préparation pulmonaire <i>ex vivo</i>	p49
II.B.3 Phase de réchauffement.....	p49
II.B.4 Phase d'évaluation.....	p50
II.B.4.1 Paramètres hémodynamiques.....	p50
II.B.4.2 Fonction épithéliale pulmonaire.....	p50
II.B.4.3 Perméabilité capillaro-alvéolaire.....	p50
II.B.4.4 Inflammation pulmonaire.....	p50
II.B.5 Protocole expérimental.....	p50
II.B.6 Analyse statistique.....	p50

III- RESULTATS.....	p52
III.A Expérimentation A (détermination de doses).....	p53
III.A.1 Echanges gazeux.....	p53
III.A.2 Hémodynamique.....	p53
III.A.3 Fonction épithéliale alvéolaire.....	p53
III.A.4 Perméabilité capillaro-alvéolaire.....	p53
III.A.5 Inflammation pulmonaire.....	p53
III.B Expérimentation B (doses ciblées & ischémie prolongée).....	p58
III.B.1 Sévérité de l'ischémie à J1.....	p58
III.B.2 Effets pharmacologiques.....	p58
IV- DISCUSSION.....	p64
IV.1 Design expérimental.....	p65
IV.2 Limites.....	p66
IV.3 Choix de la molécule et des posologies.....	p66
IV.4 Effets de la CsA sur l'hémodynamique.....	p67
IV.5 Effets de la CsA sur les échanges gazeux.....	p68
IV.6 Effets de la CsA sur la fonction épithéliale pulmonaire et la perméabilité capillaro-alvéolaire.....	p68
IV.7 Effets de la CsA sur l'inflammation pulmonaire.....	p69
V- CONCLUSION.....	p70
VI- LISTE DES FIGURES.....	p72
VII- LISTE DES TABLEAUX.....	p75
VIII- BIBLIOGRAPHIE.....	p77

Abréviations

AFC : alveolar fluid clearance (clairance liquidienne alvéolaire)

ADP : adénosine diphosphate

ANT : adénine nucléotide translocase

ATP : adénosine triphosphate

CEC : circulation extracorporelle

CO : monoxyde de carbone

CO₂ : dioxyde de carbone

COX : cyclo-oxygénase

CsA : cyclosporine A

Cyp : cyclophiline

E_TCO₂ : end tidal carbon dioxid pressure (pression partielle en dioxyde de carbone expiré)

EVLP : *ex vivo* lung perfusion (perfusion pulmonaire *ex vivo*)

f : fréquence respiratoire

FiO₂ : fraction inspirée en oxygène

FITC-D70 : fluorescein isothiocyanate labeled dextran

GMPC : 3'-5'- guanosine monophosphate cyclique

H₂O : eau

I/R : ischémie-reperfusion

IGF : insulin-like growth factor

IL : interleukine

ISHLT : International Society for Heart and Lung Transplantation

IV : intraveineux

K : coefficient de transport du FITC-D70 du liquide de perfusion vers l'alvéole

LBA : lavage broncho-alvéolaire

MAP : mitogen-activated protein

N₂ : azote

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF : nuclear factor (facteur nucléaire)

NFAT : nuclear factor of activated T-cells (facteur nucléaire des lymphocytes T activés)

NIM-811 : N-Methyl-4-isoleucine cyclosporin

NO : monoxyde d'azote

NOS : nitric oxid synthase (oxyde nitrique ou monoxyde d'azote synthase)

O₂ : oxygène

P : perfusat

PCO₂ : pression partielle en dioxyde de carbone

PO₂ : pression partielle en oxygène

PAP : pression artérielle pulmonaire

Pcap : pression capillaire

PEEP : positive end-expiratory pressure (pression expiratoire positive)

PG : prostaglandine

PTPm : pore de transition de perméabilité mitochondriale

RAGE : receptor for advanced glycation endproducts

RVP : resistances vasculaires pulmonaires

RVPa : RVP artériolaires

RVPv : RVP veinulaires

TLR : toll-like receptor (récepteur de type toll)

TNF : tumor necrosis factor

VILI : ventilator induced lung injury

V_T : volume courant

ZVAD-fmk : Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F

INTRODUCTION

I- Introduction

L'utilisation de la procédure de perfusion pulmonaire *ex vivo* (*Ex Vivo Lung Perfusion*, EVLP) est en pleine expansion à travers le monde. Elle augmente le nombre d'organes disponibles pour la transplantation en même temps qu'elle autorise l'évaluation de thérapeutiques dont l'objectif est de limiter les lésions d'ischémie-reperfusion (I/R), premières responsables de la défaillance primaire du greffon. Ce travail rapporte deux expérimentations réalisées sur un modèle de poumons porcins perfusés *ex vivo*, qui évaluent l'effet de différentes concentrations de Cyclosporine A (CsA) sur les lésions d'I/R.

I.1 Contexte

Depuis 1982, la transplantation pulmonaire a rencontré un succès croissant. Elle constitue la thérapie de dernier recours d'un grand nombre de pathologies pulmonaires au stade ultime de leur évolution. Les dernières décennies ont été marquées à la fois par l'augmentation significative des centres pratiquant la transplantation pulmonaire et le nombre croissant de patients sur liste d'attente de greffe^[83]. Le registre de la International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) rapportait en 2011 que près de 45000 transplantations pulmonaires et cardio-pulmonaires avaient été effectuées à travers le monde^[83]. En France, le nombre de patients enregistrés sur liste d'attente de transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire, est passé de 166 en 2007 à 185 en 2011. Dans le même temps, le nombre de patients décédés en attente d'une greffe pulmonaire ou cardio-pulmonaire diminuait (54 en 2007, 20 en 2011) grâce à l'augmentation de l'activité de greffe sur le territoire (223 en 2007, 324 en 2011)^[1].

Contrairement à d'autres organes comme les reins ou le foie, les poumons ne sont prélevés que parmi environ 20% des donneurs en état de mort encéphalique^[171]. Ce faible pourcentage est lié aux critères très stricts d'acceptabilité des greffons pulmonaires pour une éventuelle transplantation. Cette sélection sévère s'explique par la mortalité importante de la transplantation pulmonaire (taux de survie à 5 ans à peine supérieur à 50 %), même si elle a diminué de moitié au cours de ces vingt dernières années^[145]. Cela a incité les pneumologues à proposer plus précocement une greffe aux patients, augmentant ainsi le nombre de greffes pulmonaires et cardio-pulmonaires récemment réalisées en France, sans pour autant pallier à la demande de greffons.

La pénurie de greffons a poussé les équipes de transplantation à reconsidérer les critères d'acceptabilité des greffons, estimés trop stricts ^[116]. Dans la perspective d'une requalification objective des poumons marginaux, c'est-à-dire non acceptés a priori, le chirurgien thoracique suédois Stig Steen a inventé la technique d'EVLP ^[156]. Cette technique permet à la fois d'évaluer et de reconditionner les poumons en dehors de l'organisme. Elle a déjà été utilisée avec succès notamment par les équipes du Professeur Stig Steen à Lund en Suède et du Professeur Shaf Keshavjee à Toronto au Canada, permettant des greffes de poumons marginaux « limites » avec des résultats comparables à ceux de greffes classiques ^[35,109]. Depuis, ont été commercialisés des dispositifs semi-automatisés qui facilitent la procédure d'EVLP.

Il existe par ailleurs un axe fondamental de recherche expérimentale dont l'objectif est d'évaluer des thérapeutiques visant à réduire les lésions d'I/R responsables de la défaillance primaire du greffon, principale étiologie de mortalité précoce post-greffe ^[141]. La CsA pourrait être une molécule de choix dans cette indication. En effet, le rôle de la CsA dans la prévention des lésions d'I/R a été mis en lumière ces dernières années sur différents organes, exceptés sur les poumons de gros mammifères ^[45,64,67,102,125,142,164,176].

En résumé, le nombre de patients en attente de transplantation pulmonaire augmente et la défaillance primaire du greffon reste la principale étiologie de mortalité post-greffe. La procédure d'EVLP permet à la fois d'augmenter le nombre de poumons disponibles en requalifiant des poumons initialement récusés pour la transplantation, et d'évaluer des thérapeutiques supposées limiter les lésions d'I/R à l'origine de la défaillance primaire du greffon.

I.2 *Ex Vivo* Lung Perfusion

I.2.1 Principes généraux de la procédure d'EVLP

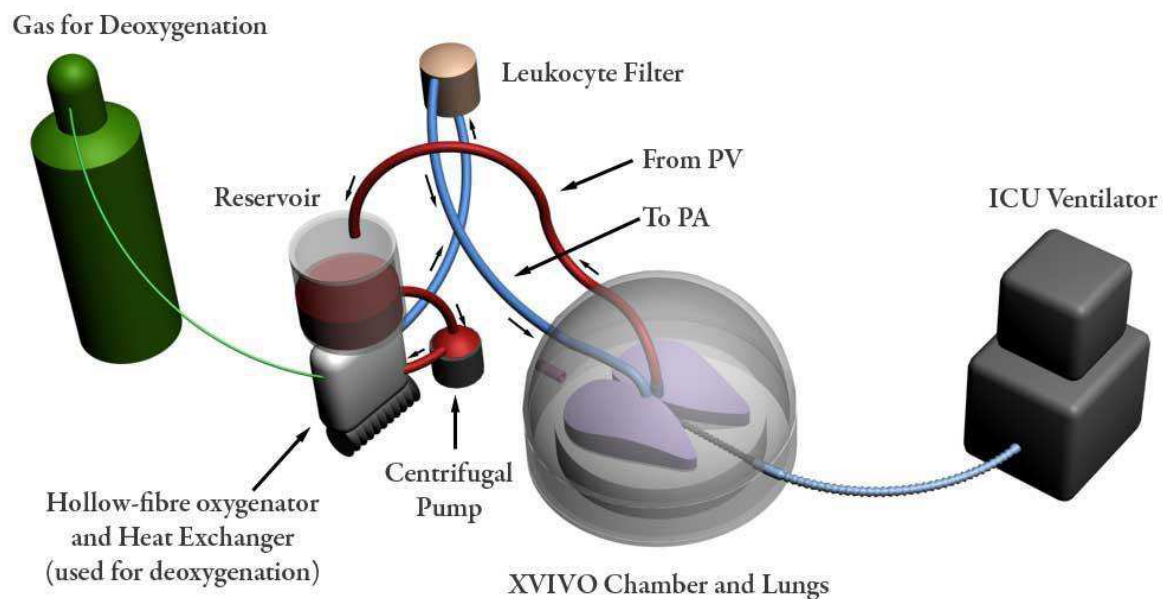
L'EVLP consiste à ventiler et perfuser des poumons en dehors de l'organisme dans une enceinte fermée, en contrôlant le débit, la température de perfusion, les paramètres de ventilation, la température et l'hygrométrie de l'enceinte, et l'asepsie des poumons. Le circuit d'EVLP se compose essentiellement, outre d'une enceinte dans laquelle sont déposés les poumons, d'une pompe centrifuge de circulation extracorporelle (CEC), d'un oxygénateur membranaire, d'un filtre anti-leucocytes, d'un échangeur thermique et d'un respirateur de réanimation connecté à la trachée *via* une sonde d'intubation. La solution de perfusion (ou perfusat) entre dans le poumon *via* une canule connectée à l'artère pulmonaire. Le retour veineux est généralement passif, des veines pulmonaires jusque dans un réservoir contenu ou non dans l'enceinte. Le perfusat est ensuite aspiré par la pompe de CEC et circule à travers l'oxygénateur membranaire avant de rejoindre l'artère pulmonaire (Figure 1).

Les poumons prélevés après refroidissement dans une optique de transplantation, sont conservés et acheminés à basse température jusqu'à l'enceinte d'EVLP. Après constitution du circuit d'EVLP, les poumons sont progressivement perfusés, réchauffés et ventilés sur une période de 30 à 60 minutes. La perfusion pulmonaire est initiée à un faible débit correspondant à environ 5% du débit cardiaque théorique, estimé à 70 mL/kg/min. Le débit de CEC est ensuite progressivement augmenté jusqu'à un maximum souhaité, en même temps que le réchauffement est débuté jusqu'à un seuil (32°C) au-delà duquel la ventilation est d'abord initiée à un volume correspondant à environ 30% de la ventilation théorique, estimée à 7 mL/kg/min, avant d'atteindre progressivement cette valeur. Durant la phase d'augmentation du débit de CEC, la pression artérielle pulmonaire (PAP) n'est généralement pas autorisée à dépasser 20 mmHg, quitte à abaisser l'objectif de débit de CEC. Ce bridage a pour objectif de limiter les lésions d'I/R qui altèrent l'intégrité de la membrane alvéolo-capillaire, augmentent sa perméabilité et favorisent *de facto* la constitution d'un œdème pulmonaire. L'apport d'oxygène (O₂) aux poumons *via* l'oxygénateur membranaire est additionné à un mélange contenant 93% d'azote (N₂) et 7% de dioxyde de carbone (CO₂) qui vise à mimer une production physiologique. Cela permet d'obtenir un perfusat avec une pression partielle en CO₂ (PCO₂) et un pH proches de ceux mesurés *in vivo* dans le sang artériel pulmonaire. Les paramètres du respirateur sont réglés de façon à éviter un barotraumatisme : volume courant (V_T) réduit = 7 mL/kg/min, fréquence respiratoire (f) basse ≤ 12/min, pression expiratoire positive (positive end-expiratory pressure, PEEP) faible

= 5 cmH₂O. Un état optimal de perfusion, de température et de ventilation est ainsi obtenu et maintenu durant environ 45 minutes (état stable). Au début de l'état stable, l'oxygénation étant pleinement assurée par la ventilation mécanique, l'apport d'O₂ via l'oxygénateur membranaire est coupé et l'apport du mélange N₂ + CO₂ maintenu. A la fin de l'état stable, la phase d'évaluation des poumons est initiée. La décision de réimplanter ou non les poumons à l'issue de la procédure d'EVLP est alors prise en fonction des critères suivants : bonnes capacités d'échanges gazeux, faible niveau de résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et œdème pulmonaire limité. Les poumons requalifiés pour la transplantation par la procédure d'EVLP sont ensuite refroidis puis conservés à basse température jusqu'à la greffe. La ventilation et la perfusion sont stoppées.

La procédure d'EVLP consiste à prélever et isoler les poumons pour ensuite progressivement les perfuser et ventiler, de façon à atteindre un état stable à l'issue duquel les poumons sont évalués principalement sur des critères gazométriques et hémodynamiques.

Figure 1 : Schéma du circuit d'EVLP (d'après Cypel et al ; 2011 ; NEJM) ^[35]



I.2.2 Physiopathologie de la procédure d'EVLP

Le principal risque de la procédure d'EVLP est la formation d'un œdème pulmonaire. En effet, l'ischémie-reperfusion fragilise la membrane alvéolo-capillaire, augmentant ainsi sa perméabilité. Le risque de formation d'un œdème pulmonaire dépendra des paramètres vasculaires, ventilatoires et de la composition du perfusat. Les déterminants de la formation de cet œdème sont dictés par loi de Starling :

$$\text{Débit net de filtration liquidienne } Q = K[(P_c - P_i) - \sigma(\Pi_c - \Pi_i)]$$

où K et σ sont les coefficients de perméabilité de l'eau et des protéines, respectivement, P_c et P_i les pressions hydrostatiques au niveau capillaire et interstitiel, Π_c et Π_i les pressions oncotiques au niveau capillaire et interstitiel.

I.2.2.1 Paramètres vasculaires

Il est communément retrouvé dans littérature qu'assurer un débit de CEC inférieur au débit théorique, dans le cadre d'une procédure d'EVLP, permet de limiter l'œdème pulmonaire secondaire à l'ischémie-reperfusion ^[34,54,151]. Limiter le débit cardiaque revient *de facto* à limiter la pression hydrostatique capillaire, l'un des principaux déterminants de l'équation de Starling. Dans un vaisseau lésé où la perméabilité est donc augmentée, une petite augmentation de pression hydrostatique capillaire sera responsable d'une importante fuite liquidienne du secteur vasculaire vers le secteur interstitiel puis vers l'alvéole pulmonaire. Récemment, Cypel et al ont montré que des périodes de perfusion de 12 heures avec un débit de CEC à 40% de la théorique, étaient grevées d'une formation limitée d'œdème pulmonaire ^[34].

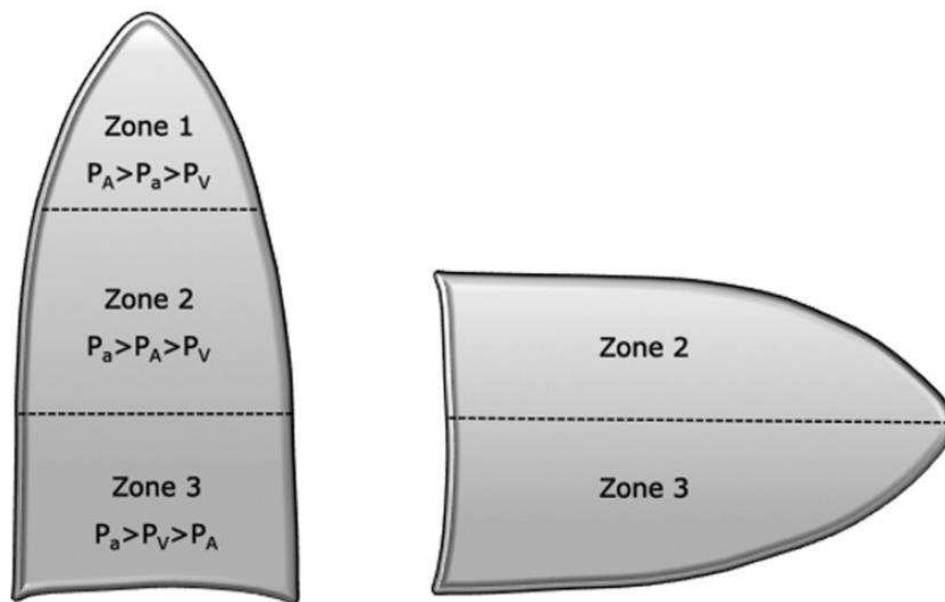
La gravité a aussi un effet non négligeable sur les pressions hydrostatiques. La plupart des systèmes d'évaluation ex vivo fonctionnent avec la face dorsale des poumons orientée vers le bas. De cette façon, les conditions de type zone 2 de West sont favorisées dans la partie ventrale haute des poumons et les conditions de type zone 3 de West sont favorisées dans la partie dorsale basse. En conséquence, les régions basses sont soumises à des pressions hydrostatiques microvasculaires plus élevées, donc à une filtration liquidienne accrue à travers la paroi alvéolo-capillaire (Figure 2).

Dans la procédure d'EVLP que nous utilisons, le sang veineux pulmonaire coule passivement dans le réservoir de CEC. D'autres équipes utilisent plutôt une canule en forme d'entonnoir qu'elles suturent au niveau de la collerette auriculaire. La pression auriculaire peut être ainsi ajustée par surélévation de la canule. Une pression auriculaire gauche proche de 5 mmHg est généralement maintenue afin d'éviter les hautes pressions qui favoriseraient l'œdème

hydrostatique et les basses pressions qui entraîneraient un collapsus microvasculaire et risqueraient d'augmenter les résistances vasculaires pulmonaires (Figure 3).

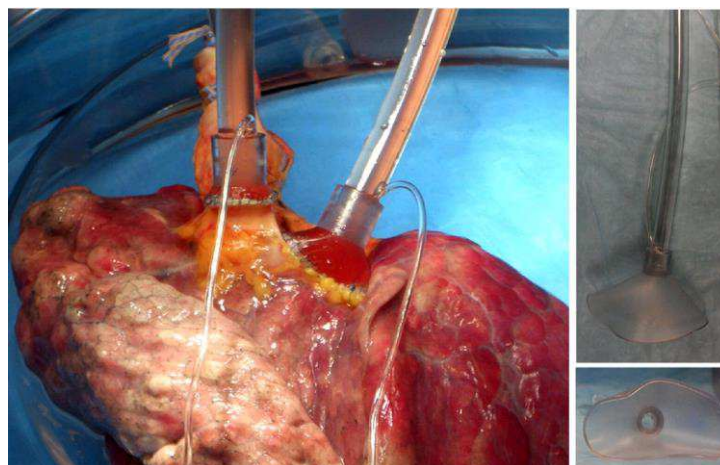
Un débit de CEC inférieur à la valeur théorique est généralement recommandé dans la procédure d'EVLP afin de limiter l'œdème pulmonaire, notamment en situation d'ischémie prolongée.

Figure 2 : Schéma des zones pulmonaires de West. Impact de la gravité sur la distribution des flux (d'après Sanchez et al ; 2012 ; J Heart Lung Transplant) ^[148]



P_A = Pression alvéolaire ; P_a = Pression artérielle pulmonaire ; P_V = Pression de l'oreillette gauche.

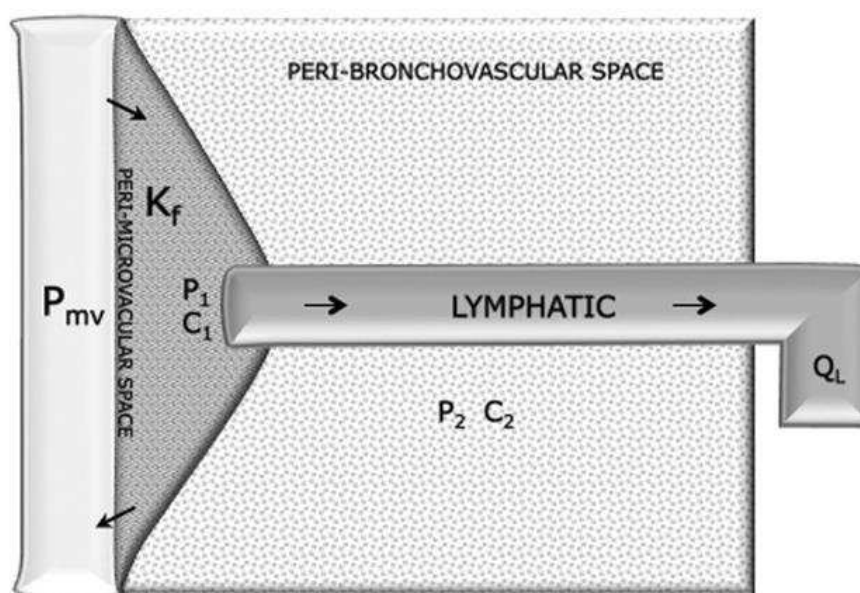
Figure 3 : Canule en forme d'entonnoir visant à recueillir le sang veineux pulmonaire issu de l'oreillette gauche



I.2.2.2 Paramètres ventilatoires

Les variations des pressions transpulmonaires influencent l'environnement microvasculaire, ce qui explique l'importance du choix de la stratégie de ventilation ^[63]. Des pressions alvéolaires élevées peuvent conduire à des lésions capillaires et à une augmentation du coefficient de filtration alvéolo-capillaire ^[58,136]. Inversement, des pressions alvéolaires basses semblent favoriser la clairance liquidienne péri-alvéolaire, facilitant les mouvements de liquides lymphatiques depuis les espaces péri-microvasculaires vers les vaisseaux lymphatiques plus larges (Figure 4) ^[137].

Figure 4 : Schéma du modèle bicompartimental de l'espace interstitiel pulmonaire (d'après Sanchez et al ; 2012 ; J Heart Lung Transplant) ^[148]



P_{mv} = Pression microvasculaire pulmonaire ; K_f = coefficient de filtration ; P_1 et C_1 = Pression et compliance interstitielles dans l'espace péri-microvasculaire ; P_2 et C_2 = Pression et compliance interstitielles dans l'espace péri-bronchovasculaire ; Q_L = débit lymphatique.

La procédure d'EVLP doit tenir compte de ces impératifs de ventilation. De faibles volumes de ventilation ($V_T = 6$ à 8 mL/kg) associés à une faible PEEP (5 cmH₂O) ont ainsi été suggérés pour garantir la protection des poumons perfusés *ex vivo* sur de longues périodes de temps, de faibles volumes courants étant associés à de faibles pressions au niveau des voies aériennes ^[34]. Par ailleurs, le phénomène d'I/R est responsable de la coexistence de zones normalement ventilées, de zones collabées recrutables et de zones œdématisées non recrutables (le plus souvent situées au niveau de la zone 3 de West). L'augmentation des volumes courants ou des pressions du respirateur risque de distendre de façon inappropriée

les zones normalement ventilées et d'y induire des barotraumatismes. Des lésions de cisaillement de la barrière alvéolo-capillaire à l'origine d'une fuite liquidienne du secteur vasculaire vers le secteur alvéolaire peuvent également survenir lors de cycles répétés d'ouverture et de fermeture des alvéoles : les VILI (ventilatory induced lung injury).

Enfin, il a été montré qu'un léger gonflement des poumons par clampage de la trachée au moment du prélèvement et du transport permettait de réduire des lésions d'I/R ^[147]. Cette pratique est habituellement utilisée dans les procédures d'EVLP.

Dans une procédure d'EVLP, il est généralement recommandé d'assurer de faibles volumes courants avec une faible PEEP et de gonfler légèrement les poumons en clampant la trachée lors du prélèvement et du transport.

I.2.2.3 Composition du perfusat

La composition du soluté de perfusion est essentielle pour la stabilité de la préparation d'EVLP. Le perfusat idéal doit avoir une pression oncotique et une composition électrolytique proches du milieu extracellulaire, tout en garantissant un apport énergétique suffisant ^[92,129]. L'intérêt de favoriser les capacités de transport en oxygène du perfusat n'a pas été démontré.

Plusieurs études ont mis en évidence que l'ajout d'albumine (50 à 70 g/L ; pouvoir oncotique élevé) dans le perfusat, à pression hydrostatique identique, protégeait la préparation d'EVLP de la formation d'œdème alvéolaire ^[26,37]. Mais l'intérêt de l'albumine va au-delà du seul effet oncotique, avec le transport de nutriments vers les cellules et l'évacuation de toxines durant la perfusion ^[16]. Les principales équipes qui pratiquent la procédure d'EVLP, utilisent actuellement un soluté hydro-électrolytique de type Krebs additionné de Dextran 40 (5 g/L) et d'albumine humaine : la solution de Steen (VitrolifeTM), mise au point par l'inventeur de la technique d'EVLP, le Professeur Stig Steen.

En revanche, il n'existe pas de consensus concernant l'utilisation de sang dans la préparation d'EVLP ^[70,101,139]. En effet, même si l'apport de sang a pour objectif d'améliorer le transport en oxygène, il pourrait simultanément aggraver les lésions pulmonaires ^[139] et l'utilisation de sang exempt de leucocytes n'a pas démontré son intérêt ^[138]. En pratique, l'équipe suédoise du Professeur Steen utilise des culots globulaires associés à la solution de Steen avec un objectif d'hématocrite à 15% dans le perfusat, alors que l'équipe canadienne du Professeur Keshavjee utilise un perfusat acellulaire (solution de Steen seule), ayant fait la démonstration de l'absence de différence en terme de capacité d'échanges gazeux, dans une préparation d'EVLP sur poumons humains avec ou sans culot globulaire ^[34].

Par ailleurs, il a été récemment démontré que des poumons sains pouvaient développer des lésions lorsqu'ils sont perfusés avec un milieu qui a préalablement servi à des poumons présentant des VILI ^[85]. Bien que cette dysfonction ait été attribuée aux médiateurs inflammatoires circulants, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les concentrations en Tumor Necrosis Factor (TNF)- α et Interleukin (IL)-6 et le degré de la dysfonction. Dans une autre étude utilisant la procédure d'EVLP, l'utilisation d'absorbants de médiateurs inflammatoires tels que IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α , n'a montré aucun bénéfice sur la survenue de lésions pulmonaires ^[87].

Le perfusé de la procédure d'EVLP doit garantir un apport énergétique suffisant et avoir une pression oncotique proche ou légèrement supérieure à celle du milieu extracellulaire. L'apport de sang n'est pas requis.

I.2.2.4 Métabolisme pulmonaire durant la perfusion

La description dans la littérature du comportement métabolique des poumons *ex vivo* sains ou lésés est surtout ancienne mais toujours d'actualité ^[44,53,54,55,92,111,112,143,179]. Un premier élément remarquable est la grande quantité de lactate que produisent les poumons alors que la pression partielle en oxygène y est l'une des plus importantes de l'organisme ^[92]. En effet, 40 à 60% du glucose utilisé par les poumons termine en lactate. L'effet Pasteur (augmentation du métabolisme des hydrates de carbone en situation hypoxique) est principalement à l'origine de ce phénomène, ce à quoi s'associe la grande quantité de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) déshydrogénase présente au niveau pulmonaire, catalyseur de la transformation du pyruvate en lactate. La présence de lactate dans une préparation d'EVLP n'a pas la signification péjorative qu'elle pourrait avoir en pratique clinique chez un individu et n'a pas non plus d'influence sur le devenir des patients transplantés après procédure d'EVLP ^[53,98].

Le glucose est un élément déterminant du métabolisme pulmonaire et son taux de décroissance pourrait constituer un marqueur de la qualité des poumons lors de procédures d'EVLP. Sa consommation est toutefois modulée par de nombreux facteurs tels la concentration en lactates ^[111], la présence ou non de lésions de la barrière alvéolo-capillaire ^[112], la présence ou non d'œdème ^[143]. Cela rend son utilisation comme « marqueur qualité » difficile. L'insuline ne joue pas un rôle essentiel pour le transport du glucose au niveau des cellules alvéolaires de type I et II qui s'effectue plutôt par diffusion. Certains auteurs ont récemment suggéré que l'insuline était inutile dans une préparation d'EVLP ^[33,148].

Enfin, la procédure d'EVLP a montré sa supériorité en termes de préservation de la qualité des poumons, comparée à l'ischémie froide prolongée sans perfusion classiquement réalisée en transplantation pulmonaire, car elle limite les lésions imputables à l'ischémie froide prolongée et rétablit un métabolisme cellulaire physiologique ^[33,128].

Le métabolisme pulmonaire dépend essentiellement de la diffusion du glucose au niveau des cellules épithéliales alvéolaires. Il est responsable d'une importante production de lactates, notamment en situation d'hypoxie. L'EVLP semble par ailleurs mieux préserver les poumons que l'ischémie froide prolongée.

I.2.3 Evaluation des poumons

Chaque paramètre physiologique acquis de façon discrète ou continue peut être utilisé pour évaluer la viabilité pulmonaire. Il s'agit notamment des PAP, des pressions capillaires (Pcap), des débits de perfusion, des RVP, des gaz contenus dans le perfusé, du rapport entre la pression partielle en oxygène (PO_2) du perfusé et la fraction inspirée en oxygène (FiO_2), du CO_2 expiré (E_TCO_2) et du gradient entre la PCO_2 et l' E_TCO_2 . Pour chaque paramètre, il n'existe pas de seuil clairement défini permettant de discriminer entre poumons transplantables ou non. Néanmoins, les paramètres gazométriques mesurés *ex vivo* semblent être particulièrement prédictifs des échanges gazeux après transplantation ^[4]. Aussi, les équipes canadienne et suédoise ne s'autorisent à transplanter des greffons que si leur rapport PO_2/FiO_2 est supérieur à 350 ou 400 mmHg, respectivement ^[35,82]. Les propriétés mécaniques des voies aériennes peuvent être également évaluées à l'issue de la phase stable de la procédure d'EVLP. Le pic de pression inspiratoire requis pour que le greffon soit jugé transplantable doit être < 20 cmH₂O et la compliance dynamique (V_T /pression crête) > 60 mL/cmH₂O.

L'aspect macroscopique des poumons constitue également un critère d'évaluation. Ceux-ci ne doivent comporter aucune ni atélectasie ni œdème importants. Un test de déflation pulmonaire par déconnexion du circuit respiratoire est parfois réalisé par certaines équipes ^[109]. Les poumons qui « s'affaissent » complètement et de façon homogène sont jugés de bonne qualité. D'autres équipes pratiquent des radiographies ou des fibroscopies bronchiques à différents temps de la procédure d'EVLP ^[35].

Le dosage de paramètres métaboliques tels que la myélopéroxydase, le glycogène ou l'adénosine triphosphate (ATP), est parfois utilisé pour déterminer la viabilité pulmonaire mais son intérêt en pratique clinique n'est pas démontré ^[146,149,174]. La recherche de marqueurs spécifiques de la lésion pulmonaire, fait actuellement l'objet de travaux de

recherche expérimentale. Dans ce cadre, le RAGE (receptor for advanced glycation end products) apparaît comme un marqueur relativement spécifique de la lésion épithéliale pulmonaire ; sa concentration dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est corrélée aux capacités de réabsorption liquidienne du poumon ^[19,56].

L'évaluation des poumons lors de la procédure d'EVLP est principalement effectuée à partir de paramètres gazométriques, hémodynamiques et macroscopiques. La mesure du biomarqueur RAGE, spécifique de la lésion épithéliale pulmonaire, semble particulièrement intéressante dans cette indication.

I.2.4 La procédure d'EVLP en pratique clinique

L'équipe suédoise du Professeur Stig Steen a montré que la procédure d'EVLP permettait d'évaluer en dehors de l'organisme des poumons humains prélevés sur donneur à cœur arrêté, cas particulier où l'évaluation de l'organe ne peut être effectuée avant son prélèvement en vue d'une transplantation ^[156]. La même équipe et d'autres ont montré que la procédure d'EVLP permettait de requalifier des poumons initialement récusés pour la transplantation (parce qu'ils ne comportaient pas tous les critères d'acceptabilité), avec des résultats satisfaisants ^[43,174]. Plusieurs petites séries de patients bénéficiant d'un greffon évalué et reconditionné par la procédure d'EVLP ont été publiées (8 à 13 poumons évalués et 4 à 6 patients greffés par étude) ^[3,82,119,183]. L'équipe canadienne du Professeur Shaf Keshavjee a publié une étude monocentrique avec l'une des plus importantes séries de patients greffés par des poumons initialement récusés puis requalifiés pour la transplantation, en utilisant la procédure d'EVLP (50 poumons requalifiés sur 58 évalués) ^[36]. Le taux de dysfonction primaire du greffon à 72 heures et les taux de mortalité à 30 jours et 1 an étaient comparables voire légèrement meilleurs que ceux obtenus par une série de 267 greffes pulmonaires classiques réalisées sur la même période (Figure 5).

Les axes de recherche clinique actuels visent à augmenter le nombre de greffons à la fois par l'évaluation *ex vivo* de poumons initialement récusés pour la transplantation et l'utilisation de greffons issus de donneurs à cœur arrêté (procédure actuellement non autorisée en France pour les poumons). Des systèmes semi-automatisés ont été commercialisés à cet effet : le système O.C.S. Transmedics® qui permet l'évaluation des poumons immédiatement après le prélèvement (sans période d'ischémie froide) et le système Vivoline® basé sur le principe de Steen (évaluation après ischémie froide) (Figure 6).

La procédure d'EVLP a démontré son intérêt et son innocuité en pratique clinique. Elle permet de requalifier des poumons initialement récusés pour la transplantation.

Figure 5 : Préparation d'EVLP en vue d'une transplantation chez l'homme (d'après Cypel et al ; 2011 ; NEJM) ^[35]

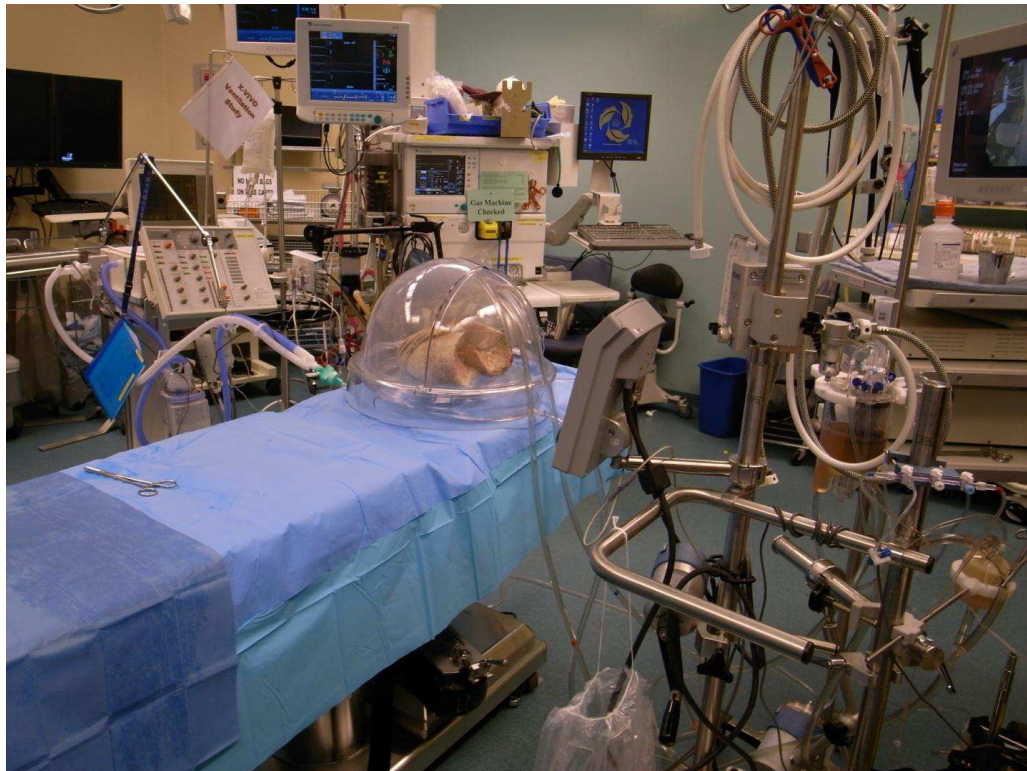


Figure 6 : Systèmes d'EVLP actuellement commercialisés



Système O.C.S. Transmedics®



Système Vivoline®

I.2.5 Perspectives expérimentales

L'augmentation du nombre de greffons est également liée au développement de thérapeutiques qui visent à réduire les lésions d'I/R. La procédure d'EVLP apparait dans ce cadre l'outil expérimental idéal. Ce travail de thèse s'inscrit dans cette perspective. Sur un modèle animal porcin utilisant la procédure d'EVLP, Inci et al ont montré que l'adjonction de N-acétylcystéine ou d'urokinase, semblait améliorer la fonction pulmonaire ^[80,81]. Ils ont aussi montré que la réalisation d'un LBA avec du surfactant, diminuait les lésions pulmonaires de porcs qui avaient inhalé au préalable de l'acide gastrique ^[79]. Sur modèle humain utilisant la procédure d'EVLP, Franck et al ont montré que la clairance liquidienne alvéolaire était améliorée par l'instillation de terbutaline (augmentation de $43 \pm 13\%$ dans les 30 minutes suivant l'instillation) ^[56]. Sur un modèle similaire, Lee et al ont rapportés que l'administration de cellules souches mésenchymateuses allogéniques une heure après l'instillation d'endotoxine d'*Escherichia coli*, diminuait la perméabilité alvéolo-capillaire et restaurait la clairance liquidienne alvéolaire. L'effet bénéfique était principalement associé à la sécrétion du facteur de croissance des kératinocytes ^[105]. Cypel et al ont montré par ailleurs sur des poumons humains dont la production de cytokine anti-inflammatoire IL-10 était stimulée par thérapie génique, que les capacités d'échanges gazeux s'amélioraient et les RVP diminuaient ^[32].

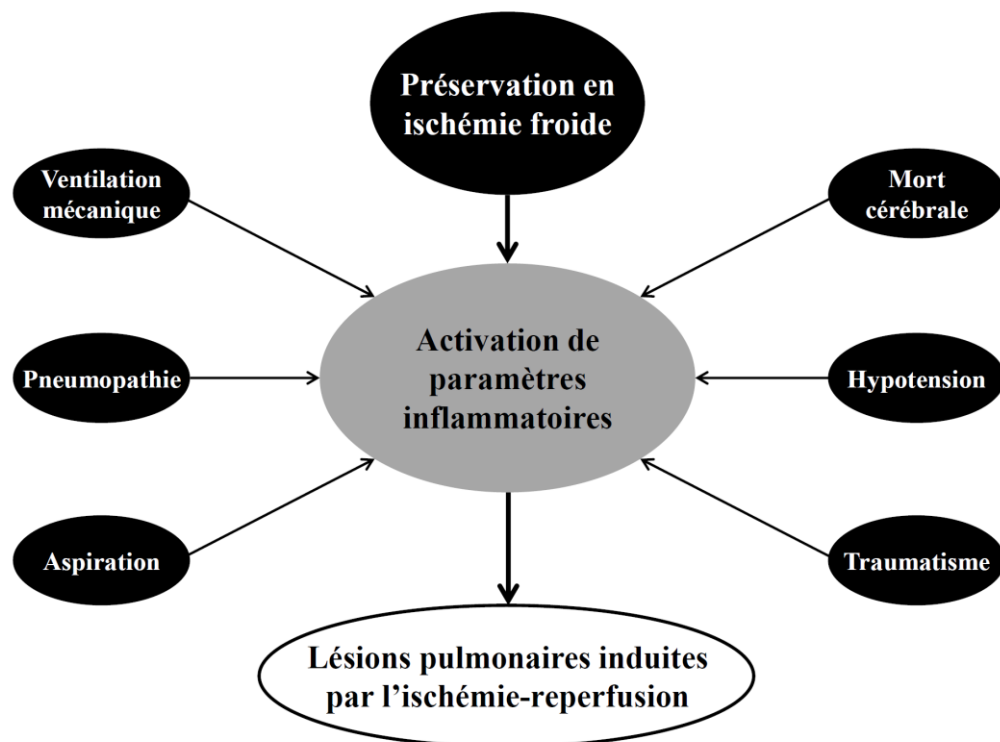
La procédure d'EVLP permet d'évaluer des thérapeutiques supposées limiter les lésions d'I/R. Elle apparait comme l'outil expérimental « idéal » des poumons isolés. Les perspectives thérapeutiques les plus novatrices utilisent la thérapie cellulaire et la thérapie génique.

I.3 Ischémie-Reperfusion

I.3.1 Définition

En dépit des avancées en matière de préservation pulmonaire, de l'amélioration des techniques chirurgicales et de la prise en charge péri-opératoire, les lésions pulmonaires induites par l'I/R demeurent une cause importante de morbidité et de mortalité précoces après transplantation pulmonaire. Ce syndrome survient habituellement dans les 72 heures qui suivent la transplantation. Il est caractérisé par des dommages alvéolaires diffus non spécifiques, un œdème pulmonaire et une hypoxie pouvant conduire jusqu'à la dysfonction primaire du greffon, parfois responsable du décès du patient, de la prolongation de son assistance respiratoire par ventilation mécanique ou du rejet aigu du greffon ^[95]. La dysfonction primaire du greffon est principalement imputable aux lésions d'I/R mais d'autres agressions survenant chez le donneur avant le prélèvement d'organe peuvent majorer ces lésions (Figure 7).

Figure 7 : Evénements survenant chez le donneur avant le prélèvement et pouvant aggraver les lésions pulmonaires d'ischémie-reperfusion (d'après De Perrot et al ; 2003 ; AJRCCM) ^[141]



C'est la raison pour laquelle l'évaluation des poumons du donneur doit s'attacher à sélectionner des poumons qui seront capables de supporter plusieurs heures d'ischémie, sans être trop impactés sur le plan fonctionnel. Plusieurs stratégies de prévention et de traitement des lésions pulmonaires induites par l'I/R, introduites en pratique clinique, ont permis de réduire l'incidence de la dysfonction primaire du greffon de 30 à 15% ^[51,117].

L'I/R est un syndrome qui apparaît dans les 72 heures qui suivent le prélèvement et peut conduire à la défaillance primaire du greffon, voire au décès du patient.

I.3.2 Conséquences physiopathologiques

Les poumons sélectionnés pour la transplantation sont classiquement perfusés avec du liquide de préservation froid puis conservés en hypothermie, afin de ralentir leur métabolisme. L'hypothermie, l'ischémie et la reperfusion induisent de nombreux processus physiopathologiques susceptibles de concourir à la mort cellulaire. Il s'agit notamment de l'augmentation du stress oxydatif, de l'inactivation de la pompe à sodium, de l'augmentation du calcium intracellulaire, de l'induction de la mort cellulaire et de la libération de médiateurs pro-inflammatoires.

I.3.2.1 Augmentation du stress oxydatif

Le stress oxydatif est caractérisé par la production d'espèces oxygénées particulièrement instables telles que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle, susceptibles d'interagir avec la première structure moléculaire rencontrée, habituellement les lipides constitutifs de la membrane cellulaire ^[114]. Les lésions cellulaires induites vont de la simple augmentation de perméabilité à la lyse cellulaire. Le stress oxydatif intéresse la plupart des cellules du parenchyme pulmonaire ^[6]. Il résulte de deux mécanismes : 1) un mécanisme lié à l'hypoxie – anoxie : la décroissance de l'ATP avec accumulation de son produit de dégradation, l'hypoxanthine, à partir duquel des espèces oxygénées réactives sont produites au moment de la réoxygénation par reperfusion et/ou ventilation ^[91], 2) un mécanisme lié à l'ischémie mais non lié l'hypoxie ou à la décroissance en ATP, NADPH oxydase dépendant, qui survient principalement au niveau des cellules endothéliales, des polynucléaires neutrophiles et des monocytes/macrophages (Figure 8) ^[7,91]. Au niveau endothélial, la modification des forces physiques liées à l'arrêt du flux sanguin (ischémie) induit des signaux biochimiques (mécanotransduction) responsables, outre de l'activation de la NADPH oxydase, de l'activation du facteur nucléaire (NF)- κ B et de l'oxyde nitrique synthase (NOS) calcium/calmoduline dépendante ^[7,8].

Le stress oxydatif induit par l'I/R induit la lyse cellulaire. Il résulte d'un mécanisme lié à l'hypoxie, avec décroissance en ATP et accumulation d'hypoxanthine et d'un mécanisme lié à l'ischémie, NADPH oxydase dépendant.

I.3.2.2 Inactivation de la pompe à sodium

L'augmentation de la glycolyse anaérobie au cours de l'ischémie est responsable de l'accumulation d'acide lactique et d'ions H^+ au niveau cytoplasmique. Les ions H^+ sortent en partie de la cellule grâce à l'échangeur membranaire Na^+/H^+ . Le sodium entrant est ensuite évacué de la cellule par la pompe Na^+/K^+ -ATPase dont dépend essentiellement la clairance liquidienne alvéolaire. En situation d'hypothermie ou d'hypoxie, la pompe Na^+/K^+ -ATPase dysfonctionne et le sodium s'accumule au niveau intracellulaire, entraînant un « œdème cellulaire » ^[170]. En parallèle, l'échangeur Na^+/Ca^{2+} est responsable d'une accumulation de calcium au niveau cytoplasmique d'autant plus importante que la pompe à sodium dysfonctionne (Figure 8). Les solutions de préservation contiennent des électrolytes et des colloïdes dont le pouvoir osmotique vise à réduire l'œdème cellulaire secondaire à l'accumulation cytoplasmique de sodium.

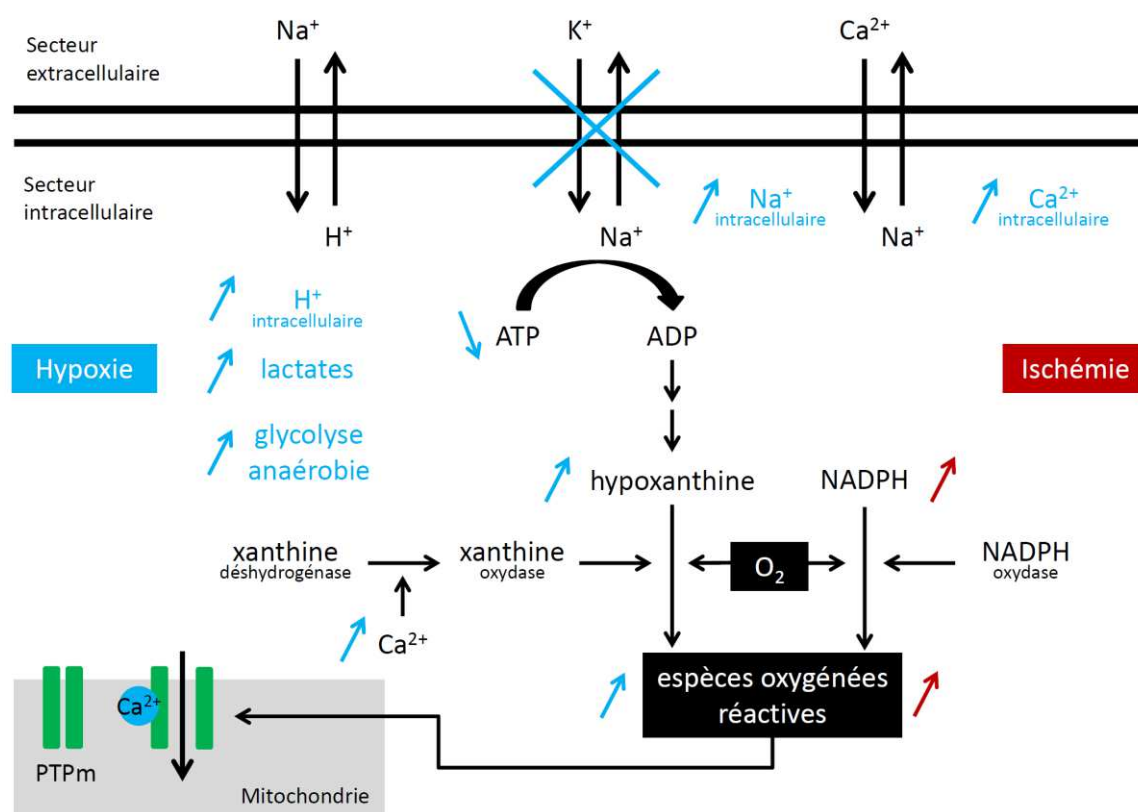
La décroissance en ATP induite par l'hypoxie est responsable de l'inactivation de la pompe à sodium à l'origine d'un « œdème cellulaire » et d'une accumulation de calcium au niveau cytoplasmique.

I.3.2.3 Surcharge en calcium intracellulaire

La surcharge en calcium intracellulaire est liée à l'hypoxie qui inactive la pompe Na^+/K^+ -ATPase et à l'hypothermie qui libère le calcium de ses espaces de stockage intracellulaire ^[31]. Cette surcharge peut engendrer des dommages cellulaires, en particulier en favorisant l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm) et la transformation de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase qui potentialise la production de radicaux libres (Figure 8) ^[114]. L'administration de calcium bloqueurs (ex : Diltiazem, Nifedipine, Verapamil) avant le prélèvement pulmonaire, limiterait les lésions d'I/R ^[89,178].

La surcharge en calcium intracellulaire résulte d'une entrée de calcium dans la cellule et d'une modification de son métabolisme intracellulaire. Elle favorise l'ouverture du PTPm et la production d'espèces oxygénées réactives.

Figure 8 : Formation d'espèces oxygénées réactives au cours de l'anoxie-réoxygénation et de l'ischémie-reperfusion pulmonaire



L'hypoxie est responsable au niveau intracellulaire, de la mise en route de la glycolyse anaérobie, de l'accumulation de lactates et d'ions H^+ . La baisse de la production d'ATP et l'accumulation de son produit de dégradation, l'hypoxanthine, favorise la production d'espèces oxygénées réactives sous l'effet de la xanthine oxydase. Les ions H^+ accumulés au niveau intracellulaire s'échangent avec les ions Na^+ extracellulaires. La pompe Na^+/K^+ -ATPase ne fonctionnant plus par manque d'ATP, le Na^+ s'accumule au niveau intracellulaire et s'échange avec le Ca^{2+} extracellulaire. Le Ca^{2+} accumulé au niveau intracellulaire favorise à son tour l'ouverture du PTPm et la transformation de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase. L'ischémie est par ailleurs responsable d'une accumulation de NADPH qui, sous l'effet de la NADPH oxydase, favorise la production d'espèces oxygénées réactives. Ces dernières favorisent à leur tour l'ouverture du PTPm.

ATP = adénosine triphosphate ; ADP = adénosine diphosphate ; NADPH = nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; PTPm = pore de transition de perméabilité mitochondriale.

I.3.2.4 Mort cellulaire et pore de transition de perméabilité mitochondriale

Chez l'homme, dans les transplantations pulmonaires réussies (fonction pulmonaire conservée, devenir favorable des patients), environ 30% des cellules pulmonaires entrent en apoptose dans les deux heures qui suivent la reperfusion ^[48]. Des faits similaires ont été observés expérimentalement chez le rat, après 12 heures d'ischémie froide ^[50]. L'apoptose

n'intervient alors pas au moment de l'ischémie (contrairement à la nécrose) mais à la reperfusion. L'induction de l'apoptose est régulée par 2 voies, intrinsèque et extrinsèque. La voie intrinsèque met en jeu la mitochondrie et le PTPm ; elle est notamment activée par les espèces oxygénées réactives et l'accumulation de calcium intracellulaire (Figure 8) ^[5,182]. La voie extrinsèque met en jeu des récepteurs de mort cellulaire et leurs ligands (ex : TNF et son récepteur) ^[41]. L'activation de la première voie est précoce lors de la reperfusion ^[66] ; la seconde est tardive, son induction prenant parfois plusieurs heures ^[103].

Le PTPm est situé au niveau de la membrane mitochondriale interne. Sa structure moléculaire est toujours débattue. Dans des conditions physiologiques normales, le PTPm est fermé et la membrane mitochondriale interne est imperméable à la plupart des ions et métabolites. Sous l'effet du stress oxydatif, le PTPm s'ouvre et les forces osmotiques engendrées par les protéines de la matrice mitochondriale sont responsables d'un gonflement de la matrice, pouvant conduire à la rupture de la membrane mitochondriale externe et à la libération au sein du cytoplasme de facteurs pro-apoptotiques ^[61].

L'injection d'agents anti-apoptotiques de type IGF (insulin-like growth factor) -1 ou ZVAD-fmk (Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F) avant la reperfusion de reins ou de cœurs sur des modèles murins, permettrait de réduire les lésions d'I/R ^[38,177].

L'apoptose est induite par l'I/R. Elle est notamment la conséquence de l'ouverture du PTPm.

I.3.2.5 Libération de médiateurs pro-inflammatoires

L'I/R des organes solides tels que les reins, le foie, le cœur et les poumons, est responsable de la libération précoce de cytokines pro-inflammatoires (Tableau 1) ^[62,107,135,153]. Une grande partie d'entre elles est produite par les macrophages alvéolaires, en réponse au stress oxydatif ^[125]. L'I/R s'accompagne également d'un remodelage membranaire avec production de lipides bioactifs dont certains ont des fonctions de médiateurs intra ou extracellulaires ^[60]. Elle est aussi responsable de l'activation du système du complément et de la production d'endothéline qui vont indirectement augmenter la perméabilité vasculaire et amplifier la réponse inflammatoire ^[2,57,126].

Le RAGE constitue par ailleurs un marqueur relativement spécifique de la lésion épithéliale pulmonaire. En situation de stress, le RAGE, produit principalement par les cellules alvéolaires de type I qui recouvrent 95% de la surface pulmonaire, se retrouve au niveau alvéolaire et du perfusat ^[166]. Les travaux de Briot et al et Franck et al montrent que la concentration de RAGE dans le liquide alvéolaire est corrélée aux capacités de réabsorption

liquidienne épithéliale du poumon (Figure 9) ^[19,56]. Le taux de RAGE est également corrélé à la mortalité précoce post-transplantation ^[21].

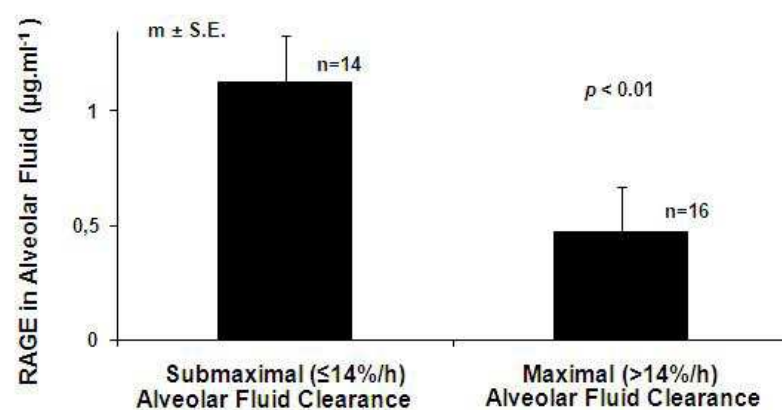
L'I/R induit la libération de médiateurs de l'inflammation produits notamment par les macrophages. Le RAGE est un marqueur spécifique de la lésion épithéliale pulmonaire. Il est corrélé à la clairance liquidienne alvéolaire.

Tableau 1 : Origine et fonction des cytokines mises en jeu dans les lésions d'ischémie-reperfusion au cours de la transplantation pulmonaire (d'après De Perrot et al ; 2003 ; AJRCCM) ^[141]

Cytokine	Main Cell Source	Function
TNF- α	Macrophages, lymphocytes	Proinflammatory
IFN- γ	Lymphocytes	Proinflammatory
MCP-1	Immune cells, and lung epithelial cells	Macrophage chemotaxis
IL-1 β	Macrophages, fibroblasts	Proinflammatory
IL-2	Lymphocytes	T cell proliferation
IL-6	Macrophages, endothelial cells, and epithelial cells	Proinflammatory
IL-8	Macrophages, epithelial cells, and fibroblasts	Neutrophil chemotaxis
IL-10	Macrophages, lymphocytes	Antiinflammatory
IL-12	Macrophages	T cell activation
IL-18	Macrophages	T cell activation

Definition of abbreviations: IL = interleukin; MCP-1 = macrophage chemoattractant protein-1; TNF = tumor necrosis factor.

Figure 9 : Clairance liquidienne alvéolaire en fonction des concentrations du marqueur de lésion épithéliale RAGE dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (d'après Briot et al ; 2009 ; Chest) ^[19]



I.3.3 Prévention de la dysfonction pulmonaire

I.3.3.1 Solution de préservation et technique d'administration

Les solutions de préservation qui contiennent du dextran (pouvoir osmotique et anti-thrombotique), du glucose et qui possèdent une faible concentration en potassium (ex : Perfadex®), ont montré leur supériorité en terme de préservation pulmonaire, dans des délais pouvant atteindre 24 heures d'ischémie ^[93,155]. La plupart des équipes qui pratiquent la transplantation pulmonaire utilisent la technique du flush unique (flush antérograde *via* l'artère pulmonaire) en raison de sa simplicité technique ^[77]. Toutefois, certaines équipes pratiquent la technique du double flush (antérograde et rétrograde, *via* les veines pulmonaires) qui permettrait essentiellement une meilleure distribution du liquide de préservation ^[169]. D'autres équipes pratiquent la technique du flush rétrograde tardif (en association au flush antérograde) qui permettraient de « laver » les poumons des médiateurs pro-inflammatoires accumulés en phase d'ischémie ^[154]. Par ailleurs, un débit élevé d'administration de la solution de préservation semble associé à une meilleure fonction pulmonaire après reperfusion ^[72,153]. L'utilisation d'une solution hypothermique reste la règle ^[122].

La solution de préservation doit avoir un pouvoir oncotique au moins identique au sang et doit contenir du glucose. Elle doit être hypothermique et administrée à débit élevé. La technique du flush antérograde est la plus employée.

I.3.3.2 Inflation, oxygénation et température de préservation

De nombreuses études montrent qu'on améliore la préservation pulmonaire en pratiquant une inflation durant la période d'ischémie froide ^[77]. Cela permet de maintenir un certain niveau de métabolisme aérobie et de préserver partiellement l'intégrité du surfactant et le transport épithélial alvéolaire ^[52,73,95]. Sakuma et al ont montré que l'inflation pulmonaire permettait de maintenir la clairance liquidienne alvéolaire (*versus* déflation avec décroissance de la clairance) indépendamment de la présence d'oxygène ^[147]. D'une façon générale, l'inflation pulmonaire vise à réduire les atelectasies, associées à des résistances vasculaires pulmonaires élevées et à une moins bonne distribution de la solution de préservation ^[13]. L'hyperinflation est toutefois délétère ^[68].

La présence d'oxygène est requise durant la période de préservation des poumons prélevés. Toutefois, une $\text{FiO}_2 > 50\%$ s'associerait à une peroxydation lipidique accrue ^[39]. L'utilisation d'une FiO_2 de 50% ou moins est recommandée en pratique clinique.

La température de préservation des poumons a fait l'objet de débats. Certaines équipes ont suggéré que les poumons devraient être préservés à 10°C plutôt qu'à 4 ou 15°C mais d'autres auteurs n'ont pas corroboré cette thèse ^[96,167]. Si à cela on ajoute qu'à 10°C les poumons ont davantage besoin de substrats métaboliques et qu'au-delà de 10°C le risque de lésion pulmonaire augmente fortement, une température de préservation comprise entre 4 et 8°C semble être la plus adaptée ^[141]. De fait, il s'agit de la température de conservation habituellement utilisée en pratique clinique courante.

L'inflation, une $FiO_2 \leq 50\%$ et une température comprise entre 4 et 8°C, améliorent la préservation pulmonaire.

I.3.3.3 Techniques de reperfusion et de ventilation

Ces éléments ont déjà été abordés dans le chapitre I.2.

I.3.3.4 Thérapies impliquant des médiateurs de l'inflammation

L'administration de la prostaglandine (PG) E_1 en phase précoce de reperfusion réduit les lésions d'I/R. Les mécanismes en cause sont les propriétés vasodilatatrices de PGE_1 et la modification du profil des cytokines, avec décroissance des cytokines pro-inflammatoires $TNF-\alpha$ et IL-12, et production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ^[140]. Les études à haut niveau faisant défaut, l'utilisation de PGE_1 n'est pas recommandée en pratique clinique courante.

L'inhibition du système du complément semble aussi avoir un effet bénéfique sur les lésions d'I/R, la durée d'intubation et la durée moyenne de séjour en réanimation des patients transplantés ^[180].

Par ailleurs, la recherche en matière de thérapie cellulaire en transplantation pulmonaire s'est développée au cours des quinze dernières années ^[25]. Les études les plus récentes se sont notamment intéressées à l'utilisation d'un gène codant pour la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ^[32,49]. Elle n'est pas utilisée en pratique clinique courante.

L'utilisation de PGE_1 , d'IL-10 ou d'inhibiteurs du système du complément, semblerait limiter les lésions d'I/R. Ces molécules ne sont actuellement pas recommandées en pratique clinique courante.

I.3.3.5 Surfactant

Le surfactant est principalement constitué de lipides. Il est produit, stocké et sécrété par les cellules alvéolaires de type II. Il existe un pool intracellulaire au sein des cellules épithéliales alvéolaires de type II et un pool intra-alvéolaire ^[130]. Le surfactant dysfonctionne

au cours de l'I/R ^[133]. L'administration de surfactant exogène améliore la fonction pulmonaire après transplantation, notamment lorsqu'elle intervient chez le donneur avant prélèvement ^[131,158]. Les études à haut niveau de preuve manquant, l'utilisation de surfactant n'est pas recommandée en pratique clinique courante.

L'administration de surfactant semblerait améliorer la fonction pulmonaire mais elle n'est actuellement pas recommandée en pratique clinique courante.

I.3.3.6 Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) a des propriétés vasoactives et immunomodulatrices ^[117]. Il est produit par la famille des NO synthases (NOS) dont l'isoforme NOS-III est exprimée de façon constitutive au niveau endothélial et l'isoforme NOS-II est inductible au niveau de l'endothélium, de l'épithélium et des macrophages. Le NO catalyse la formation de 3'-5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPc), principal événement qui entre en compte dans son mécanisme d'action. Le NO réduit le tonus vasculaire et la vasoconstriction hypoxique, limite l'adhésion plaquettaire, est impliqué dans la destruction d'organismes exogènes et limite les lésions tissulaires ^[110]. Il décroît au cours de l'I/R ^[104]. L'augmentation du NO avant reperfusion, soit par un apport exogène sous forme d'inhalation, soit par stimulation de l'activité des NOS, permettrait de réduire les lésions d'I/R ^[10,29]. Cependant, le NO peut réagir avec l'anion superoxyde pour former l'acide peroxynitreux, oxydant très actif qui peut induire une libération d'endothéline et majorer les lésions alvéolaires ^[46]. Le NO n'a toutefois pas démontré son intérêt dans la prévention de la défaillance primaire du greffon, la durée de séjour ou la mortalité à 30 jours des patients greffés ^[9,115].

Le NO permettrait de réduire les lésions d'I/R par son action vasodilatatrice mais il peut être aussi à l'origine de la production d'espèces oxygénées réactives. Son utilisation n'est actuellement pas recommandée en pratique clinique courante.

I.3.3.7 Monoxyde de carbone

Le monoxyde carbone (CO) est issu de la voie de l'hème oxygénase. Il a comme le NO, des propriétés vasoactives via la formation de GMPc ^[90]. Il possède également une activité anti-inflammatoire et anti-apoptotique, dépendante de la voie des mitogen-activated protein (MAP) kinases, distincte de la voie NO/GMPc ^[59,134]. Une surexpression de l'hème oxygénase risque cependant d'entraîner une accumulation de fer libre à l'origine de la catalyse du radical hydroxyle, augmentant ainsi le stress oxydatif ^[161]. Le CO constitue une voie de recherche développée par notre équipe (non abordée dans cette thèse).

Le CO possède des propriétés vasoactives, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques potentiellement intéressantes dans la physiopathologie de l'I/R. Son intérêt thérapeutique n'a été que très peu étudié jusqu'à présent.

I.3.3.8 Préconditionnement et postconditionnement

En partant du postulat qu'un tissu exposé à un premier stress peut développer une tolérance à un second stress, plusieurs équipes ont développé dans les années 1990 des méthodes de preconditionnement pulmonaires et cardiaques, qui visaient à réduire les lésions d'I/R. Certaines ont appliqué de brèves périodes d'ischémie, d'autres de brèves périodes d'hyperthermie ^[42,71,75,165].

Le concept de postconditionnement a été développé plus tard par Zhao et al : l'application de brèves périodes d'ischémie au moment d'une reperfusion suivant une période d'ischémie prolongée, réduisait significativement la taille de l'infarctus myocardique ^[181]. Cette étude a permis d'établir de façon formelle le concept de reperfusion létale qui faisait débat jusqu'alors. Les phénomènes de nécrose et d'apoptose ont été décrits dans la reperfusion létale ^[65,113]. Par ailleurs, la majorité des lésions tissulaires sont déclenchées par des événements biologiques qui surviennent lors des premières minutes de reperfusion ^[94,181]. Le postconditionnement réduit la production d'espèces oxygénées réactives et la concentration en calcium intracellulaire ^[160].

L'application de brèves périodes d'ischémie avant ou après une période d'ischémie prolongée, participe à la préservation de l'organe. Il s'agit des méthodes de pré et postconditionnement.

I.4 Cyclosporine A

I.4.1 Origine, structure et pharmacologie

La CsA est un décapeptide de poids moléculaire 1202 Daltons découvert en Suisse en 1972 ^[86]. Dans le plasma, 90% des molécules de CsA sont liées aux protéines. Sa biodisponibilité est très variable, essentiellement à cause des variabilités interindividuelles de l'absorption intestinale ^[124]. Son métabolisme est principalement hépatique, *via* le système du cytochrome P450. Sa demi-vie est de 6 à 9 heures ^[74].

La CsA a révolutionné le monde médical dans le domaine de la transplantation. Découverte à l'occasion de travaux qui cherchaient un nouvel agent antifongique, la CsA s'est révélée être une molécule aux propriétés immunologiques multiples ^[15]. En 1983, a été publiée la première étude européenne multicentrique qui montrait une nette augmentation du taux de survie à un an des patients greffés rénaux grâce à l'utilisation de la CsA (taux de survie de 72% dans le bras recevant la CsA *versus* 52% dans le bras recevant l'association azathioprine et stéroïdes) ^[69]. L'utilisation de la CsA dans la pratique clinique a ainsi été approuvée en Europe et aux USA vers la fin des années 80, malgré sa néphrotoxicité qui avait été mise en évidence précocement ^[23]. Néanmoins, il est apparu que cette néphrotoxicité était à la fois dose dépendante et réversible avec la réduction des posologies ou l'irrégularité des administrations ^[22,24,27,120]. Ces faits ont amené les cliniciens à tenter de réduire l'exposition de leurs patients à la CsA, par l'utilisation de protocoles thérapeutiques incluant d'autres agents immunosuppresseurs, sans toutefois prendre le risque d'une trop faible immunosuppression à l'origine du rejet de l'organe transplanté. De façon plus récente, la CsA a montré son intérêt tout particulier dans le domaine de l'I/R. Elle permet en effet de réduire les lésions d'I/R de nombreux organes, grâce notamment à ses propriétés anti-apoptotiques. Notons qu'il existe par ailleurs des molécules non immunosuppressives, en particulier le NIM-811 (N-Methyl-4-isoleucine cyclosporin) et le Debio-025, dont les effets mitochondriaux sont comparables à la CsA.

La CsA a révolutionné le monde de la transplantation en raison de ses propriétés immunosuppressives et cela malgré sa néphrotoxicité. Plus récemment, la CsA est apparue comme une molécule particulièrement intéressante pour réduire les lésions d'I/R.

I.4.2 Mécanismes d'action

Les effets de la CsA résultent de sa liaison intra-cytoplasmique à la cyclophiline A (CypA) et de sa liaison intra-mitochondriale à la cyclophiline D (CypD). La liaison CsA-CypA est le point de départ d'une cascade d'événements à l'origine des effets immunologiques et vasoactifs de la CsA. La liaison CsA-CypD intervient quant à elle dans la physiopathologie de l'I/R (Figure 10).

I.4.2.1 Voie cyclophiline A / calcineurine : effets immunologiques et vasoactifs

Le complexe CsA-CypA inhibe la calcineurine au niveau cytoplasmique. La calcineurine est une sérine thréonine phosphatase calcium/calmoduline dépendante. Elle intervient notamment dans la déphosphorylation du facteur nucléaire des lymphocytes T activés (Nuclear Factor of Activated T-cells, NFAT), à l'origine de l'activation de la transcription du gène codant pour IL-2. L'inhibition de la calcineurine par le complexe CsA-CypA a donc pour conséquence de réduire la transcription du gène codant pour IL-2, principal événement à l'origine de la modulation de la réponse immunitaire par la CsA. En revanche, il a également été démontré que la CsA activait certains récepteurs de type toll (Toll-Like Receptor, TLR) et le TNF- α , eux-mêmes à l'origine d'une activation du système immunitaire inné ^[108].

Par ailleurs, de nombreuses publications traitent de l'effet vasoconstricteur de la CsA au niveau rénal ^[14,123]. La vasoconstriction des artérioles afférentes et efférentes apparaît secondaire à l'augmentation de facteurs vasoconstricteurs tels que l'endothéline et le thromboxane et à la réduction de facteurs vasodilatateurs tels que la PGE₂, la prostacycline et le NO ^[78,150,162]. L'inhibition de l'expression de la cyclo-oxygénase (COX)-2 médiée par NFAT permet d'expliquer la baisse de production d'acide arachidonique à l'origine de la baisse de la production de la PGE₂ et de la prostacycline ^[76].

La CsA par la voie cyclophiline A / calcineurine, inhibe la transcription d'IL-2 et la production de vasodilatateurs tels que la PGE₂, la prostacycline ou le NO.

I.4.2.2 Voie cyclophiline D / PTPm : effet anti-apoptotique

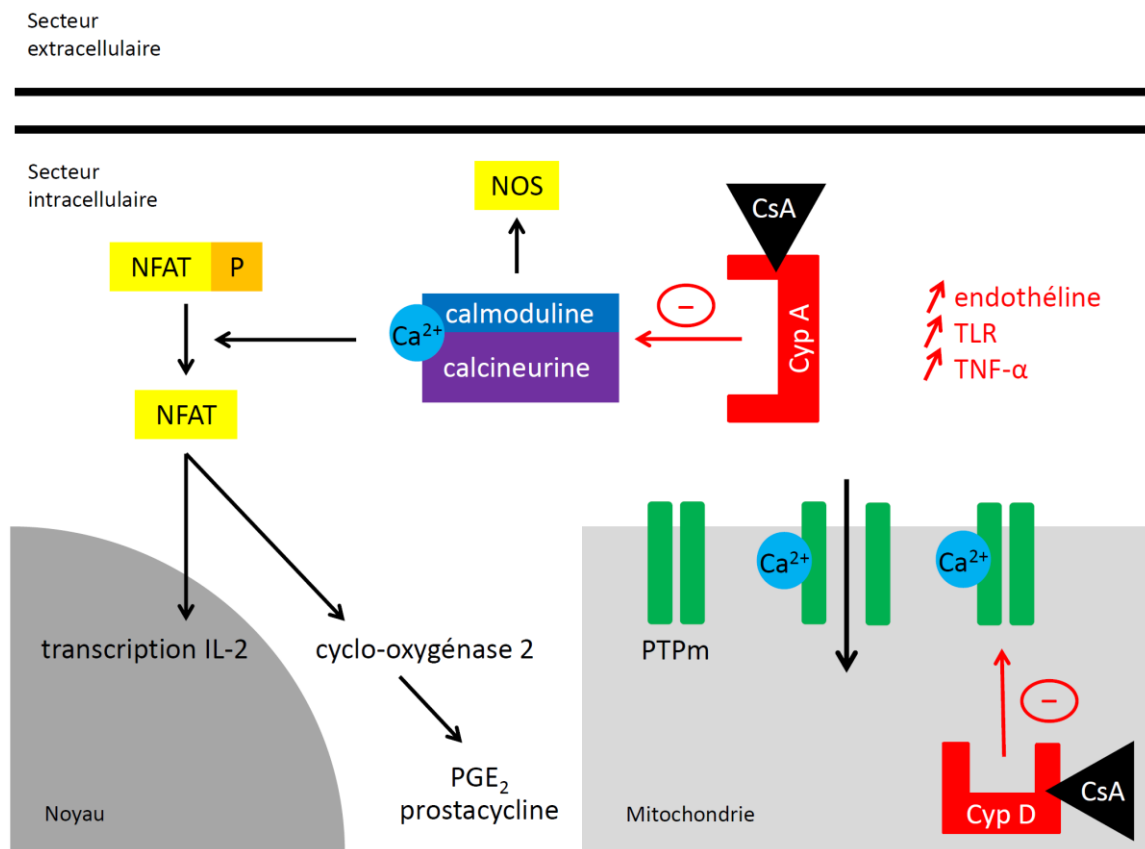
Le complexe CsA-CypD empêche la modification de conformation de l'adénine nucléotide translocase (ANT) à l'origine de l'ouverture du PTPm. La modification de conformation de l'ANT par la CypD seule modifie sa fonction : l'ANT ne fonctionne alors plus comme un transporteur de nucléotides mais comme un composant canalaire du PTPm ^[31,175]. La CsA, par sa liaison à la CypD, empêche la CypD de modifier la conformation de

l'ANT et par conséquent, empêche l'ouverture du PTPm. *In vitro*, des cellules n'exprimant pas le gène codant pour la CypD sont plus résistantes à la mort cellulaire induite par les espèces oxygénées réactives ou la surcharge en calcium intracellulaire ^[127]. *In vivo*, les souris CypD déficientes ont des infarctus du myocarde moins importants pour des temps donnés d'I/R ^[12]. Cependant, certains auteurs ont évoqué que l'ANT n'était pas un composant essentiel du PTPm. En effet, ils ont démontré sur des souris ANT déficientes que la CsA était toujours capable d'inhiber l'ouverture du PTPm ^[99].

De nombreuses études ont souligné le rôle CsA dans la prévention des lésions d'I/R, qu'elle soit donnée au moment de l'ischémie ou de la reperfusion, dans différents modèles d'organes d'espèces animales diverses ^[45,64,67,102,125,164,176]. Le myocarde a été particulièrement étudié. Il existe notamment un essai clinique récent où l'administration de CsA juste avant la reperfusion coronaire, réduisait la taille de l'infarctus du myocarde ^[142]. Les effets pulmonaires de la CsA sur une possible prévention des lésions d'I/R ont été peu étudiés. *In vitro*, sur des cultures de macrophages alvéolaires soumis à des lésions d'hypoxie/réoxygénation, un prétraitement par CsA réduisait la production de médiateurs pro-inflammatoires ^[125]. Les cultures de cellules endothéliales d'artères pulmonaires soumises au même type de stress, produisaient également moins de médiateurs pro-inflammatoires lorsqu'elles étaient préalablement incubées avec de la CsA ^[45]. *In vivo*, Krishnadasan et al ont montré que des rats recevant la CsA avant ischémie, avaient une perméabilité pulmonaire moins élevée et une moindre accumulation tissulaire de leucocytes et de myéloperoxidase ^[102]. Cependant, les travaux sur les effets pulmonaires de la CsA n'ont été menés que sur des cultures cellulaires ou des modèles de petits animaux (rongeurs) et il n'existe à ce jour aucune étude sur poumons isolés de grands mammifères.

La CsA par la voie cyclophiline D / PTPm, prévient l'I/R dans un grand nombre de modèles d'organes de différentes espèces animales. Le myocarde est le tissu le plus étudié, contrairement aux poumons qui ne l'ont pratiquement pas été.

Figure 10 : Effets cytoplasmiques et mitochondriaux de la Cyclosporine A



L'action de la Cyclosporine A est médiée au niveau cytoplasmique par la cyclophiline A et la calcineurine calcium/calmoduline dépendante. Elle inhibe la production des vasodilatateurs PGE₂ et prostacycline et la transcription d'IL-2 en limitant la déphosphorylation du facteur nucléaire des lymphocytes T activés. Elle inhibe également la production du vasodilatateur NO en modulant la NO synthase. Par ailleurs, la CsA stimule la production d'endothéline, de récepteurs de type toll et de TNF-α. L'action de la CsA est médiée au niveau mitochondrial par la cyclophiline D. Elle inhibe l'ouverture du PTPm.

CsA = Cyclosporine A ; Cyp = cyclophiline ; IL = interleukine ; NFAT = nuclear factor of activated T-cells, facteur nucléaire des lymphocytes T actifs ; NO = monoxyde d'azote ; NOS = nitric oxid synthase ; PG = prostaglandine ; PTPm : pore de transition de perméabilité mitochondriale ; TLR = toll-like receptor, récepteur de type toll.

MATERIELS ET METHODES

II- Matériel et Méthodes

Nous avons procédé à deux expérimentations A et B qui évaluent les effets de plusieurs doses de CsA sur des lésions pulmonaires engendrées par différentes périodes d'I/R. A l'issue des résultats obtenus dans l'expérimentation A, pour s'affranchir des limites de l'étude tout en améliorant la pertinence des données, nous avons ciblé l'expérimentation B sur des posologies plus faibles de CsA, avec des poumons qui subissaient des périodes d'ischémie plus longues. L'essentiel de procédure utilisée pour les deux expérimentations est décrite dans la méthode de l'expérimentation A. La méthode de l'expérimentation B s'attache à ne décrire que les évolutions méthodologiques entre les expérimentations A et B.

II.A Expérimentation A (détermination de doses)

II.A.1 Préparation animale

Les procédures de la déclaration d'Helsinki relatives à l'utilisation d'animaux dans un cadre expérimental, ont été respectées. L'expérimentation A a été réalisée sur 32 porcs pesant $19,9 \pm 1,6$ kg. Les porcs étaient anesthésiés avec une inhalation comprenant 5% d'Isoflurane (Belamont ; Cournon d'Auvergne, France). Un cathéter de 20-gauge était placé dans une veine au niveau d'une oreille. Les porcs étaient ensuite curarisés avec 1,5 mg/kg de chlorure de Suxamethonium (Upharm; Boulogne Billancourt, France) IV, intubés et mécaniquement ventilés avec 2% d'Isoflurane. Le volume courant (tidal volume, V_T) était de 7 mL/kg et la fréquence respiratoire (f) était de 12 respirations/minute. Une pression positive de fin d'expiration (positive end-expiratory pressure, PEEP) de 5 cmH₂O était délivrée. La fraction inspirée en oxygène (FiO₂) était de 50%. 10000 unités d'Héparine (Sanofi-Aventis ; Ploërmel, France) étaient administrées par voie intraveineuse (IV). Quelques minutes plus tard, les porcs étaient euthanasiés avec 25 mg/kg de Pentobarbital (Chemische Fabrik ; Berg, Allemagne) IV et 5 g de chlorure de potassium IV. La trachée était alors clampée les poumons en inflation puis la chirurgie thoracique initiée. Une sternotomie médiane était effectuée, la veine cave inférieure et l'aorte descendante clampées. La pneumoplégie était effectuée par la perfusion d'un litre de liquide de préservation de type Perfadex® (Vitrolife AB ; Gothenburg, Suède) à 4°C dans le ventricule droit. Le pH du Perfadex® était préalablement ajusté avec du Trometamol isotonique (Addex-THAM ; Kabi, Suède). Le ventricule gauche était largement ouvert afin de permettre l'écoulement du liquide de préservation issu des poumons. Ensuite, le bloc cœur-poumons était prélevé, les poumons

chirurgicalement individualisés des cavités cardiaques, avant d'être conservés dans une chambre froide à 4°C pour 30 minutes.

II.A.2 Préparation pulmonaire *ex vivo*

Le système d'évaluation *ex vivo* de la fonction pulmonaire comprenait un réservoir en plexiglass, une pompe de CEC et 2,8 L de Perfadex® associé à 5% d'Albumine (Sigma-Aldrich; Saint Louis, USA) et 2 mg/L de Trinitrine (Sanofi-Aventis; France). L'artère pulmonaire était canulée avec une canule de calibre 20-F (Turemo ; Ann Arbor, USA), connectée au circuit extracorporel. Un capteur de pression (Baxter ; Uden, Pays-Bas) était placé dans l'artère pulmonaire. Un premier capteur de température (Sorin Group ; Arvada, USA) était connecté à l'oxygénateur membranaire et un second (Integral Process ; Conflans Sainte Honorine, France) était placé à la sortie des veines pulmonaires. Du Trometamol isotonique était utilisé afin d'obtenir un pH physiologique dans la solution obtenue. Un apport de 2 L/min d'oxygène et de 2 L/min d'azote (93%) associé à du dioxyde de carbone (7%) était assuré *via* l'oxygénateur membranaire.

II.A.3 Phase de réchauffement

Le réchauffement de la préparation pulmonaire était initié par des débits lents de pompe de CEC (100 mL/min) avec un objectif thermique de 25°C. Le débit de pompe de CEC était graduellement augmenté, en parallèle à l'augmentation de la température du liquide de préservation. A 32°C, la ventilation était initiée ($V_T = 50$ mL, $f = 12$ /min, PEEP = 5 cmH₂O, FiO₂ = 50%) puis graduellement augmentée par des incréments de 20 mL jusqu'à un volume courant maximal de 7 mL/kg. Durant la phase de réchauffement, le débit de CEC était progressivement augmenté jusqu'à 1,3 L/min (débit cardiaque moyen d'un porc de 20 kg). On ne permettait jamais à la PAP d'excéder 25 mmHg. Dans un tel cas de figure, le débit de pompe de CEC était fixé pour permettre à la PAP de ne pas excéder 25 mmHg. La phase de réchauffement était considérée terminée lorsque la température de la solution à la sortie des veines pulmonaires atteignait 36°C et que le débit cardiaque et la ventilation souhaités étaient obtenus. L'arrivée d'oxygène dans l'oxygénateur membranaire était alors coupée. Seul l'apport d'azote associé au dioxyde de carbone était maintenu. Cet état stable était maintenu pour 45 minutes avant d'initier la phase d'évaluation. Le temps moyen d'ischémie chaude était de 18 ± 4 min et le temps moyen d'ischémie froide, de 117 ± 20 min.

II.A.4 Phase d'évaluation

Durant la phase d'évaluation, des paramètres d'échanges gazeux (PO_2/FiO_2 = pression partielle en oxygène / fraction inspirée en oxygène, PCO_2 = pression partielle en dioxyde de carbone, E_TCO_2 = end tidal carbon dioxid pressure, pression partielle en dioxyde de carbone expiré), des paramètres hémodynamiques, des marqueurs de l'inflammation pulmonaire, de la fonction épithéliale pulmonaire et de la perméabilité capillaro-alvéolaire étaient mesurés.

II.A.4.1 Paramètres hémodynamiques

La PAP était continuellement mesurée et enregistrée *via* un système d'acquisition numérique (Biopac, Santa Barbara, CA). Pour estimer la Pcap, la pompe de CEC était stoppée pour quelques secondes. La Pcap était calculée en utilisant un modèle développé dans notre laboratoire par Baconnier et al ^[11]. Dans ce modèle, la vascularisation pulmonaire est considérée comme un ensemble de trois compartiments compliants en série (artériel, capillaire et veineux) séparés par deux résistances (artérielle et veineuse). La Pcap était estimée par l'extrapolation au temps zéro du composant lent du profil d'occlusion artérielle. Les résistances vasculaires pulmonaires artériolaires et veinulaires (RVPa et RVPv) étaient ensuite déduites de l'évaluation de la Pcap (Figures 11A et 11B).

II.A.4.2 Fonction épithéliale pulmonaire

La fonction épithéliale pulmonaire était estimée par la mesure des concentrations en RAGE dans le perfusat et le LBA (technique ELISA) et par le calcul de la clairance liquidienne alvéolaire (Alveolar Fluid Clearance, AFC). Le RAGE est reconnu, nous l'avons vu, comme un marqueur lésionnel des cellules épithéliales alvéolaires ^[19]. L'AFC estime les capacités de réabsorption liquidienne et le statut fonctionnel de l'épithélium alvéolaire. L'AFC a été calculée comme précédemment décrit ^[18]. Brièvement, à la fin de l'expérimentation, un cathéter (PE 240 tubing, BD) était placé à travers un port latéral de la sonde d'intubation, au sein de l'arbre aérien pulmonaire et avancé jusqu'à ce qu'une légère résistance soit rencontrée. Ensuite, 100 mL d'une solution salée isotonique à 36°C mélangée à 5% d'Albumine était instillée à travers le cathéter au niveau des espaces aériens pulmonaires. Après 5 min (T0) et 35 min (T30), des échantillons étaient prélevés à travers le cathéter, grâce à de douces aspirations. La variation de la concentration en protéines entre T0 et T30 était utilisée pour déterminer le volume liquidien « nettoyé » au niveau de l'espace aérien lavé, par l'équation suivante :

$$\text{Clairance liquidienne distale (\%.heure}^{-1}\text{)} = 2(1-C_i/C_f)$$

où C_i est la concentration en protéines à T0 et C_f la concentration en protéines à T30.

II.A.4.3 Perméabilité capillaro-alvéolaire

La perméabilité capillaro-alvéolaire aux macromolécules était estimée à la fin de l'expérimentation lors de la même procédure de LBA permettant la mesure de l'AFC, selon une technique précédemment décrite par notre équipe ^[18]. Brièvement, du dextran marqué (fluorescein isothiocyanate labeled dextran, FITC-D70) (Sigma ; Saint Quentin Fallavier, France), un indicateur macromoléculaire fluorescent de la même taille que l'albumine, était ajouté dans le liquide de perfusion 30 minutes avant le LBA (temps d'équilibration entre le liquide de perfusion et l'alvéole). Les concentrations de FITC-D70 étaient ensuite mesurées au moyen d'un spectrophotomètre (NanoDrop ND-3300 par Labtech ; Palaiseau, France) simultanément au niveau du liquide de perfusion et dans la liquide alvéolaire, échantillonnés 5 minutes après l'instillation du liquide de LBA. Le coefficient de transport K du FITC-D70 du liquide de perfusion à l'alvéole, constitue l'expression de la perméabilité de la membrane capillaro-alvéolaire. La formule suivante a été utilisée pour calculer ce coefficient de perméabilité :

$$K (\text{minute}^{-1}) = ([\text{FITC-D70}] \text{ du LBA} / [\text{FITC-D70}] \text{ du liquide de perfusion}) / 30$$

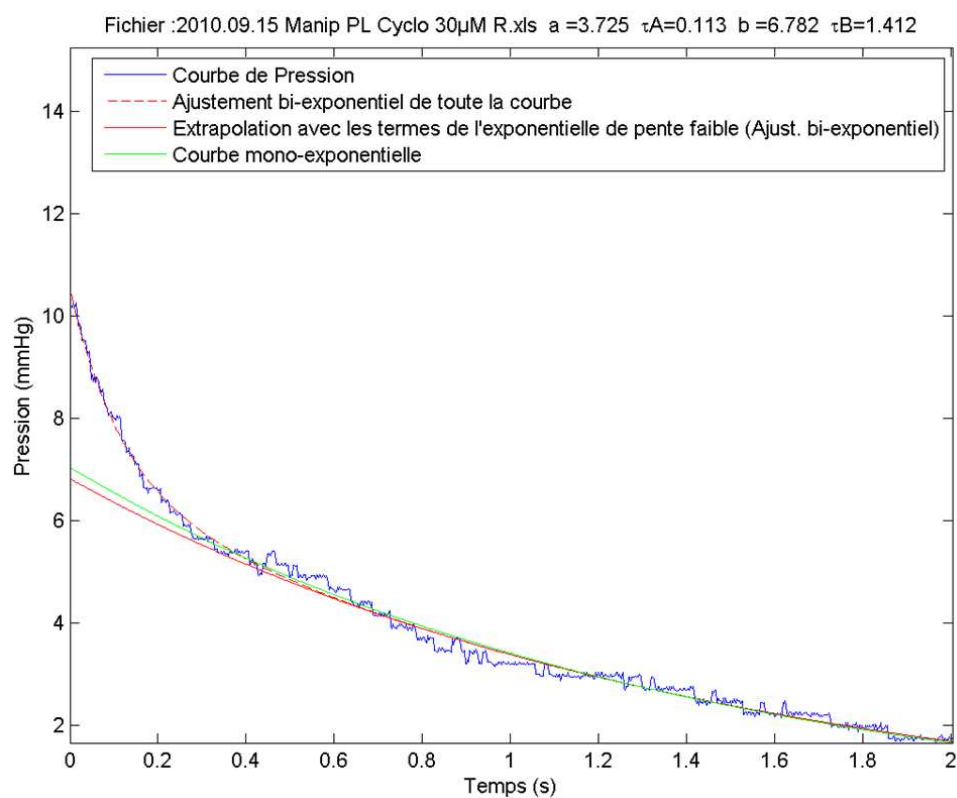
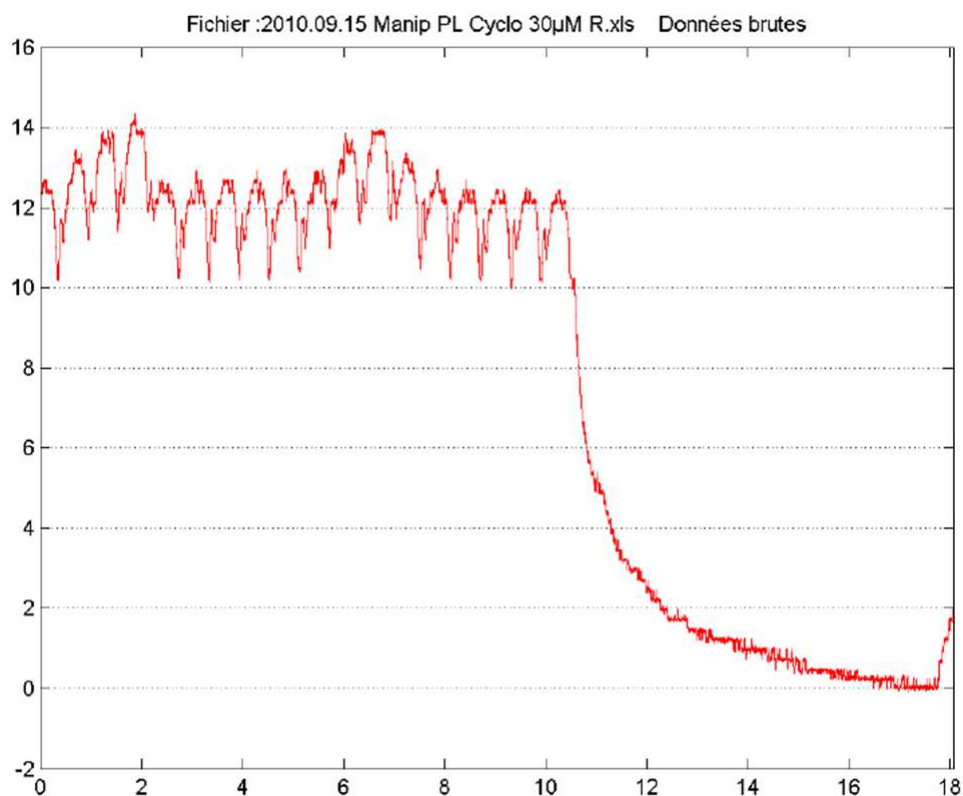
II.A.4.4 Inflammation pulmonaire

Les concentrations de deux cytokines pro-inflammatoires, TNF- α et IL-1 β ont été mesurées simultanément dans le perfusé et le LBA (Randox Investigator), après mesure des échanges gazeux et évaluation des paramètres hémodynamiques.

II.A.5 Protocole expérimental

L'étude a été menée sur quatre groupes différents de huit animaux chacun : un groupe contrôle et trois groupes recevant différentes concentrations de CsA (Novartis ; Stein, Suisse) : 1, 10 et 30 μM (CsA1, CsA10, CsA30). La CsA était administrée avec la solution de préservation, diluée dans cette dernière de telle sorte qu'on obtienne la concentration de CsA souhaitée, à la fois au moment de l'ischémie (phase de préparation animale) et au début de la reperfusion (Figure 12).

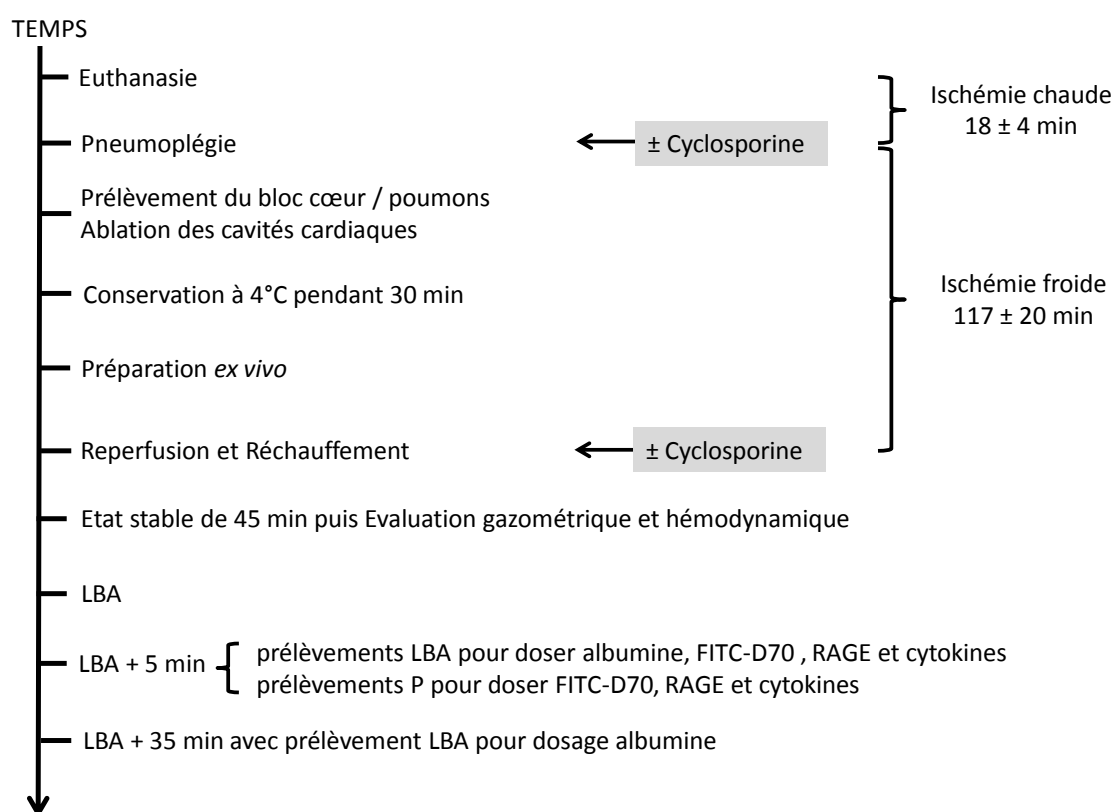
Figures 11A et 11B : Estimation de la pression capillaire à partir de la pression artérielle pulmonaire et de son profil de décroissance obtenu lors d'une brève occlusion de la pompe de circulation extracorporelle



II.A.6 Analyse statistique

Les valeurs sont exprimées dans le texte et les tableaux, sous forme de médiane et d'intervalle interquartile. En raison des petits effectifs au sein des groupes, nous avons utilisé des tests non paramétriques. Ces tests comparent les rangs de classement des variables au sein des groupes, sont indépendants de la distribution et robustes vis-à-vis des valeurs extrêmes. Pour la comparaison simultanée de plusieurs groupes (groupe témoin et groupes CsA), nous avons utilisé le test de Kruskal-Wallis. Lorsque cette comparaison globale faisait apparaître une différence statistiquement significative entre les groupes, un test de corrélation de Spearman était alors effectué afin d'évaluer un possible « effet dose » des concentrations croissantes de CsA. Un risque alpha de première espèce (valeur de $p < 0,05$) était considéré comme statistiquement significatif. Le logiciel Statview® a été utilisé.

Figure 12 : Schéma expérimental A



II.B Expérimentation B (doses ciblées & ischémie prolongée)

II.B.1 Préparation animale

L'expérimentation B a été réalisée sur 15 porcs pesant $39,1 \pm 2,9$ kg. Les porcs étaient sédatisés par l'association simultanée de 120 mg de Tiletamine et 120mg de Zolazepam en intramusculaire (Virbac ; Glattbrugg, Suisse). L'anesthésie était effectuée par 10 à 15 mg/kg de Pentobarbital IV. Les porcs étaient ventilés avec un volume courant de 7 mL/kg et une fréquence respiratoire de 20 respirations/minute. 20000 unités d'Héparine étaient administrées en IV. Une fois les porcs euthanasiés, la pneumoplégie était effectuée par la perfusion de deux litres de liquide de préservation de type Perfadex® à 4°C dans le ventricule droit, auquel on ajoutait au préalable 1 mg/L de Trinitrine. Après prélèvement du bloc cœur-poumons, les poumons étaient chirurgicalement individualisés des cavités cardiaques et séparés l'un de l'autre. Lorsque nous utilisions en premier le poumon gauche, nous clampions la trachée et nous canulions l'artère pulmonaire droite, avant de conserver le poumon droit sous des compresses imbibées de sérum physiologique, dans une chambre froide à 4°C pour une durée totale d'ischémie froide de 24 heures. Ensuite, nous canulions la bronche souche gauche et l'artère pulmonaire gauche, avant de garder le poumon gauche dans une chambre froide à 4°C pour 30 minutes, pour une durée totale d'ischémie (froide et chaude) de 2 heures. Le J0 de l'expérimentation B nous utilisions alternativement le poumon gauche ou le poumon droit.

II.B.2 Préparation pulmonaire *ex vivo*

Le système d'évaluation *ex vivo* de la fonction pulmonaire comprenait 3 L de Solution de Steen™ (Sorin Group ; Munich, Allemagne). Les autres éléments de la préparation pulmonaire étaient identiques à l'expérimentation A.

II.B.3 Phase de réchauffement

Durant la phase de réchauffement, le débit de CEC était progressivement augmenté jusqu'à $35 \text{ mL/kg/min} \times A/(A+B)$ où 35 mL/kg/min est la moitié du débit cardiaque moyen d'un porc de 40 kg, A est le poids du poumon évalué et B le poids du poumon controlatéral. Le temps moyen d'ischémie chaude était de 17 ± 2 min et le temps moyen d'ischémie froide, de 111 ± 9 min pour le premier poumon et de 23 heures et 50 ± 10 min pour le second.

II.B.4 Phase d'évaluation

Durant la phase d'évaluation, la plupart des paramètres mesurés correspondaient à ceux de l'expérimentation A, exceptés les paramètres relatifs à l'inflammation pulmonaire.

II.B.4.1 Paramètres hémodynamiques

Voir expérimentation A.

II.B.4.2 Fonction épithéliale pulmonaire

Voir expérimentation A.

II.B.4.3 Perméabilité capillaro-alvéolaire

Voir expérimentation A.

II.B.4.4 Inflammation pulmonaire

Les concentrations de trois cytokines pro-inflammatoires, TNF- α , IL-1 β , IL-6, et d'une cytokine anti-inflammatoire IL-10 ont été mesurées dans le LBA (Luminex), après mesure des échanges gazeux et évaluation des paramètres hémodynamiques.

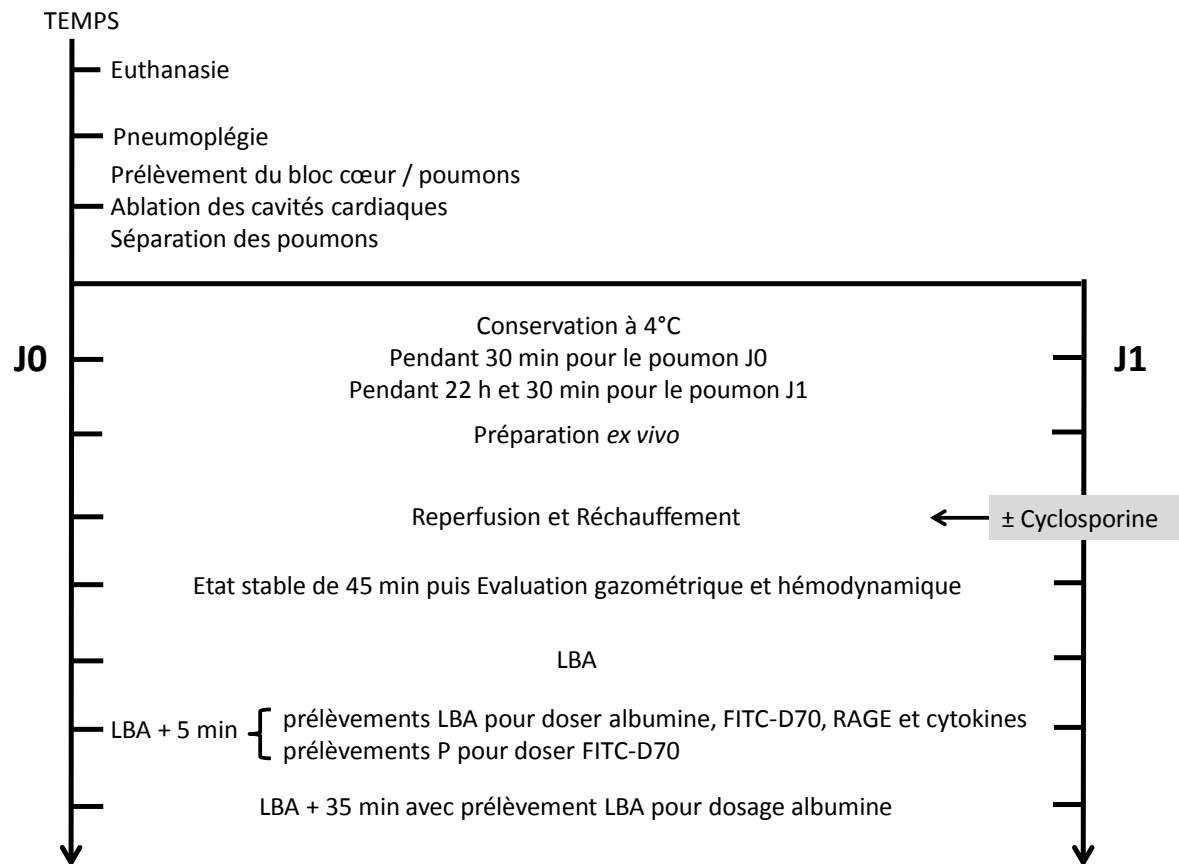
II.B.5 Protocole expérimental

L'étude a été menée sur trois groupes différents de cinq animaux chacun : un groupe contrôle et deux groupes pour lesquels le poumon dont la durée totale d'ischémie était de 24 heures, recevait soit 1 μ M soit 5 μ M CsA dès la phase initiale de la reperfusion (la CsA étant préalablement diluée dans la solution de préservation pour obtenir la concentration souhaitée) (Figure 13).

II.B.6 Analyse statistique

Les mêmes outils que ceux développés dans l'expérimentation A ont été utilisés. Pour tester la différence de résultats entre poumons appariés (*i.e.* paires de poumons prélevés au même moment mais reperfusés après des périodes d'ischémie différentes), nous avons utilisé le test de Wilcoxon.

Figure 13 : Schéma expérimental B



RESULTATS

III- Résultats

III.A Expérimentation A (détermination de doses)

III.A.1 Echanges gazeux

Le rapport PO_2/FiO_2 était significativement amélioré par des doses croissantes de CsA (Figure 14) alors que le gradient de CO_2 entre le perfusé et l'air exhalé ($PCO_2 - E_TCO_2$) tendait à décroître avec la CsA (non significatif) (Tableau 2).

III.A.2 Hémodynamique

La PAP, la Pcap et les RVP étaient augmentées par l'administration de CsA, avec un effet dose (Figures 15, 16 et 17). L'augmentation des RVP semblait intéresser préférentiellement la part veineuse du lit vasculaire pulmonaire, pour de fortes doses de CsA (30 μM) (Tableau 2).

III.A.3 Fonction épithéliale alvéolaire

Des doses faibles (1 μM) et modérées (10 μM) de CsA tendaient à prévenir les lésions épithéliales alvéolaires (non significatif) estimées par la concentration alvéolaire en RAGE et la valeur de l'AFC (Tableau 2).

III.A.4 Perméabilité capillaro-alvéolaire

Les poumons traités par des doses élevées de CsA (30 μM) avaient un coefficient K de perméabilité aux macromolécules plus élevé (Tableau 2).

III.A.5 Inflammation pulmonaire

Les poumons traités par des doses élevées de CsA (30 μM) présentaient des concentrations plus élevées en cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α dans le LBA et le perfusé, en comparaison aux autres groupes (Figures 18 et 19, Tableau 2).

Figures 14 à 19 : La médiane est symbolisée par la ligne horizontale à l'intérieur des boîtes à moustaches. Les valeurs comprises entre le 25^e et le 75^e percentile sont incluses dans les boîtes. Les moustaches représentent les valeurs du 10^e et 90^e percentile. Les valeurs individuelles sont représentées par des points.

Figure 14 : Rapport PO_2/FiO_2

Comparaison globale par le test de Kruskal-Wallis $p = 0,017$

Effet dose par le test de corrélation de Spearman $p = 0,008$

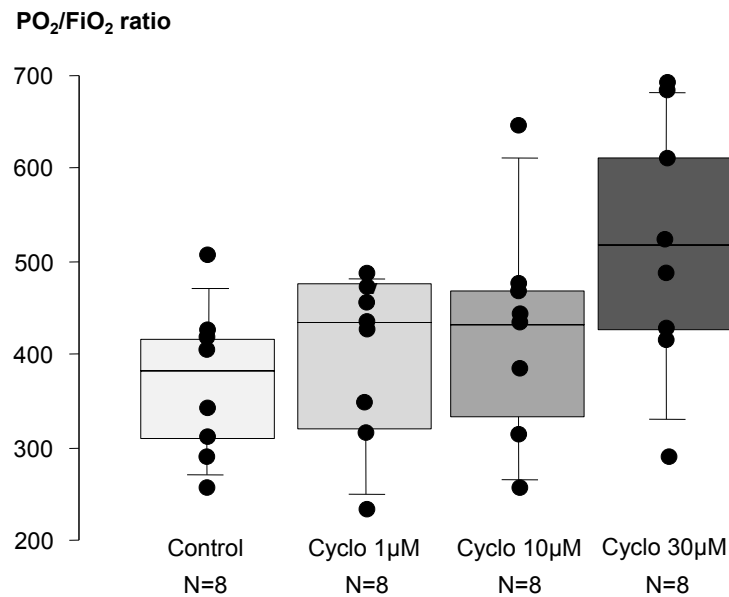


Figure 15 : Pression artérielle pulmonaire

Comparaison globale par le test de Kruskal-Wallis $p = 0,010$

Effet dose par le test de corrélation de Spearman $p = 0,001$

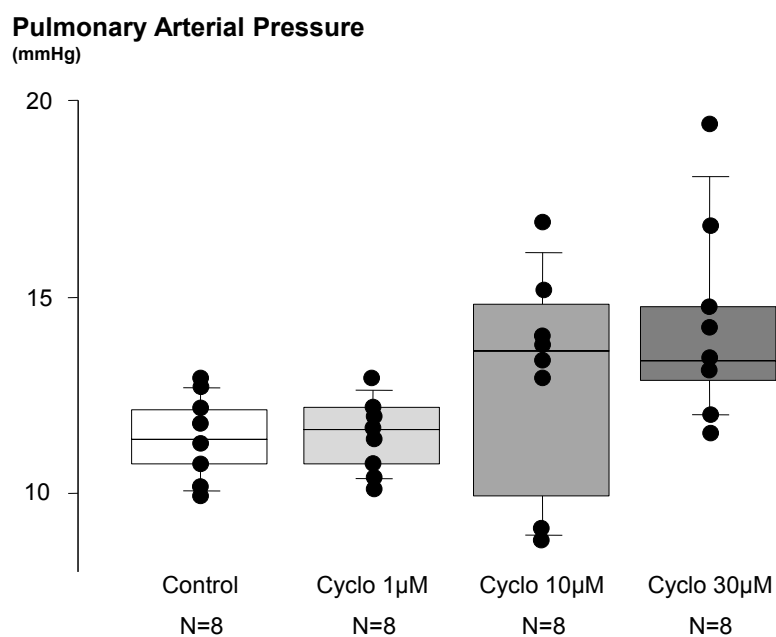


Figure 16 : Pression capillaire

Comparaison globale par le test de Kruskal-Wallis $p = 0,005$

Effet dose par le test de corrélation de Spearman $p < 0,001$

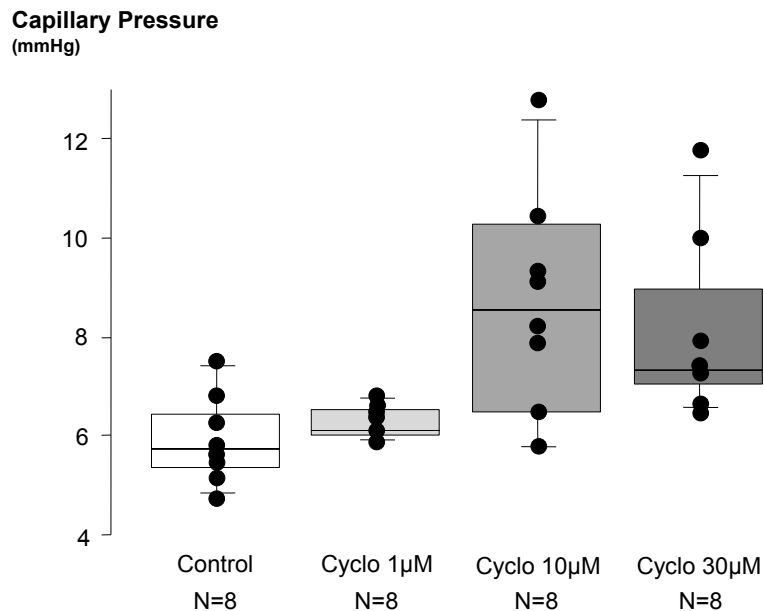


Figure 17 : Résistances vasculaires pulmonaires totales

Comparaison globale par le test de Kruskal-Wallis $p = 0,013$

Effet dose par le test de corrélation de Spearman $p = 0,001$

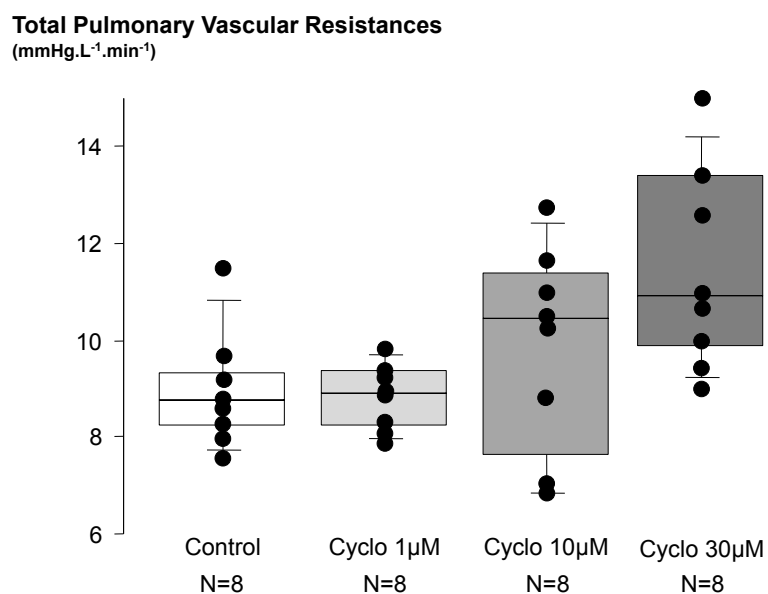


Figure 18 : Interleukine-1 β dans le lavage broncho-alvéolaire

Comparaison globale par le test de Kruskal-Wallis $p = 0,028$

Effet dose par le test de corrélation de Spearman $p = 0,020$

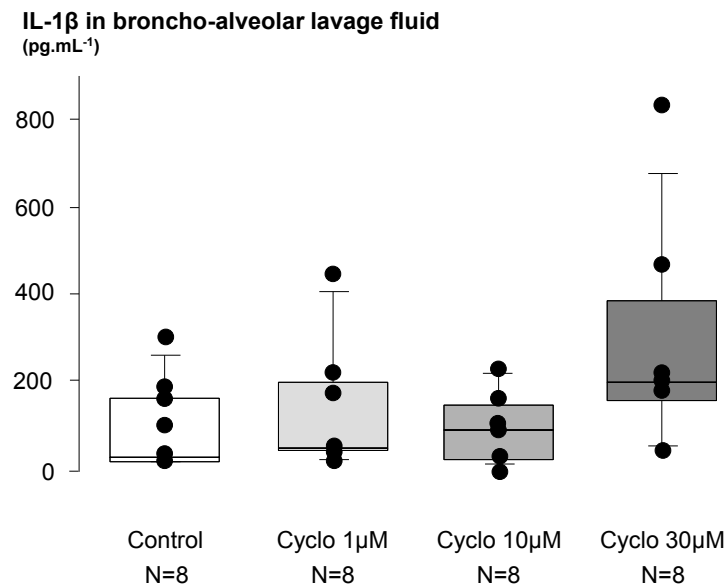


Figure 19 : Interleukine-1 β dans le perfusat

Comparaison globale par le test de Kruskal-Wallis $p = 0,046$

Effet dose par le test de corrélation de Spearman $p = 0,100$

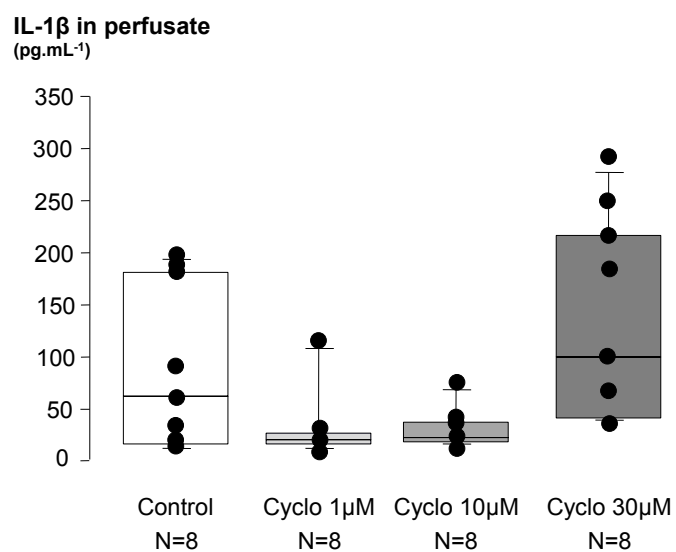


Tableau 2 : Paramètres fonctionnels pulmonaires après ischémie-reperfusion

	Control N=8	CsA 1μM N=8	CsA 10μM N=8	CsA 30μM N=8	p valeur
RVPa (mmHg.L⁻¹.min⁻¹)	4,3 [3,9 ; 4,6]	4,5 [3,8 ; 4,7]	3,3 [2,9 ; 4,3]	4,7 [4,3 ; 5,8]	0,162
RVPv (mmHg.L⁻¹.min⁻¹)	4,4 [4,2 ; 4,8]	4,7 [4,6 ; 5,0]	6,6 [5,3 ; 7,7]	6,7 [5,6 ; 7,4]	0,005
RAGE dans LBA (pg.mL⁻¹)	1,6 [1,4 ; 10,8]	1,9 [1,7 ; 2,1]	1,6 [1,5 ; 2,4]	1,6 [1,5 ; 2,3]	0,937
RAGE dans P (pg.mL⁻¹)	0,0 [0,0 ; 1,3]	1,5 [0,7 ; 1,7]	1,4 [1,4 ; 1,5]	1,3 [0,0 ; 1,5]	0,286
AFC (% du volume initial.h⁻¹)	9,4 [0,0 ; 44,3]	56,4 [16,1 ; 59,0]	59,2 [37,4 ; 70,0]	14,8 [0,0 ; 34,8]	0,407
K (10⁻³.min⁻¹)	5 [1 ; 7]	3 [1 ; 8]	3 [1 ; 5]	8 [3 ; 16]	0,286
TNF-α dans LBA (pg.mL⁻¹)	4,0 [0,0 ; 15,0]	0,0 [0,0 ; 5,0]	2,0 [0,0 ; 8,5]	7,0 [5,5 ; 38,8]	0,195
TNF-α dans P (pg.mL⁻¹)	15,0 [5,0 ; 28,3]	9,0 [7,0 ; 24,5]	12,0 [7,5 ; 17,5]	24,0 [18,5 ; 36,8]	0,190

Les valeurs sont les médianes et intervalles interquartiles. Les *p* valeurs ont été calculées avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

AFC = alveolar fluid clearance (clairance liquidienne alvéolaire), K = coefficient de transport du fluorescein isothiocyanate labeled dextran (FITC-D70), LBA = lavage broncho-alvéolaire, P = perfusat, RAGE = receptor for advanced glycation endproducts, RVP = résistances vasculaires pulmonaires, a = artériolaires, v = veineuses, TNF = tumor necrosis factor.

III.B Expérimentation B (doses ciblées & ischémie prolongée)

III.B.1 Sévérité de l'ischémie à J1

L'analyse comparée des paramètres fonctionnels pulmonaires après I/R J0 *versus* J1, portait sur la totalité des poumons, trois groupes confondus : contrôle, CsA1 et CsA5. Elle mettait en évidence une réduction significative du rapport PO_2/FiO_2 et de l'AFC et une augmentation significative du coefficient K de perméabilité aux macromolécules (Figures 20, 21 et 22). Les PAP, Pcap et RVP n'étaient pas modifiées de façon significative.

III.B.2 Effets pharmacologiques

La baisse du rapport PO_2/FiO_2 entre les poumons J0 et les poumons J1 se réduisait de façon dose dépendante avec la CsA (Figure 23). La concentration en RAGE du LBA à J1 comparée à J0 augmentait dans le groupe contrôle alors qu'elle diminuait dans les groupes CsA (Figure 24). Par ailleurs la CsA ne modifiait pas les PAP, Pcap et RVP, ni la perméabilité capillaro-alvéolaire ou les paramètres d'inflammation pulmonaire (Tableaux 3A et 3B).

Figures 20, 21 et 22 : la médiane est symbolisée par la ligne horizontale à l'intérieur des boîtes à moustaches. Les valeurs comprises entre le 25^e et le 75^e percentile sont incluses dans les boîtes. Les moustaches représentent les valeurs du 10^e et 90^e percentile. Les valeurs individuelles sont représentées par des points.

Figure 20 : Rapport PO_2/FiO_2 J0 versus J1

Comparaison par le test de Wilcoxon pour mesures appariées

$p = 0,008$

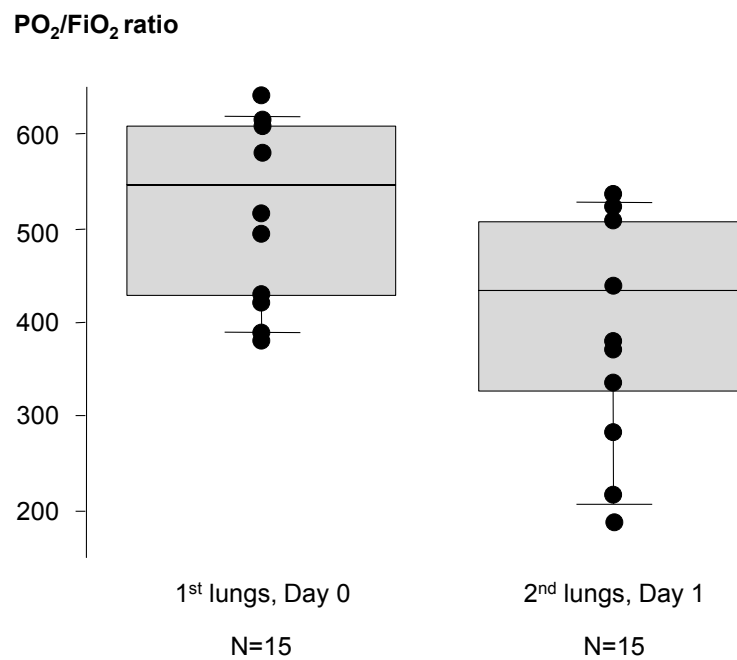


Figure 21 : Clairance liquidienne alvéolaire J0 versus J1

Comparaison par le test de Wilcoxon pour mesures appariées

$p = 0,013$

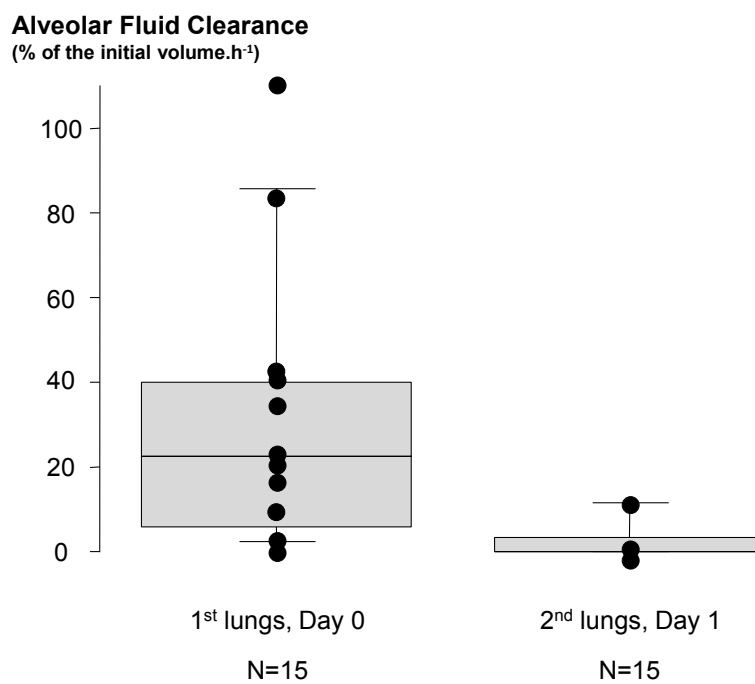
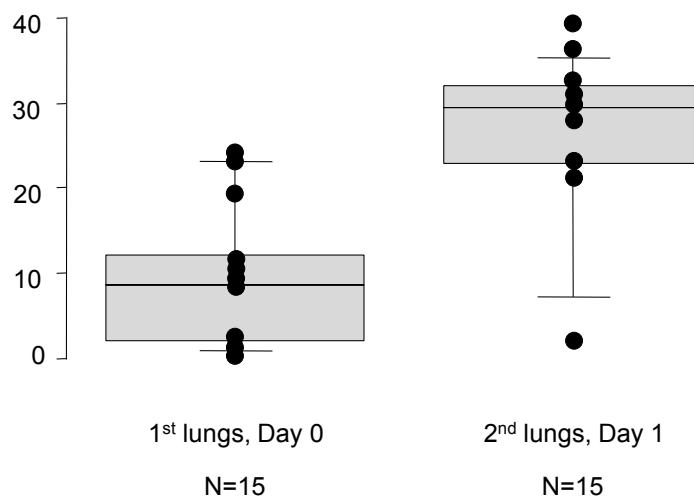


Figure 22 : Coefficient de transport K du FITC-D70 J0 versus J1

Comparaison par le test de Wilcoxon pour mesures appariées

$p = 0,003$

**FITC-D70 transport rate coefficient (K)
from the perfusion fluid to alveoli
($10^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$)**



Figures 23 et 24 : Les histogrammes représentent la moyenne des variations.

Figure 23 : Evolution du rapport PO_2/FiO_2 entre J0 et J1

Comparaison globale par le test de Kruskal-Wallis $p = 0,031$

Effet dose par le test de corrélation de Spearman $p = 0,048$

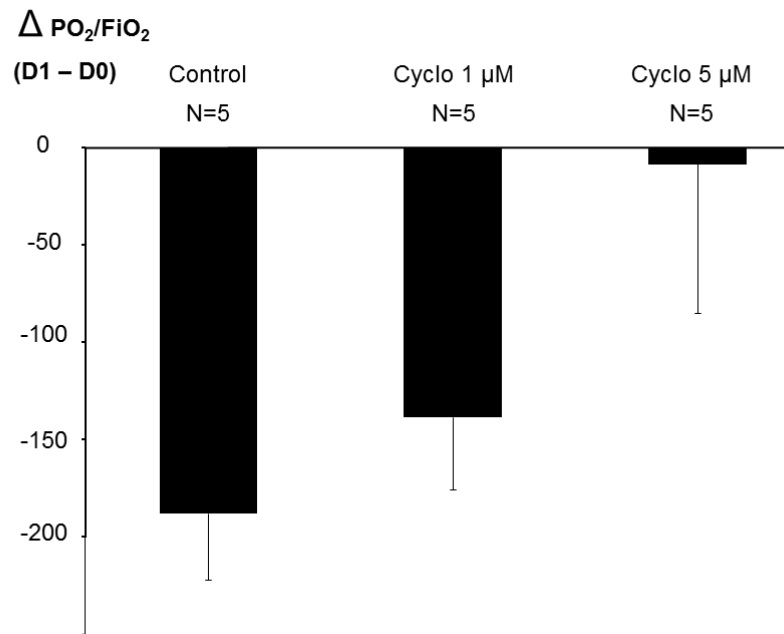
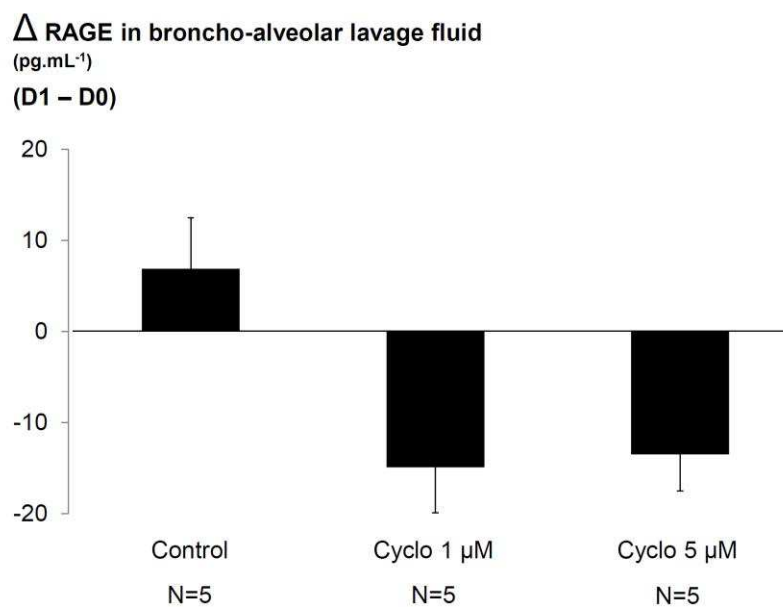


Figure 24 : Evolution du RAGE dans le lavage broncho-alvéolaire entre J0 et J1

Comparaison globale par le test de Kruskal-Wallis $p = 0,055$

Effet dose par le test de corrélation de Spearman $p = 0,190$



Tableaux 3A et 3B : Evolution des paramètres fonctionnels pulmonaires après ischémie-reperfusion entre J0 et J1

	Control J1 - J0 N=5	CsA 1μM J1 - J0 N=5	CsA 5μM J1 - J0 N=5	p valeur
PCO₂ - E_TCO₂ (mmHg)	1 [-1 ; 2]	4 [2 ; 7]	-1 [-4 ; 4]	0,410
PAP (mmHg)	2,4 [-2,7 ; 7,1]	1,8 [-4,6 ; 4,7]	-1,0 [-1,5 ; -0,7]	0,736
Pcap (mmHg)	2,7 [-1,6 ; 7,0]	-1,7 [-3,3 ; 1,7]	-2,0 [-4,9 ; 0,8]	0,334
RVP (mmHg.L⁻¹.min⁻¹)	-1,4 [-5,2 ; 0,5]	1,9 [-2,2 ; 16,6]	-5,1 [-9,9 ; -0,1]	0,485
AFC (% du volume initial.h⁻¹)	-32 [-60 ; -22]	-18 [-35 ; -11]	-14 [-26 ; -5]	0,452
K (10⁻³.min⁻¹)	28 [18 ; 35]	19 [14 ; 25]	17 [12 ; 21]	0,441

Les valeurs sont les médianes et intervalles interquartiles. Les *p* valeurs ont été calculées avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

AFC = alveolar fluid clearance (clairance liquidienne alvéolaire), E_TCO₂ = pression partielle en dioxyde de carbone dans l'air expiré, K = coefficient de transport du fluorescein isothiocyanate labeled dextran (FITC-D70), PAP = pression artérielle pulmonaire, Pcap = pression capillaire, PCO₂ = pression partielle en dioxyde de carbone, RVP = résistances vasculaires pulmonaires.

	Control J1 - J0 N=5	CsA 1µM J1 - J0 N=5	CsA 5µM J1 - J0 N=5	<i>p</i> valeur
IL-1β dans LBA (pg.mL⁻¹)	0,46 [-0,41 ; 0,84]	-0,73 [-0,74 ; 1,14]	0,88 [-0,67 ; 2,27]	0,897
TNF-α dans LBA (pg.mL⁻¹)	-0,08 [-0,46 ; 0,42]	-0,48 [-0,68 ; -0,46]	0,15 [-0,76 ; 0,34]	0,725
IL-6 dans LBA (pg.mL⁻¹)	0,28 [0,17 ; 0,44]	-0,01 [-0,02 ; 0,39]	0,12 [0,06 ; 0,19]	0,741
IL-10 dans LBA (pg.mL⁻¹)	0,00 [-0,01 ; 0,00]	0,00 [0,00 ; 0,00]	-0,02 [-0,05 ; 0,00]	0,398

Les valeurs sont les médianes et intervalles interquartiles. Les *p* valeurs ont été calculées avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

IL = interleukine, LBA = lavage broncho-alvéolaire, TNF = tumor necrosis factor.

DISCUSSION

IV- Discussion

Ce travail évalue pour la première fois les effets de la CsA sur des poumons porcins isolés et perfusés *ex vivo*. L'effet de la CsA n'avait jusqu'alors jamais été étudié sur un modèle pulmonaire de gros mammifère. Nos résultats montrent un effet-dose de la CsA sur les échanges gazeux et sur l'hémodynamique pulmonaire, avec possiblement une aggravation des lésions d'I/R pour des doses élevées de CsA (30 μ M). Ce travail constitue une étape essentielle d'une démarche qui viserait à proposer la CsA chez l'homme, avec pour objectif de réduire les lésions d'I/R, premières responsables de la défaillance primaire du greffon ^[141].

La technique d'EVLP que nous avons utilisée est devenue en l'espace d'une décennie, la technique de référence d'évaluation des greffons pulmonaires. Son intérêt a déjà été démontré sur préparations pulmonaires animales, notamment porcines ^[157] et sur poumons humains ^[35]. Elle peut être assimilée à un « banc d'essai idéal » des fonctions pulmonaires et autorise notamment l'évaluation de nouvelles thérapies supposées limiter les lésions d'I/R.

Les paramètres physiologiques que nous avons mesurés sont pour certains communément étudiés dans la littérature : il s'agit des capacités d'échanges gazeux, des pressions artérielles pulmonaires et des résistances vasculaires pulmonaires totales. Nous nous sommes aussi intéressés à d'autres paramètres fonctionnels pulmonaires plus spécifiques, tels que les pressions capillaires, les résistances vasculaires longitudinales, la clairance liquidienne alvéolaire, le RAGE, la perméabilité capillaro-alvéolaire et certaines cytokines pro- et anti-inflammatoires.

IV.1 Design expérimental

Plusieurs faits et hypothèses issus de l'expérimentation A nous ont conduit à faire évoluer le design expérimental dans l'expérimentation B. Premièrement, nous avons allongé la période d'ischémie pour majorer les lésions d'I/R dans l'optique de mettre en relief les effets de la CsA. Deuxièmement, nous avons souhaité évaluer chaque poumon à son controlatéral, afin d'augmenter la pertinence de nos résultats comparatifs. Ce choix méthodologique nous a conduit dans l'expérimentation B à n'utiliser la CsA qu'au moment de la reperfusion. Troisièmement, nous avons réduit le débit de la circulation extracorporelle de moitié par rapport à la valeur théorique moyenne, à la faveur de publications récentes montrant un bénéfice à utiliser de faibles débits de CEC, notamment lors d'ischémies

prolongées^[34,35]. Quatrièmement, nous nous sommes affranchis de l'utilisation d'isoflurane avant euthanasie de l'animal (voir limites ci-dessous).

IV.2 Limites

Une des limites possibles de l'expérimentation A pourrait être la courte période d'ischémie (135 ± 21 min) à laquelle les poumons ont été exposés. En effet, une période d'ischémie plus longue aurait provoqué des lésions I/R plus sévères et aurait peut-être permis de majorer les effets positifs de la CsA. Néanmoins, la durée de l'ischémie dans l'expérimentation A était similaire à plusieurs autres études qui se sont intéressées aux effets de la CsA au niveau pulmonaire^[45,102,125].

Un autre biais possible pourrait être l'induction de l'anesthésie par le gaz halogéné isoflurane dans l'expérimentation A. En effet, plusieurs travaux montrent que les gaz halogénés inhibent le PTPm et pourraient donc interférer avec l'action préventive de la CsA dans les lésions d'I/R^[28,88,132,144]. Cet effet préventif semble clair avec le sévoflurane mais les études réalisées avec l'isoflurane ont des résultats plus contrastés^[88,144]. Aussi, la plupart des études qui se sont intéressées aux gaz halogénés dans la prévention des lésions d'I/R, utilisaient ces gaz au moment de la reperfusion. Dans l'expérimentation A, nous n'avons utilisé l'isoflurane qu'à l'induction de l'anesthésie, avant euthanasie de l'animal. Sachant que la demi-vie de l'isoflurane est de quelques minutes et que la reperfusion intervenait dans l'expérimentation A après une période supérieure à deux heures d'ischémie, nous avons fait l'hypothèse qu'il n'existait pratiquement plus d'isoflurane au sein des alvéoles au moment de la reperfusion. Par ailleurs, l'isoflurane ayant été utilisé dans chaque groupe de la même façon et avec les mêmes posologies, cela limite les interférences d'interprétations de nos résultats.

IV.3 Choix de la molécule et des posologies

Nous avons fait l'hypothèse que les lésions d'I/R étaient principalement liées à la « mort » mitochondriale, conséquence de l'ouverture du PTPm en situation de stress. Or l'inhibition de l'ouverture du PTPm constitue la principale voie d'action de la CsA qui explique son effet dans l'I/R. Par ailleurs, de nombreux modèles animaux *in vivo* et *in vitro* ont montré l'intérêt de la CsA dans la prévention des lésions d'I/R, lorsqu'elle est administrée avant l'ischémie ou au moment de la reperfusion^[45,64,66,102,125,164,176].

Les différentes concentrations de CsA que nous avons testé dans l'expérimentation A ont été choisies à la lumière d'études *in vitro* où la concentration moyenne de CsA nécessaire pour

induire des effets positifs observables sur baignade cellulaire, était de 1 μM ^[45,67,125], et d'études *in vivo* rapportant des concentrations sanguines de CsA comprises entre 1 et 5 μM chez l'homme et jusqu'à 90 μM chez le rat ^[20,106,168]. Les doses de CsA de l'expérimentation B ont été choisies à la lumière des résultats de l'expérimentation A. En effet, dans l'expérimentation A, les posologies de 1 à 10 μM avaient un effet bénéfique sur les échanges gazeux alors qu'un effet vasculaire délétère apparaissaient dès 10 μM . La concentration de 30 μM était clairement responsable d'une élévation des résistances vasculaires pulmonaires et des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β . Ainsi, dans l'expérimentation B, nous avons choisi d'évaluer les concentrations de CsA de 1 et 5 μM et n'avons pas évalué des doses plus élevées.

IV.4 Effets de la CsA sur l'hémodynamique

Dans l'expérimentation A, la CsA aux posologies de 10 et surtout 30 μM était délétère sur les pressions et les résistances, avec un effet dose. Bien que des administrations quotidiennes de CsA sur trois semaines semblent prévenir l'hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie chronique ^[100], plusieurs études ont mis évidence que la CsA pouvait être responsable d'hypertension chez l'homme après transplantation pulmonaire, cardiaque, rénale ou hépatique ^[47,121,152,173]. Deux stades ont été décrits : l'hypertension aiguë lors de l'initiation du traitement par CsA et l'hypertension chronique après administration de CsA sur le long terme. Au niveau des muscles lisses des vaisseaux, la CsA se lie la CypA et peut ainsi directement affecter la régulation de la pression artérielle, notamment en réduisant la production de monoxyde d'azote par inhibition de la NO synthase ^[150]. La CsA réduit par ailleurs la production des vasodilatateurs PGE₂ et prostacycline, en même temps qu'elle stimule la production de l'endothéline, puissant vasoconstricteur. Cela peut expliquer l'augmentation des PAP, Pcap et résistances vasculaires pulmonaires (RVP) que nous avons observée sur les poumons qui recevaient des doses élevées de CsA (10 et 30 μM). Aussi, nous avons montré qu'il existait avec la CsA, une augmentation plus importante des RVP veineuses *versus* artériolaires. Cette augmentation des résistances post-capillaires pourrait augmenter la fuite liquidienne au niveau des capillaires les plus lésés par l'I/R ^[18]. Cela pourrait expliquer la majoration du coefficient K de perméabilité alvéolo-capillaire, constatée dans l'expérimentation A avec 30 μM de CsA. Notons par ailleurs que la PEEP appliquée aux poumons participe à l'élévation de leurs RVP ^[97]. La PEEP étant identique dans chacun des groupes des deux expérimentations, les variations de RVP constatées dans

l'expérimentation A ne sont probablement pas liées à la PEEP mais plus vraisemblablement à la CsA. Dans l'expérimentation B, l'utilisation de faibles concentrations de CsA (1 et 5 μM) avait pour objectif d'éviter les effets hémodynamiques constatés à des doses plus élevées dans l'expérimentation A. L'absence d'effet vasculaire délétère constaté pour la CsA aux concentrations de 1 et 5 μM , constitue un argument supplémentaire en faveur du choix de ces posologies.

IV.5 Effets de la CsA sur les échanges gazeux

La CsA augmente le rapport PO_2/FiO_2 et diminue le gradient de CO_2 de façon dose dépendante. Une telle amélioration des échanges gazeux pourrait s'expliquer en partie par l'augmentation de la vasoconstriction pulmonaire hypoxique renforcée par la CsA. En effet, la vasoconstriction est un événement commun de la lésion d'I/R pulmonaire ^[40]. Elle est responsable de la redistribution du flux sanguin pulmonaire des zones lésées vers les zones saines. Plusieurs publications ont souligné l'importance de la vasoconstriction hypoxique dans le maintien de l'oxygénation au cours de lésions pulmonaires aiguës. Cette réactivité vasculaire permet de réduire l'espace mort alvéolaire et améliore l'oxygénation ^[17,163]. Néanmoins, dans l'expérimentation B, la CsA à 1 et 5 μM augmentait nettement le rapport PO_2/FiO_2 sans modifier les pressions artérielles ni les résistances vasculaires de façon significative. Ce constat plaide pour un effet propre de la CsA dans l'amélioration des échanges gazeux, indépendant de son action vasoconstrictrice.

IV.6 Effets de la CsA sur la fonction épithéliale pulmonaire et la perméabilité capillaro-alvéolaire

Certains travaux ont suggéré que la CsA favoriserait l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire et améliorerait la fonction épithéliale pulmonaire, en diminuant la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et la perméabilité capillaro-alvéolaire ^[45,102,125]. Ces événements participeraient à la réduction de la formation d'œdème et à l'amélioration des échanges gazeux à travers la membrane alvéolo-capillaire. En accord avec ces hypothèses, nous avons constaté dans l'expérimentation A qu'il existait une tendance à l'amélioration de la fonction épithéliale alvéolaire avec des posologies de CsA de 1 et 10 μM . Dans ces groupes, la CsA semblait augmenter l'AFC et réduire la concentration en RAGE du LBA (non significatif), ces deux paramètres reflétant le statut pulmonaire après I/R ^[19]. Cependant,

pour les poumons qui recevaient 30 μM de CsA, la concentration des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α et la perméabilité capillaro-alvéolaire étaient augmentées et l'AFC dégradée, alors que le rapport PO_2/FiO_2 restait élevé. Nous avons donc fait l'hypothèse que la CsA aux posologies élevées avait un effet vasoconstricteur pulmonaire prééminent, alors qu'à de faibles concentrations, les effets anti-inflammatoires et anti-apoptotiques de la CsA pourraient être au premier plan. Les effets hémodynamiques précédemment décrits pourraient expliquer l'altération de la fonction épithéliale pulmonaire et la dégradation de la barrière capillaro-alvéolaire, coexistant avec l'amélioration des échanges gazeux que nous avons observé avec les poumons recevant des doses élevées de CsA. Dans l'expérimentation B, l'utilisation de faibles doses appliquées à une lésion plus sévère sur des poumons appariés, a permis de montrer l'effet bénéfique de la CsA sur la fonction épithéliale. La CsA permettait de réduire la concentration en RAGE, marqueur de plus en plus reconnu pour quantifier la lésion pulmonaire sur des modèles expérimentaux ^[19,159] et en clinique ^[21,84].

IV.7 Effets de la CsA sur l'inflammation pulmonaire

Dans l'expérimentation A, la production de TNF- α et d'IL-1 β était significativement augmentée avec des doses élevées de CsA. En effet, pour les poumons qui recevaient 30 μM de CsA, la concentration des cytokines et la perméabilité pulmonaire étaient augmentées et l'AFC dégradée. A ces fortes posologies, l'effet vasoconstricteur pulmonaire et l'augmentation des RVPv étaient particulièrement nets. Ces phénomènes hémodynamiques pourraient augmenter la fuite capillaire, la formation d'œdème et aggraver les lésions d'I/R. Aussi, la CsA favorise la production de TNF- α et d'IL-1 β *via* certains récepteurs de type toll ^[108]. Ces cytokines stimulent la production de métalloprotéases qui favorisent à leur tour la production de ces mêmes cytokines. Cela permettrait d'expliquer pourquoi la CsA30, bien qu'inhibant certaines métalloprotéases, ne diminue pas la production de ces cytokines mais l'augmente. Dans l'expérimentation B, nous avons évité cette augmentation délétère de cytokines, même à la posologie de 5 μM . Cette absence d'effet délétère sur l'hémodynamique pulmonaire et sur les marqueurs de l'inflammation renforce l'intérêt des effets positifs observés sur les échanges gazeux et sur la fonction épithéliale.

CONCLUSION

V- Conclusion

La Cyclosporine A est devenue célèbre pour son action immunosuppressive et plus récemment, est apparue intéressante pour limiter les lésions d'ischémie-reperfusion. Afin d'évaluer son action sur les poumons d'un grand mammifère, nous avons choisi la technique novatrice d'évaluation pulmonaire *ex vivo*. Nos expérimentations ont été menées sur des poumons porcins qui subissaient différentes périodes d'ischémie et recevaient diverses doses de CsA. Nous avons mis en évidence une amélioration des échanges gazeux et une réduction du marqueur de lésion épithéliale pulmonaire RAGE, avec CsA. Les effets hémodynamiques péjoratifs et l'élévation des cytokines pro-inflammatoires ont été constatés avec des concentrations élevées de CsA. Des concentrations plus faibles de CsA n'induisaient pas ces effets mais conservaient un net bénéfice sur les échanges gazeux.

Il apparaît à l'issue de ce travail que l'utilisation de la CsA permettrait de réduire les lésions d'ischémie-reperfusion pulmonaires, premières responsables de la défaillance primaire du greffon. A l'avenir il serait intéressant d'évaluer grâce au même modèle, les effets de molécules qui ciblent le pore de transition de perméabilité mitochondrial, avant d'envisager une application humaine.

LISTE DES FIGURES

VI- Liste des figures

Figure 1 : Schéma du circuit d'EVLP (d'après Cypel et al ; 2011 ; NEJM)

Figure 2 : Schéma des zones pulmonaires de West. Impact de la gravité sur la distribution des flux (d'après Sanchez et al ; 2012 ; J Heart Lung Transplant)

Figure 3 : Canule en forme d'entonnoir visant à recueillir le sang veineux pulmonaire issu de l'oreillette gauche

Figure 4 : Schéma du modèle bicompartimental de l'espace interstitiel pulmonaire (d'après Sanchez et al ; 2012 ; J Heart Lung Transplant)

Figure 5 : Préparation d'EVLP en vue d'une transplantation chez l'homme (d'après Cypel et al ; 2011 ; NEJM)

Figure 6 : Systèmes d'EVLP actuellement commercialisés

Figure 7 : Evénements survenant chez le donneur avant le prélèvement et pouvant aggraver les lésions pulmonaires d'ischémie-reperfusion (d'après De Perrot et al ; 2003; AJRCCM)

Figure 8 : Formation d'espèces oxygénées réactives au cours de l'anoxie-réoxygénation et de l'ischémie-reperfusion pulmonaire

Figure 9 : Clairance liquidienne alvéolaire en fonction des concentrations du marqueur de lésion épithéliale RAGE dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (d'après Briot et al ; 2009 ; Chest)

Figure 10 : Effets cytoplasmiques et mitochondriaux de la Cyclosporine A

Figures 11A et 11B : Estimation de la pression capillaire à partir de la pression artérielle pulmonaire et de son profil de décroissance obtenu lors d'une brève occlusion de la pompe de circulation extracorporelle

Figure 12 : Schéma expérimental A

Figure 13 : Schéma expérimental B

Figure 14 : Rapport PO_2/FiO_2

Figure 15 : Pression artérielle pulmonaire

Figure 16 : Pression capillaire

Figure 17 : Résistances vasculaires pulmonaires totales

Figure 18 : Interleukine- 1β dans le lavage broncho-alvéolaire

Figure 19 : Interleukine- 1β dans le perfusat

Figure 20 : Rapport PO_2/FiO_2 J0 *versus* J1

Figure 21 : Clairance liquidienne alvéolaire J0 *versus* J1

Figure 22 : Coefficient de transport K du FITC-D70 J0 *versus* J1

Figure 23 : Evolution du rapport PO_2/FiO_2 entre J0 et J1

Figure 24 : Evolution du RAGE dans le lavage broncho-alvéolaire entre J0 et J1

LISTE DES TABLEAUX

VII- Liste des tableaux

Tableau 1 : Origine et fonction des cytokines mises en jeu dans les lésions d'ischémie-reperfusion au cours de la transplantation pulmonaire (d'après De Perrot et al ; 2003 ; AJRCCM)

Tableau 2 : Paramètres fonctionnels pulmonaires après ischémie-reperfusion

Tableaux 3A et 3B : Evolution des paramètres fonctionnels pulmonaires après ischémie-reperfusion entre J0 et J1

BIBLIOGRAPHIE

VIII- Bibliographie

- [1] Agence de la Biomédecine: Greffe cardio-pulmonaire et pulmonaire. Rapport médical et scientifique de l'agence de la biomédecine 2011-2012.
- [2] Abraham D, Taghavi S, Riml P, Paulus P, Hofmann M, Baumann C, Kocher A, Klepetko W, Aharinejad S. VEGF-A and -C but not -B mediate increased vascular permeability in preserved lung grafts. *Transplantation* 2002 ; 73 : 1703-6.
- [3] Aigner C, Slama A, Hötzenecker K, Scheed A, Urbanek B, Schmid W, Nierscher FJ, Lang G, Klepetko W. Clinical ex vivo lung perfusion - pushing the limits. *J Heart Lung Transplant* 2012 ; 12 : 1839-47.
- [4] Aitchison JD, Orr HE, Flecknell PA, Kirby JA, Dark JH. Functional assessment of non-heart-beating donor lungs: prediction of posttransplant function. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001 ; 20 : 187-94.
- [5] Akao M, O'Rourke B, Teshima Y, Seharaseyon J, Marban E. Mechanistically distinct steps in the mitochondrial death pathway triggered by oxidative stress in cardiac myocytes. *Circ Res* 2003 ; 92 : 186-94.
- [6] Al Mehdi AB, Shuman H, Fisher AB. Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *Am J Physiol* 1997; 272: L294-L300.
- [7] Al Mehdi AB, Zhao G, Dodia C, Tozawa K, Costa K, Muzykantov V, Ross C, Blecha F, Dinanuer M, Fisher AB. Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or K⁺. *Circ Res* 1998 ; 83 : 730-37.
- [8] Al Mehdi AB, Zhao G, Fisher AB. ATP-independent membrane depolarization with ischemia in the oxygen-ventilated isolated rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998 ; 18 : 653-61.
- [9] Ardehali A, Laks H, Levine M, Shpiner R, Ross D, Watson LD, Shvartz O, Sangwan S, Waters PF. A prospective trial of inhaled nitric ± in clinical lung transplantation. *Transplantation* 2001 ; 72 : 112-5.
- [10] Bacha EA, Herve P, Murakami S, Chapelier A, Mazmanian GM, de Montpreville V, Detruit H, Libert JM, Dartevielle P. Lasting beneficial effect of short-term inhaled nitric oxide on graft function after lung transplantation: Paris-Sud University Lung Transplantation Group. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996 ; 112 : 590-8.
- [11] Baconnier PF, Eberhard A, Grimbert FA. Theoretical analysis of occlusion techniques for measuring pulmonary capillary pressure. *J Appl Physiol* 1992 ; 73 : 1351-9.

- [12] Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkenstein JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005 ; 434 : 658-62.
- [13] Baretta R, Bitu-Moreno J, Beyersdorf, Matheis G, Francischetti I, Kreitmayer B. Distribution of lung preservation solutions in parenchyma and airways : influence of atelectasis and route of delivery. *J Heart Lung Transplant* 1995 ; 14 : 80-91.
- [14] Barros EJG, Boim MA, Ajzen H. Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 1987 ; 32 : 19-25.
- [15] Borel JF. Comparative study of *in vitro* and *in vivo* drug effects on cell mediated cytotoxicity. *Immunological Communications* 1976 ; 31 : 631-41.
- [16] Brasile L, Stubenitsky BM, Booster MH, Arenada D, Haisch C, Kootstra G. Transfection and transgene expression in a human kidney during ex vivo warm perfusion. *Transplant Proc* 2002 ; 34 : 2624.
- [17] Brimiouille S, Julien V, Gust R, Kozlowski JK, Naeije R, Schuster DP. Importance of hypoxic vasoconstriction in maintaining oxygenation during acute lung injury. *Crit Care Med* 2002 ; 30 : 874-80.
- [18] Briot R, Bayat S, Anglade D, Martiel JL, Grimbert F. Monitoring the capillary-alveolar leakage in an A.R.D.S. model using broncho-alveolar lavage. *Microcirculation* 2008 ; 15 : 237-49.
- [19] Briot R, Frank JA, Uchida T, Lee JW, Calfee CS, Matthay MA. Elevated levels of the receptor for advanced glycation end products, a marker of alveolar epithelial type I cell injury, predict impaired alveolar fluid clearance in isolated perfused human lungs. *Chest* 2009 ; 135 : 269-75.
- [20] Burckart GJ, Venkataramanan R, Ptachcinski RJ, Starzl TE, Gartner JC, Zitelli BJ, Malatack JJ, Shaw BW, Iwatsuki S, Van Thiel DH. Cyclosporine Absorption Following Orthotopic Liver Transplantation. *J Clin Pharmacol* 1986 ; 26 : 647-51.
- [21] Calfee CS, Ware LB, Eisner MD, Parsons PE, Thompson BT, Wickersham N, Matthay MA. Plasma receptor for advanced glycation end products and clinical outcomes in acute lung injury. *Thorax* 2008 ; 63 : 1083-9.
- [22] Calne RY, Rolles K, White DJG. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs : 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *The Lancet* : 1979 ; 2 : 1033-6.
- [23] Calne RY, Thiru S, White DJG. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *The Lancet* 1978 ; 2 : 1323-7.

- [24] Calne RY, White DJG, Evans DB. Cyclosporin A in cadaveric organ transplantation. *BMJ* 1981 ; 282 : 934-6.
- [25] Cassivi SD, Liu M, Boehler A, Pierre A, Tanswell AK, O'Brodovich H, Mullen JB, Slutsky AS, Keshavjee SH. Transplant immunosuppression increases and prolongs transgene expression following adenoviral-mediated transfection of rat lungs. *J Heart Lung Transplant* 2000 ; 19 : 984-94.
- [26] Chang RS, Wright K, Effros RM. Role of albumin in prevention of edema in perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* 1981 ; 50 : 1065-70.
- [27] Chapman JR, Harding NGL, Griffiths D, Morris PJ. Reversibility of cyclosporine nephrotoxicity after three months' treatment. *The Lancet* 1985 ; 1 : 128-30.
- [28] Chen HT, Yang CX, Li H, Zhang CJ, Wen XJ, Zhou J, Fan YL, Huang T, Zeng YM. Acta Cardioprotection of sevoflurane postconditioning by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 in isolated rat hearts. *Pharmacol Sin* 2008 ; 29 : 931-41.
- [29] Chetham PM, Sefton WD, Bridges JP, Stevens T, McMurtry IF. Inhaled nitric oxide pretreatment but not posttreatment attenuates ischemia-reperfusion-induced pulmonary microvascular leak. *Anesthesiology* 1997 ; 86 : 895-902.
- [30] Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts : an overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992 ; 53 : 957-78.
- [31] Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol* 2000 ; 529 : 11-21.
- [32] Cypel M, Liu M, Rubacha M, Yeung JC, Hirayama S, Anraku M, Sato M, Medin J, Davidson BL, de Perrot M, Waddell TK, Slutsky AS, Keshavjee S. Functional repair of human donor lungs by IL-10 gene therapy. *Sci Transl Med* 2009 ; 1 : 4ra9.
- [33] Cypel M, Rubacha M, Yeung J, Hirayama S, Torbicki K, Madonik M, Fischer S, Hwang D, Pierre A, Waddell TK, de Perrot M, Liu M, Keshavjee S. Normothermic ex vivo perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation. *Am J Transplant* 2009 ; 9 : 2262-9.
- [34] Cypel M, Yeung JC, Hirayama S, Rubacha M, Fischer S, Anraku M, Sato M, Harwood S, Pierre A, Waddell TK, de Perrot M, Liu M, Keshavjee S. Technique for prolonged normothermic ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant* 2008 ; 27 : 1319-25.
- [35] Cypel M, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W, Sato M, Laratta J, Azad S, Madonik M, Chow CW, Chaparro C, Hutcheon M, Singer LG, Slutsky AS, Yasufuku K, de Perrot M, Pierre AF, Waddell TK, Keshavjee S. Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med* 2011 ; 364: 1431-40.

- [36] Cypel M, Yeung JC, Machuca T, Chen M, Singer LG, Yasufuku K, de Perrot M, Pierre A, Waddell TK, Keshavjee S. Experience with the first 50 ex vivo lung perfusions in clinical transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012 ; 44 : 1200-6.
- [37] Czartolomna J, Voelkel NF, Chang SW. Permeability characteristics of isolated perfused rat lungs. *J Appl Physiol* 1991 ; 70 : 1854-60.
- [38] Daemen MA, van't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs TG, Clauss M, Vandenabeele P, Buurman WA. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest* 1999 ; 104 : 541-9.
- [39] Date H, Matsumura A, Manchester JK, Cooper JM, LowryOH, Cooper JD. Changes in alveolar oxygen and carbon dioxide concentration and oxygen consumption during lung preservation : the maintenance of aerobic metabolism during lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993 ; 105 : 492-501.
- [40] 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 ; 299 : H1283-99.
- [41] Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenabeele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 2001 ; 58 : 356-70.
- [42] Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant* 1996 ; 15 : 1258-67.
- [43] Egan TM, Haithcock JA, Nicotra WA, Koukoulis G, Inokawa H, Sevala M, Molina PL, Funkhouser WK, Mattice BJ. Ex vivo evaluation of human lungs for transplant suitability. *Ann Thorac Surg* 2006 ; 81 : 1205-13.
- [44] Evans CL, Hsu FY, Kosaka T. Utilization of blood sugar and formation of lactic acid by the lungs. *J Physiol* 1934 ; 82 : 41-61.
- [45] Farivar AS, Mackinnon-Patterson BC, Barnes AD, Mc Courtie AS, Mulligan MS. Cyclosporine modulates the response to hypoxia-reoxygenation in pulmonary artery endothelial cells. *Ann Thorac Surg* 2005 ; 79 : 1010-6.
- [46] Fehrenbach A, Wittwer T, Meyer D, von Vietinghoff S, Viehover M, Fehrenbach H, Richter J, Wahlers T. Nitroglycerin alters alveolar type II cell ultrastructure after ischemia and reperfusion. *J Heart Lung Transplant* 2001 ; 20 : 876-88.
- [47] First MR, Neylan JF, Rocher LL, Tejani A. Hypertension after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 1994 ; 4 : S30-6.

- [48] Fischer S, Cassivi SD, Xavier AM, Cardella JA, Cutz E, Edwards V, Liu M, Keshavjee S. Cell death in human lung transplantation : apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation. *Ann Surg* 2000 ; 231 : 424-31.
- [49] Fischer S, Liu M, Maclean AA, de Perrot M, Ho M, Cardella JA, Zhang XM, Bai XH, Suga M, Imai Y, et al. *In vivo* transtracheal adenovirus-mediated transfer of human interleukin-10 gene to donor lungs ameliorates ischemia-reperfusion injury and improves early postplant graft function in the rat. *Hum Gene Ther* 2001 ; 12 : 1513-26.
- [50] Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, Moreira JF, Keshavjee S. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 ; 162 : 1932-9.
- [51] Fiser SM, Kron IL, Mc Lendon Long S, Kaza AK, Kern JA, Tribble CG. Early intervention after severe oxygenation elevation improves survival following lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2001 ; 20 : 631-6.
- [52] Fiser SM, Tribble CG, Long SM, KazaAK, Kern JA, Jones DR, Robbins MK, Kron IL. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg* 2002 ; 73 : 1041-7.
- [53] Fisher AB, Dodia C. Lactate and regulation of lung glycolytic rate. *Am J Physiol* 1984 ; 246 : E426-9.
- [54] Fisher AB, Dodia C, Linask J. Perfusate composition and edema formation in isolated rat lungs. *Exp Lung Res* 1980 ; 1 : 13-21.
- [55] Fisher AB, Steinberg H, Bassett D. Energy utilization by the lung. *Am J Med* 1974 ; 57 : 437-46.
- [56] Frank JA, Briot R, Lee JW, Ishizaka A, Uchida T, Matthay MA. Physiological and biochemical markers of alveolar epithelial barrier dysfunction in perfused human lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007 ; 293 : L52-9.
- [57] Frank MM. Complement in the pathophysiology of human disease. *N Engl J Med* 1987 ; 316 : 1525-30.
- [58] Fu Z, Costello ML, Tsukimoto K, Prediletto R, Elliott AR, Mathieu-Costello O, West JB. High lung volume increases stress failure in pulmonary capillaries. *J Appl Physiol* 1992 ; 73 : 123-33.
- [59] Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, Pinsky DJ. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat Med* 2001 ; 7 : 598-604.

- [60] Furue S, Kuwabara K, Mikawa K, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Ueno M, Chikazawa Y, Ono T, Hori Y, Matsukawa A, Yoshinaga M, Obara H. Crucial role of group IIA phospholipase A(2) in oleic acid-induced acute lung injury in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ; 160 : 1292-1302.
- [61] Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovascular Research* 2006 ; 70 : 264-73.
- [62] Gerlach J, Jorres A, Nohr R, Zeilinger K, Spatkowski G, Neuhaus P. Local liberation of cytokines during liver preservation. *Transpl Int* 1999 ; 12 : 261-5.
- [63] Goldberg HS, Mitzner W, Batra G. Effect of transpulmonary and vascular pressures on rate of pulmonary edema formation. *J Appl Physiol* 1977 ; 43 : 14-9.
- [64] Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 ; 293 : 1654-61.
- [65] Gottlieb RA, Engler RL. Apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion. *Ann N Y Acad Sci* 1999 ; 874: 412-26.
- [66] Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 1995 ; 307:93-8.
- [67] Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993 ; 25 : 1461-9.
- [68] Haniuda M, Hasegawa S, Shiraishi T, Dresler CM, Cooper JD, Patterson GA. Effects of inflation volume during lung preservation on pulmonary capillary permeability. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112 : 85-93.
- [69] Harder F, Loertscher R, Thiel G. Cyclosporin in cadaveric renal transplantation: one-year follow-up of a multicentre trial. *The Lancet* 1983 ; 2 : 986-9.
- [70] Hauge A, Lunde PK, Waaler BA. Vasoconstriction in isolated bloodperfused rabbit lungs and its inhibition by cresols. *Acta Physiol Scand* 1966 ; 66 : 226-40.
- [71] Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening : a new paradigm for myocardial preconditioning ? *Cardiovas Res* 2002 ; 55 : 534-43.
- [72] Haverich A, Aziz S, Scott WC, Jamieson SW, Shumway NE. Improved lung preservation using Euro-Collins solution for flush-perfusion. *Thorac Cardiovasc Surg* 1986 ; 34 : 368-76.

- [73] Hertz M, Taylor D, Trulock E, Boucek M, Mohacsi P, Edwards L, Keck B. The Registry of the International Society for Heart and Lung with early graft failure after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2002 ; 21 : 950-70.
- [74] Hesselink DA, Bouamar R, van Gelder T. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity. *Therap Drug Monitor* 2010 ; 32 : 387-93.
- [75] Hiratsuka M, Yano M, Mora BN, Nagahiro I, Cooper JD, Patterson GA. Heat shock pretreatment protects pulmonary isografts from subsequent ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 1998 ; 17 : 1238-46.
- [76] Höcherl K, Dreher F, Vitzthum H, Köhler J, Kurtz A. Cyclosporine a suppresses cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002 ; 13 : 2427-36.
- [77] Hopkinson DN, Bhabra MS, Hooper TL. Pulmonary graft preservation : a worldwide survey of current clinical practice. *J Heart Lung Transplant* 1998 ; 17 : 525-31.
- [78] Hortelano S, Castilla M, Torres AM, Tejedor A, Bosca L. Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2000 ; 11 : 2315-23.
- [79] Inci I, Ampollini L, Arni S, Jungraithmayr W, Inci D, Hillinger S, Leskosek B, Vogt P, Weder W. Ex vivo reconditioning of marginal donor lungs injured by acid aspiration. *J Heart Lung Transplant* 2008 ; 27 : 1229-36.
- [80] Inci I, Zhai W, Arni S, Hillinger S, Vogt P, Weder W. N-acetylcysteine attenuates lung ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 2007 ; 84 : 240-6.
- [81] Inci I, Zhai W, Arni S, Inci D, Hillinger S, Lardinois D, Vogt P, Weder W. Fibrinolytic treatment improves the quality of lungs retrieved from non-heart-beating donors. *J Heart Lung Transplant* 2007 ; 26 : 1054-60.
- [82] Ingemansson R, Eyjolfsson A, Mared L, Pierre L, Algotsson L, Ekmehag B, Gustafsson R, Johnsson P, Koul B, Lindstedt S, Luhrs C, Sjöberg T, Steen S. Clinical transplantation of initially rejected donor lungs after reconditioning ex vivo. *Ann Thorac Surg* 2009 ; 87 : 255-60.
- [83] International Society for Heart and Lung Transplantation. <https://www.ishlt.org/>
- [84] Jabaudon M, Futier E, Roszyk L, Chalus E, Guerin R, Petit A, Mrozek S, Perbet S, Cayot-Constantin S, Chartier C, Sapin V, Bazin JE, Constantin JM. Soluble form of the receptor for advanced glycation end products is a marker of acute lung injury but not of severe sepsis in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2011; 39 : 480-8.

- [85] Jaecklin T, Engelberts D, Otulakowski G, O'Brodovich H, Post M, Kavanagh BP. Lung-derived soluble mediators are pathogenic in ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011 ; 300 : L648-58.
- [86] Kahan BD. Drug therapy: cyclosporine. *NEJM* 1989 ; 321 : 1725-38.
- [87] Kakishita T, Oto T, Hori S, Miyoshi K, Otani S, Yamamoto S, Waki N, Yoshida O, Okazaki M, Yamane M, Toyooka S, Sano Y, Miyoshi S. Suppression of inflammatory cytokines during ex vivo lung perfusion with an adsorbent membrane. *Ann Thorac Surg* 2010 ; 89 : 1773-9.
- [88] Kanaya N, Kobayashi I, Nakayama M, Fujita S, Namiki A. ATP sparing effect of isoflurane during ischaemia and reperfusion of the canine heart. *Br J Anaesth* 1995 ; 74 : 563-8.
- [89] Karck M, Haverich A. Nifedipine and diltiazem reduce pulmonary edema formation during postischemic reperfusion of the rabbit lung. *Res Exp Med (Berl)* 1992 ; 192 : 137-44.
- [90] Karimova A, Pinsky DJ. The endothelial response to oxygen deprivation : biology and clinical implications. *Intensive Care Med* 2001 ; 27: 19-31.
- [91] Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med* 2000 ; 136 : 427-40.
- [92] Kerr JS, Baker NJ, Bassett DJ, Fisher AB. Effect of perfusate glucose concentration on rat lung glycolysis. *Am J Physiol* 1979 ; 236 : E229-33.
- [93] Keshavjee SH, Yamazaki F, Cardoso PF, McRitchie DI, Patterson GA, Cooper JD. A method for safe twelve-hour pulmonary preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989 ; 98 : 529-34.
- [94] Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2004 ; 62 : 74-85.
- [95] King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz DA, Tribble CG, Kron IL. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg* 2000 ; 69 : 1681-5.
- [96] Kirk AJ, Colquhoun IW, Dark JH. Lung preservation: a review of current practice and future directions. *Ann Thorac Surg* 1993 ; 56 : 990-1000.
- [97] Koganov Y, Weiss YG, Oppenheim A, Elami A, Pizov R. Positive end-expiratory pressure increases pulmonary venous vascular resistance in patients after coronary artery surgery. *Crit Care Med* 1997 ; 25 : 767-72.

- [98] Koike T, Yeung JC, Cypel M, Rubacha M, Matsuda Y, Sato M, Waddell TK, Liu M, Keshavjee S. Kinetics of lactate metabolism during acellular normothermic ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant* 2011 ; 30 : 1312-9.
- [99] Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cal J, Jones DP, Mc Gregor GR, Wallace DC. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 2004 ; 427 : 461-5.
- [100] Koulmann N, Novel-Chate V, Peinnequin A, Chapot R, Serrurier B, Simler N, Richard H, Ventura-Clapier R, Bigard X. Cyclosporin A Inhibits Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension and Right Ventricle Hypertrophy. *Am J Respir Crit Care Med* 2006 ; 174 : 699-705.
- [101] Kraft SA, Fujishima S, Mc Guire GP, Thompson JS, Raffin TA, Pearl RG. Effect of blood and albumin on pulmonary hypertension and edema in perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* 1995 ; 78 : 499-504.
- [102] Krishnadasan B, Naidu BV, Rosengart M, Farr AL, Barnes A, Verrier ED, Mulligan MS. Decreased lung ischemia-reperfusion injury in rats after preoperative administration of cyclosporine and tacrolimus. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002 ; 123 : 756-67.
- [103] Kuwano K, Hara N. Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000 ; 22 : 147-9.
- [104] Le Cras TD, Mc Murtry IF. Nitric oxide production in the hypoxic lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001 ; 280 : L575-82.
- [105] Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, Matthay MA. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 16357-62.
- [106] Lee YH, Park KH, Ku YS. Pharmacokinetic changes of cyclosporine after intravenous and oral administration to rats with uranyl nitrate-induced acute renal failure. *Int J Pharm* 2000 ; 194 : 221-7.
- [107] Lemay S, Rabb H, Postler G, Singh AK. Prominent and sustained up-regulation of gp130-signaling cytokines and the chemokine MIP-2 in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2000; 69 : 959-63.
- [108] Lim SW, Li C, Ahn KO. Cyclosporine-induced renal injury induces toll-like receptor and maturation of dendritic cells. *Transplantation* 2005 ; 80 : 691-9.
- [109] Lindstedt S, Hlebowicz J, Koul B, Wierup P, Sjogren J, Gustafsson R, Steen S, Ingemansson R. Comparative outcome of double lung transplantation using conventional donor lungs and non-acceptable donor lungs reconditioned ex vivo. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2011 ; 12 : 162-5.

- [110] Liu M, Tremblay L, Cassivi SD, Bai XH, Mourgeon E, Pierre AF, Slutsky AS, Post M, Keshavjee S. Alterations of nitric oxide synthase expression and activity during rat lung transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 ; 278 : L1071-81.
- [111] Longmore WJ, Mourning JT. Lactate production in isolated perfused rat lung. *Am J Physiol* 1976 ; 231: 351-4.
- [112] Massaro GD, Gail DB, Massaro D. Lung oxygen consumption and mitochondria of alveolar epithelial and endothelial cells. *J Appl Physiol* 1975 ; 38 : 588-92.
- [113] Matsumura K, Jeremy RW, Schaper J, Becker LC. Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation* 1998 ; 97 : 795-804.
- [114] McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985 ; 312 : 159-163.
- [115] Meade M, Granton JT, Matte-Martyn A, McRae K, Cripps PM, Weaver B, Keshavjee SH. A randomized trial of inhaled nitric oxide to prevent reperfusion injury following lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2001 ; 20 : 254-5.
- [116] Meers C, Van Raemdonck D, Verleden GM, Coosemans W, Decaluwe H, de Leyn P, Nafteux P, Lerut T. The number of lung transplants can be safely doubled using extended criteria donors; a single-center review. *Transpl Int* 2010 ; 23 : 628-35.
- [117] Meyer KC, Love RB, Zimmerman JJ. The therapeutic potential of nitric oxide in lung transplantation. *Chest* 1998 ; 113 : 1360-71.
- [118] Meyers BF, Sundt TM, Henry S, Trulock EP, Guthrie T, Cooper JD, Patterson GA. Selective use of extracorporeal membrane oxygenation is warranted after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000 ; 120 : 20-6.
- [119] Moradiellos FJ, Naranjo JM, Córdoba ML. Clinical lung transplantation after ex vivo evaluation of uncontrolled non heart-beating donors lungs : initial experience. *J Heart Lung Transplant* 2011 ; 30 : S38.
- [120] Morris PJ, Chapman JR, Allen RD. Cyclosporin conversion *versus* conventional immunosuppression : longterm follow-up and histological evaluation. *The Lancet* 1987 ; 1 : 586-91.
- [121] Morrison RJ, Short HD, Noon GP, Frost AE. Hypertension after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1993 ; 12 : 928-31.
- [122] Muller C, Hoffmann H, Bittmann I, Isselhard W, Messmer K, Dienemann H, Schildberg FW. Hypothermic storage alone in lung preservation for transplantation : a metabolic, lightmicroscopic, and functional analysis after 18 hours of preservation. *Transplantation* 1997 ; 63 : 625-30.

- [123] Murray BM, Paller MS, Ferris TF. Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Inter* 1985 ; 28 : 767-74.
- [124] Naesens N, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009 ; 4 : 481-508.
- [125] Naidu BV, Krishnadasan B, Byrne K, Farr AL, Rosengart M, Verrier ED, Mulligan MS. Regulation of chemokine expression by cyclosporine A in alveolar macrophages exposed to hypoxia and reoxygenation. *Ann Thorac Surg* 2002 ; 74 : 899-905.
- [126] Naka Y, Marsh HC, Scesney SM, Oz MC, Pinsky DJ. Complement activation as a cause for primary graft failure in an isogeneic rat model of hypothermic lung preservation and transplantation. *Transplantation* 1997 ; 64 : 1248-55.
- [127] Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005 ; 434 : 652-7.
- [128] Nakajima D, Yamada T, Chen F, Sakamoto J, Ohsumi A, Bando T, Date H. Reconditioning of lungs from non-heart-beating donors with normothermic ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant* 2012 ; 31 : 187-93.
- [129] Niemeier RW. The isolated perfused lung. *Environ Health Perspect* 1984 ; 56 : 35-41.
- [130] Novick RJ, Possmayer F, Veldhuizen RA, Menkis AH, Mc Kenzie FN. Surfactant analysis and replacement therapy: a future tool of the lung transplant surgeon ? *Ann Thorac Surg* 1991 ; 52 : 1194-1200.
- [131] Novick RJ, Veldhuizen RA, Possmayer F, Lee J, Sandler D, Lewis JF. Exogenous surfactant therapy in thirty-eight hour lung graft preservation for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994 ; 108 : 259-68.
- [132] Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Scharbatke H, Preckel B, Schlack W. The Influence of Mitochondrial KATP-Channels in the Cardioprotection of Preconditioning and Postconditioning by Sevoflurane in the Rat *In Vivo*. *Anesth Analg* 2005 ; 101 : 1252-60.
- [133] Ochs M, Nenadic I, Fehrenbach A, Albes JM, Wahlers T, Richter J, Fehrenbach H. Ultrastructural alterations in intraalveolar surfactant subtypes after experimental ischemia and reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ; 160 : 718-24.
- [134] Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao LH, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000 ; 6 : 422-8.

- [135] Oz MC, Liao H, Naka Y, Seldomridge A, Becker DN, Michler RE, Smith CR, Rose EA, Stern DM, Pinsky DJ. Ischemia-induced interleukin-8 release after human heart transplantation : a potential for endothelial cells. *Circulation* 1995 ; 92 : II428-32.
- [136] Parker JC, Townsley MI, Rippe B, Taylor AE, Thigpen J. Increased microvascular permeability in dog lungs due to high peak airway pressures. *J Appl Physiol* 1984 ; 57 : 1809-16.
- [137] Patterson GA, Mitzner WA, Sylvester JT. Assessment of fluid balance in isolated sheep lungs. *J Appl Physiol* 1985 ; 58 : 882-91.
- [138] Pearse DB, Brower RG, Adkinson NF, Jr., Sylvester JT : Spontaneous injury in isolated sheep lungs: role of perfusate leukocytes and platelets. *J Appl Physiol* 1989 ; 66 : 1287-96.
- [139] Pearse DB, Sylvester JT. Spontaneous injury in isolated sheep lungs: role of resident polymorphonuclear leukocytes. *J Appl Physiol* 1992 ; 72 : 2475-81.
- [140] de Perrot M, Fischer S, Liu M, Jin R, Bai XH, Waddell TK, Keshavjee S. Prostaglandin E1 protects lung transplants from ischemia-reperfusion injury: a shift from pro- to anti-inflammatory cytokines. *Transplantation* 2001 ; 72 : 1505-12.
- [141] de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. State of the Art. Ischemia-Reperfusion-Induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 ; 167 : 490-511.
- [142] Piot C, Croisille P, Staat P, et al. Effect of Cyclosporine on Reperfusion Injury in Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2008 ; 359 : 473-81.
- [143] Postlethwait EM, Young SL. Alteration of rat lung adenine nucleotide content after pulmonary edema. *Lung* 1980 ; 158 : 157-64.
- [144] Preckel B, Schlack W, Comfère T, Obal D, Barthel H, Thämer V. Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischemia in the rabbit heart in-vivo. *Br J Anesth* 1998 ; 81 : 905-12.
- [145] Quetant S, Rochat T, Pison C. Résultats de la transplantation pulmonaire. *Rev Mal Respir* 2010 ; 27 : 921-38.
- [146] Rhoades RA. Isolated perfused lung preparation for studying altered gaseous environments. *Environ Health Perspect* 1984 ; 56 : 43-50.
- [147] Sakuma T, Tsukano C, Ishigaki M, Nambu Y, Osanai K, Toga H, Takahashi K, Ohya N, Kurihara T, Nishio M, Matthay MA. Lung deflation impairs alveolar epithelial fluid transport in ischemic rabbit and rat lungs. *Transplantation* 2000 ; 69 : 1785-93.

- [148] Sanchez PG, Bittle GJ, Burdorf L, Pierson RN, Griffith BP. State of Art : Clinical ex vivo lung perfusion: Rationale, current status, and future directions. *J Heart Lung Transplant* 2012 ; 31 : 339-48.
- [149] Sanchez PG, Bittle GJ, Son HS. Ex-vivo perfusion reduces lung lipid peroxidation in a swine model of cardiac death. *J Heart and Lung Transplantation* 2011 ; 30 : S144.
- [150] Sander M, Lyson T, Thomas GD, Victor RG. Sympathetic neural mechanisms of cyclosporine-induced hypertension. *Am J Hypertens* 1996 ; 9 : S121-38.
- [151] Sasaki S, Yasuda K, Lo Cicero J 3rd. Reliable 18-hour lung preservation with University of Wisconsin solution. An ex vivo rat model with a pulsatile perfusion system. *Nihon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1999 ; 47 : 99-103.
- [152] Scherrer U, Vissing SF, Morgan BJ, Rollins JA, Tindall RS, Ring S, Hanson P, Mohanty PK, Victor RG. Cyclosporine-induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *N Engl J Med* 1990 ; 323 : 693-9.
- [153] Serrick C, Adoumie R, Giaid A, Shennib H. The early release of interleukin-2, tumor necrosis factor- α and interferon- γ after ischemia reperfusion injury in the lung allograft. *Transplantation* 1994 ; 58 : 1158-62.
- [154] Serrick CJ, Jamjoum A, Reis A, Giaid A, Shennib H. Amelioration of pulmonary allograft injury by administering a second rinse solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996 ; 112 : 1010-16.
- [155] Steen S, Kimblad PO, Sjöberg T, Lindberg L, Ingemansson R, Massa G. Safe lung preservation for twenty-four hours with Perfadex. *Ann Thorac Surg* 1994 ; 57 : 450-7.
- [156] Steen S, Sjöberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet* 2001 ; 357 : 825-9.
- [157] Steen S, Liao Q, Wierup PN, Bolys R, Pierre L, Sjöberg T. Transplantation of lungs from non-heart-beating donors after functional assessment ex vivo. *Ann Thorac Surg* 2003 ; 76:244-52.
- [158] Struber M, Hirt SW, Cremer J, Harringer W, Haverich A. Surfactant replacement in reperfusion injury after clinical lung transplantation. *Intensive Care Med* 1999 ; 25 : 862-4.
- [159] Su X, Looney MR, Gupta N, Matthay MA. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an indicator of direct lung injury in models of experimental lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009 ; 297 : L1-5.
- [160] Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca^{2+} overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 ; 288 : H1900-8.

- [161] Suttner DM, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J* 1999 ; 13 : 1800-9.
- [162] Textor SC, Burnett JC, Romero Jr JC, Canzanello VJ, Taler SJ, Wiesner R, Porayko M, Krom R, Gores G, Hay E. Urinary endothelin and renal vasoconstriction with cyclosporine or FK506 after liver transplantation. *Kidney International* 1995 ; 47 : 1426-33.
- [163] Theissen IL, Meissner A. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Anaesthesist*. 1996 ; 45 : 643-52.
- [164] Travis DL, Fabia R, Netto GG, Husberg BS, Goldstein RM, Klintmalm GB, Levy MF. Protection by cyclosporine A against normothermic liver ischemia-reperfusion in pigs. *J Surg Res* 1998 ; 75 : 116-26.
- [165] Tsang A, Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial postconditioning : reperfusion injury revisited. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 ; 289 : 2-7.
- [166] Uchida T, Shirasawa M, Ware LB, Kojima K, Hata Y, Makita K, Mednick G, Matthay ZA, Matthay MA. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2006 ; 173 : 1008-15.
- [167] Ueno T, Yokomise H, Oka T, Puskas J, Mayer E, Slutsky AS, Patterson GA. The effect of PGE1 and temperature on lung function following preservation. *Transplantation* 1991 ; 52 : 626-30.
- [168] Van Assche G, D'Haens G, Noman M, Vermeire S, Hiele M, Asnong K, Arts J, D'Hoore A, Penninckx F, Rutgeerts P. Randomized, double-blind comparison of 4 mg/kg *versus* 2 mg/kg intravenous cyclosporine in severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003 ; 125 : 1025-31.
- [169] Varela A, Montero CG, Cordoba M, Antequera A, Perez M, Tabuenca MJ, Ortiz BJ, Tendillo FJ, Mascias A, Santos M, Castillo Olivares JL. Improved distribution of pulmonary flush solution to the tracheobronchial wall in pulmonary transplantation. *Eur Surg Res* 1997 ; 29 : 1-4.
- [170] Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ; 159 : 980-8.
- [171] Ware LB, Wang Y, Fang X, Warnock M, Sakuma T, Hall TS, Matthay M. Assessment of lungs rejected for transplantation and implications for donor selection. *Lancet* 2002 ; 360 : 619-20.
- [172] Wierup P, Haraldsson A, Nilsson F, et al. Ex vivo evaluation of nonacceptable donor lungs. *Ann Thorac Surg* 2006 ; 81 : 460-6.
- [173] Winkler M, Brinkmann C, Jost U, Oldhafer K, Ringe B, Pichlmayr R. Long-term side effects of cyclosporine-based immunosuppression in patients after liver transplantation. *Transplant Proc* 1994 ; 26 : 2679-82.

- [174] Wipper S, Lueke A, Baldus S, Schirmer J, Reichenspurner H, Wagner FM. Myeloperoxidase tissue level reflects successful repair of donor lung injury by ex-vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant* 2011 ; 30 : S143-4.
- [175] Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, Halestrap AP. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J* 1998 ; 336 : 287-90.
- [176] Yang CW, Ahn HJ, Han HJ, Kim WY, Li C, Shin MJ, Kim SK, Park JH, Kim YS, Moon IS, Bang BK. Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation* 2001 ; 72 : 1753-9.
- [177] Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998 ; 97 : 276-81.
- [178] Yokomise H, Ueno T, Yamazaki F, Keshavjee S, Slutsky A, Patterson GA. The effect and optimal time of administration of verapamil on lung preservation. *Transplantation* 1990 ; 49 : 1039-43.
- [179] Young SL, O'Neil JJ, Kasuyama RS, Tierney DF. Glucose utilization by edematous rat lungs. *Lung* 1980 ; 157 : 165-77.
- [180] Zamora MR, Davis RD, Keshavjee SH, Schulman L, Levin J, Ryan U, Patterson GA. Complement inhibition attenuates human lung transplant reperfusion injury: a multicenter trial. *Chest* 1999 ; 116 : 46S.
- [181] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 ; 285 : H579-88.
- [182] Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release : a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med* 2000 ; 192 : 1001-114.
- [183] Zych B, Popov AF, Stavri G, Bashford A, Bahrami T, Amrani M, De Robertis F, Carby M, Marczin N, Simon AR, Redmond KC. Early outcomes of bilateral sequential single lung transplantation after ex-vivo lung evaluation and reconditioning. *J Heart Lung Transplant* 2012 ; 31 : 274-81.