



HAL
open science

Intérêt du monoxyde de carbone comme marqueur non invasif des lésions d'ischémie-reperfusion de poumons reconditionnés ex vivo

Maxime Maignan

► **To cite this version:**

Maxime Maignan. Intérêt du monoxyde de carbone comme marqueur non invasif des lésions d'ischémie-reperfusion de poumons reconditionnés ex vivo. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAS030 . tel-01691721

HAL Id: tel-01691721

<https://theses.hal.science/tel-01691721>

Submitted on 24 Jan 2018

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Maxime MAIGNAN

Thèse dirigée par **Raphaël BRIOT**

préparée au sein du **Laboratoire TIMC-IMAG équipe PRETA**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement**

Intérêt du monoxyde de carbone comme marqueur non invasif des lésions d'ischémie-reperfusion de poumons reconditionnés ex vivo

Thèse soutenue publiquement le **cinq novembre 2015**

Devant le jury composé de :

Mr le Professeur Christophe PISON	Président
Mr le Docteur Raphaël BRIOT	Directeur
Mr le Professeur François TRONC	Rapporteur
Mr le Professeur Jacques LEVRAUT	Rapporteur
Mr le Professeur Dirk VAN RAEMDONCK	Examineur
Mme le Docteur Irène VENTRILLARD	Examineur



A Madame et Messieurs les membres du jury

Monsieur le Professeur Christophe Pison

Je vous remercie d'avoir accepté la présidence de ce jury. Je vous remercie également pour l'enthousiasme que vous m'avez transmis à chacune de nos rencontres et votre aide précieuse pour constituer ce jury.

Monsieur le Docteur Raphaël Briot

Au-delà du soutien et des connaissances que tu m'as apportés, je ne peux pas m'empêcher de penser aux bons conseils que tu as su me prodiguer. Je suis admiratif de tes engagements.

Monsieur le Professeur François TRONC

Je vous remercie infiniment d'avoir accepté de juger ce travail à la dernière minute. Votre présence dans ce jury est un honneur.

Monsieur le Professeur Jacques Levrault

Nous ne nous sommes pour l'instant que trop peu rencontrés. A chacune de nos rencontres, je suis conforté dans l'idée que la physiologie est au médecin urgentiste ce que la farine est au boulanger.

Monsieur le Professeur Dirk Van Raemdonck

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail dont la rédaction a été grandement facilitée par la lecture de votre article intitulé « Ex vivo lung perfusion ».

Madame le Docteur Irène Ventrillard

Notre rencontre est du domaine de l'improbable. Je ne peux que louer ta persévérance et ta compréhension. Travailler avec des médecins urgentistes est une gageure.

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans ce travail

Monsieur le Docteur Stéphane Gennai

Merci à toi de m'avoir accepté à tes côtés, de m'avoir guidé.

Madame Angélique Brouta

Tu as supporté mes humeurs de lendemain de garde et ce travail n'aurait pas pu aboutir sans toi. Je retiendrai de notre collaboration ta rigueur, ton flegme et ton sourire.

Madame Annie Foquin, Madame Dorra Guergour, Monsieur Hervé Chaussard et toute l'équipe du CRSSA

Madame le Professeur Françoise Carpentier

Je vous remercie pour votre soutien, vos bons conseils, votre protection et les cafés du matin.

Madame Roselyne Collomb – Muret

Partager ton bureau est une richesse.

Monsieur le Docteur Damien Viglino

Merci de ta présence, ton enthousiasme et ton esprit critique. Quel plaisir de travailler avec toi.

Mesdames les Docteurs Carole Paquier et Sophie Perrin

Merci à vous de me faire grandir chaque jour.

A toute l'équipe des urgences et du SAMU 38

Aux soutiens financiers

PHRC inter-régional

Vaincre La Mucoviscidose

Agence de la Biomédecine

Agir à dom

Résumé

Rationnel : Le développement des techniques de reperfusion pulmonaire *ex vivo* (*Ex vivo* lung perfusion : EVLP) vise à réduire la pénurie d'organes disponibles pour la transplantation. Le monoxyde de carbone (CO) pourrait aider à la sélection des greffons en cours d'EVLP puisque sa production endogène est augmentée en situation d'ischémie reperfusion.

Objectifs : Mettre au point une technique de mesure du CO exhalé (eCO) lors de l'EVLP et étudier ses variations en fonction des lésions d'ischémie reperfusion.

Méthodes : À partir d'un modèle porcin d'EVLP et à l'aide d'un appareil de spectrométrie laser basé sur le principe d'une cavité résonnante (optical-feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy: OF-CEAS), eCO était mesuré selon différents paramètres ventilatoires, en ambiances polluées par des gaz pauvres (< 0,015ppmv) ou riches (9ppmv) en CO et après perfusion d'un inhibiteur de l'hème oxygénase (SnPP). eCO était ensuite comparé après 30 min (J0) ou 24 h (J1) d'ischémie froide et sa valeur prédictive pour sélectionner des greffons était calculée.

Résultats : La concentration d'eCO de poumons isolés était de $0,45 \pm 0,19$ ppmv. Les pics d'eCO se produisaient pendant la phase expiratoire. Ni les variations de fraction inspirée en oxygène, ni la pollution de l'air ambiant ne modifiaient eCO. Les concentrations d'eCO n'étaient pas différentes après perfusion de SnPP. eCO était plus élevé à J1 par rapport à J0 ($1,35 \pm 0,259$ ppmv vs. $0,951 \pm 0,313$, $p = 0,01$) et était corrélé à un indice de perméabilité de la membrane alvéolo capillaire. La meilleure valeur seuil d'eCO déterminée à partir de la courbe ROC était 0,860 ppmv (sensibilité de 1 (0,31 – 1), spécificité de 0,44 (0,15 – 0,77), valeur prédictive positive de 0,37 (0,10 – 0,74), valeur prédictive négative de 1 (0,39 – 1)).

Conclusions : La mesure d'eCO en condition d'EVLP est faisable. eCO est significativement augmenté lorsque les lésions d'ischémie reperfusion sont accrues mais eCO ne peut pas être utilisé de façon isolée pour sélectionner les greffons pulmonaires.

Abstract

Rationale: *Ex vivo* lung perfusion (EVLP) is a promising technique to reduce the shortage of organs available for transplantation. Carbon monoxide (CO) might help in the selection of grafts during EVLP as its endogenous production is increased by ischemia reperfusion.

Objectives: To develop a measurement technique of exhaled CO (eCO) during EVLP and to study its variations depending on ischemia reperfusion injuries.

Methods: Using a pig model of EVLP and using a laser spectrometer technique based on the principle of a resonant cavity (optical feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy-OF-CEAS), we measured eCO under different ventilatory parameters, various polluted environments with poor (<0,015ppmv) or rich (9ppmv) CO gas, and after infusion of an inhibitor of heme oxygenase (SnPP). We then compared eCO after 30 min (D0) or 24 h (D1) of cold ischemia and determined the predictive value of eCO to select lung grafts.

Results: In isolated lungs, the concentration of eCO reached 0.45 ± 0.19 ppmv. eCO peaks during the expiratory phase. Neither variations of the fraction of inspired oxygen, nor the pollution of the ambient air altered eCO. eCO concentrations were not different after SnPP infusion. eCO was higher on day 1 compared to day 0 (1.35 ± 0.259 vs. 0.951 ± 0.313 ppmv, $p = 0.01$) and correlated with an index of the permeability of the alveolar capillary membrane. The best threshold value of eCO determined from the ROC curve was 0.860 ppmv (sensitivity 1 (0.31 to 1), specificity of 0.44 (0.15 to 0.77), positive predictive value of 0, 37 (0.10 to 0.74), negative predictive value of 1 (0.39 to 1)).

Conclusions: Measurements of eCO during EVLP is feasible. eCO is significantly higher when ischemia-reperfusion injuries are increased. However, eCO can not be used in isolation to select lung grafts.

Table des matières

I. Rationnel.....	12
A. Développement de la perfusion pulmonaire <i>ex vivo</i>	12
1. Pénurie de greffons pulmonaires	12
2. Lésions d'ischémie reperfusion et dysfonction du greffon	14
3. Développement de la perfusion pulmonaire <i>ex vivo</i>	17
4. Evaluation du greffon au cours de l'EVLP	19
B. Monoxyde de Carbone et transplantation pulmonaire	24
1. Généralités	24
2. Ischémie reperfusion, hème oxygénase et monoxyde de carbone.....	27
3. Monoxyde de carbone et ischémie reperfusion pulmonaire.....	32
C. Hypothèses.....	35
II. Méthode	37
A. Description générale de la recherche	37
B. Spectrométrie laser	38
C. Technique d'EVLP	41
D. Expérimentation A : validation de la mesure d'eCO	43
E. Expérimentation B : eCo et lésions d'ischémie reperfusion.....	45
F. Analyses statistiques.....	50
III. Résultats.....	52
A. Expérimentation A.....	52
1. Mesures standards d'eCO	52
2. Mesures d'eCO après traitement par SnPP.....	55
B. Expérimentation B.....	56

IV. Discussion	62
A. Validation de la technique de mesure d'eCO.....	62
B. Monoxyde de carbone et ischémie reperfusion pulmonaire	67
V. Conclusion	73
VI. Références.....	75

Abréviations

BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive

CEC : circulation extracorporelle

cGMP : cyclic guanosine monophosphate

CO : monoxyde de carbone

CORM : carbon monoxide releasing molecule

DPG : dysfonction pulmonaire du greffon

eCO : concentration de monoxyde de carbone exhalé

ENaC : canal sodique épithélial

ET-1 : endothéline – 1

EVLP : *ex vivo* lung perfusion (perfusion / évaluation *ex vivo* de poumons)

FiO₂ : fraction inspirée en O₂

FR : fréquence respiratoire

HO : hème oxygénase (-1 : de type 1 ; -2 : de type 2)

ISHLT : international society for heart and lung transplantation

Keap1 : kelch-like erythroid cell-derived associated protein

LBA : lavage broncho-alvéolaire

Nrf2 : nuclear factor erythroid 2-related factor 2

OF-CEAS : optical-feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy

PaO₂ : pression partielle artérielle en O₂

PAP : pression artérielle pulmonaire

PEEP : pression positive de fin d'expiration

Ppmv : partie par million

RAGE : receptor for advanced glycation end products

ROC : receiver operating characteristic

RVP : résistances vasculaires pulmonaires

sGC : soluble guanylate cyclase

V/Q : rapport ventilation / perfusion

V_T : volume courant

RATIONNEL

I. Rationnel

A. Développement de la perfusion pulmonaire *ex vivo*

1. Pénurie de greffons pulmonaires

Depuis le début des années 1980, le nombre de transplantations pulmonaires est en constante augmentation (Figure 1).¹ Le registre de l'International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) recense les transplantations effectuées dans 241 centres à travers le monde, soit environ deux tiers de l'activité totale de greffe pulmonaire.¹ En 2012, 3719 greffes pulmonaires chez l'adulte ont ainsi été répertoriées et analysées.¹

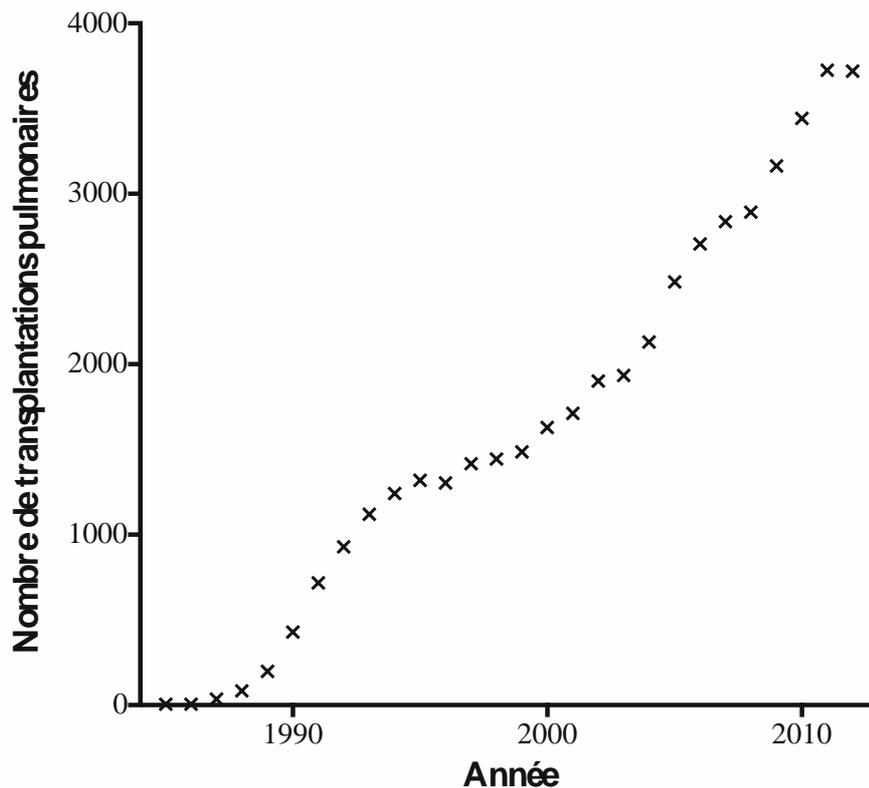


Figure 1. Evolution annuelle du nombre de transplantations mono et bi pulmonaires selon le registre de l'International Society for Heart and Lung Transplantation¹

Trois principales indications sont à l'origine de 80% des transplantations pulmonaires : la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) et l'emphysème pulmonaire, la mucoviscidose et les fibroses pulmonaires.^{1,2} Le reste des indications (hypertension artérielle pulmonaire, bronchiolite oblitérante, sarcoïdose etc.) représentent moins d'une transplantation sur cinq.² Parallèlement à l'accroissement de l'activité de greffe, la survie médiane des patients a été multipliée par cinq entre les années 1980 et les années 2000.² Elle est estimée actuellement à 5,7 ans et un tiers des patients sont vivants à 10 ans.¹ Cependant, la progression quantitative et qualitative de la greffe pulmonaire au cours des trente dernières années masque un problème crucial de pénurie d'organes. Plusieurs facteurs concourent à ce problème : l'accroissement du nombre de patients éligibles à la transplantation lié notamment à l'augmentation de la prévalence de la BPCO ;^{3,4} l'élargissement des indications de transplantations pulmonaires du fait de l'amélioration de la survie post greffe ;⁵⁻⁷ la stagnation du nombre de donneurs potentiels ;² le pourcentage restreint de donneurs effectivement prélevés d'au moins un poumon (18,7% des donneurs ont été prélevés en vue d'une greffe mono ou bi pulmonaire en 2012 en France).² Ainsi, il existe une inadéquation entre l'offre de greffons et le nombre de patients en attente de transplantation. Entre 2008 et 2012, le nombre de patients sur liste d'attente de greffe pulmonaire a augmenté de 17,3%.² Enfin, le nombre total de patients candidats par greffon était de 1,7 en 2013 en France, ce chiffre résumant à lui seul la pénurie de greffons pulmonaires.²

Plusieurs stratégies sont possibles afin d'augmenter le nombre d'organes disponibles. Les campagnes d'information grand public sur le don d'organes, bien qu'indispensables et efficaces, sont relativement difficiles à mettre en place et leurs résultats dépendent de multiples facteurs notamment sociaux et ethniques.^{8,9} Le prélèvement d'un greffon pulmonaire sur donneur vivant reste anecdotique.¹⁰⁻¹² La transplantation d'un lobe pulmonaire ou la réduction segmentaire sont avant tout destinées à réduire la taille du poumon

du donneur pour être en adéquation avec le receveur.¹³ Finalement, seul le prélèvement d'organes sur donneur à cœur arrêté ou, d'une manière plus générale, l'élargissement des critères d'acceptation des greffons permettrait d'augmenter significativement le nombre d'organes disponibles. Cependant, les critères d'acceptation définis par l'ISHLT¹⁴ ont été développés afin de réduire la survenue des complications post greffe.^{15,16} En effet, 15% des décès après transplantation pulmonaire surviennent dans les 30 jours suivant la chirurgie.¹ Ces décès sont principalement attribuables à une dysfonction primaire du greffon (DPG) dont la fréquence est estimée entre 10% et 30%.^{1,17-19} Plus qu'un assouplissement des critères de sélection des greffons, c'est donc le développement de nouvelles stratégies d'évaluation des organes qui permettrait d'augmenter le nombre de greffons disponibles. Ainsi, des poumons initialement recusés sur les critères de l'ISHLT pourraient être requalifiés pour la greffe suite à une évaluation plus pertinente de leur viabilité. Enfin, la viabilité des greffons pourrait être améliorée par l'utilisation de thérapeutiques réduisant les lésions d'ischémie reperfusion.

2. Lésions d'ischémie reperfusion et dysfonction du greffon

Du fait des caractéristiques de la transplantation (état pathologique du donneur, temps d'ischémie, réanimation post transplantation), le greffon pulmonaire subit d'importantes lésions inflammatoires et d'ischémie reperfusion pouvant conduire à une DPG.^{15,20} Au niveau clinique, ces lésions peuvent se traduire par un minime œdème pulmonaire de reperfusion ou, plus dramatiquement, par un véritable syndrome de détresse respiratoire aiguë.^{15,18} Il existe ainsi différents stades de DPG selon l'atteinte du parenchyme pulmonaire et son retentissement clinique.²¹ Dans les formes les plus sévères, la mortalité précoce atteint 20 à 40%.^{19,22} La survenue d'une DPG augmente également le risque, à plus long terme, de bronchiolite oblitérante et de dysfonction chronique du poumon.^{22,23}

La physiopathologie des lésions d'ischémie-reperfusion du poumon se caractérise par une

altération de la barrière alvéolo-capillaire.²⁴ Il existe une atteinte de l'endothélium capillaire liée à l'activation de la cascade immuno-inflammatoire : production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α),²⁴⁻²⁶ recrutement de leucocytes et activation des macrophages,²⁶⁻³⁰ activation du complément.³¹⁻³³ La formation de microthrombi participe également aux lésions.³⁴⁻³⁶ L'ischémie reperfusion induit également une apoptose des cellules endothéliales pulmonaires du fait de l'activation de la voie des caspases et des protéines de la famille Bcl2.³⁷ Macroscopiquement, cette atteinte endothéliale se traduit par une plus grande filtration de liquide et de protéines vers l'interstitium et par une augmentation importante des résistances vasculaires pulmonaires.²⁴ Il existe également une atteinte des cellules épithéliales alvéolaires et notamment du canal sodique ENaC.^{38,39} La physiopathologie de l'œdème pulmonaire de reperfusion se caractérise donc par une importante phase exsudative avec réaction inflammatoire et infiltration leucocytaire, augmentation des résistances et pressions pulmonaires, puis constitution d'un œdème pulmonaire non cardiogénique riche en protéines.³⁸⁻⁴⁰ L'importance de l'accumulation alvéolaire de protéines plasmatiques est corrélée avec un plus fort taux de complications chez les sujets transplantés.⁴¹⁻⁴³ L'œdème pulmonaire provoque une altération des échanges gazeux de part et d'autre de la membrane alvéolo-capillaire. L'épithélium alvéolaire exerce par ailleurs une fonction de réabsorption active du liquide éventuellement présent dans l'alvéole pulmonaire.^{40,44} Cette capacité de réabsorption active liquidienne (clairance liquidienne épithéliale) reflète l'état fonctionnel du poumon. Son absence est un signe de mauvais pronostic chez les patients greffés pulmonaires.^{38,43}

Plusieurs marqueurs prédictifs de DPG ont été proposés. Certaines caractéristiques du donneur (âge et antécédent de tabagisme) et du receveur (diagnostic, indice de masse corporel élevé) sont associées à la survenue de cette complication.^{19,45-49} L'hypertension artérielle pulmonaire et une PaO₂ faible avant transplantation sont également étroitement liées à la

DPG.^{45,46,50} Ces critères prédictifs sont à la base des recommandations de sélection des greffons (Table 1).^{14,51} Les critères de l'ISHLT sont basés sur les caractéristiques générales du donneur, les performances des poumons et l'absence de pathologie infectieuse pulmonaire. L'utilisation de ces critères aboutit à la disqualification d'environ 80% des poumons de donneurs.^{1,2} Afin d'augmenter le nombre de poumons acceptables, il est donc nécessaire d'établir de nouveaux critères et d'améliorer la fonction des greffons tout en limitant le risque de survenue d'une DPG. L'évaluation *ex vivo* de poumons a été développée afin de répondre à ces objectifs.

Age < 55ans

Radiographies thoraciques normales

Gaz du sang normaux ($\text{PaO}_2 > 300\text{mmHg}$ avec $\text{FiO}_2 = 1$ et $\text{PEEP} = 5\text{cmH}_2\text{O}$)

Absence de traumatisme thoracique

Absence de signe de sepsis ou de pneumopathie d'inhalation

Absence de sécrétion purulente à la bronchoscopie

Absence de microorganisme à l'analyse des expectorations

Pas d'antécédent de pathologie pulmonaire ou d'infection pulmonaire active

Tabac < 20 paquets année

Compatibilité ABO

Pas d'antécédent de chirurgie cardiopulmonaire

Taille du greffon en adéquation avec le potentiel receveur

Table 1. Critères de sélection d'un greffon pulmonaire. D'après référence¹⁴

3. Développement de la perfusion pulmonaire *ex vivo*

La première transplantation d'un greffon pulmonaire après requalification *ex vivo* a été décrite en 2001 par le professeur Stieg Steen.⁵² Cette technique a depuis connu un essor important et on estime aujourd'hui à plus de 250 patients à travers le monde ayant bénéficié d'une transplantation après évaluation *ex vivo* du greffon.⁵³

La technique d'évaluation *ex vivo* de greffons pulmonaires (*Ex Vivo Lung Perfusion* : EVLP) a pour objectif de maintenir les poumons dans un état physiologique stable avant transplantation. Cet état stable permet à la fois d'évaluer les qualités du greffon mais aussi de préserver l'organe. De plus, la technique d'EVLP permet de reconditionner le greffon, c'est à dire d'améliorer ses capacités physiologiques.⁵³ Le greffon pulmonaire est placé dans une enceinte stérile et perfusé à l'aide d'une circulation extra corporelle (CEC) (Figure 2). Le liquide de perfusion est de composition variable selon les équipes,⁵⁵⁻⁵⁷ mais il possède systématiquement une pression oncotique élevée afin de réduire la formation de l'œdème pulmonaire.⁵³ Les pressions de perfusion sont adaptées afin d'éviter toute lésion hémodynamique.^{58,59} Les poumons sont également ventilés de façon protectrice pour assurer le recrutement de zones d'atélectasie sans induire de lésions pulmonaires.^{60,61} L'ensemble du système d'EVLP permet également de surveiller la température du greffon, les paramètres hémodynamiques et les caractéristiques ventilatoires du poumon. Un filtre à leucocytes peut être ajouté au circuit.⁶²

Depuis la publication de la première patiente transplantée après une procédure d'EVLP,⁵² de nombreuses séries de cas ont été rapportées.^{54,63-75} Le taux de transplantation après évaluation *ex vivo* varie entre 39 et 100%.⁵³ La survie des patients greffés de poumons requalifiés après EVLP est comprise entre 95 et 100% à trois mois.⁵³ Quelques études ont comparé le devenir des patients greffés après EVLP ou après procédure standard en utilisant une méthode quasi expérimentale d'appariement.^{54,71,72,76}

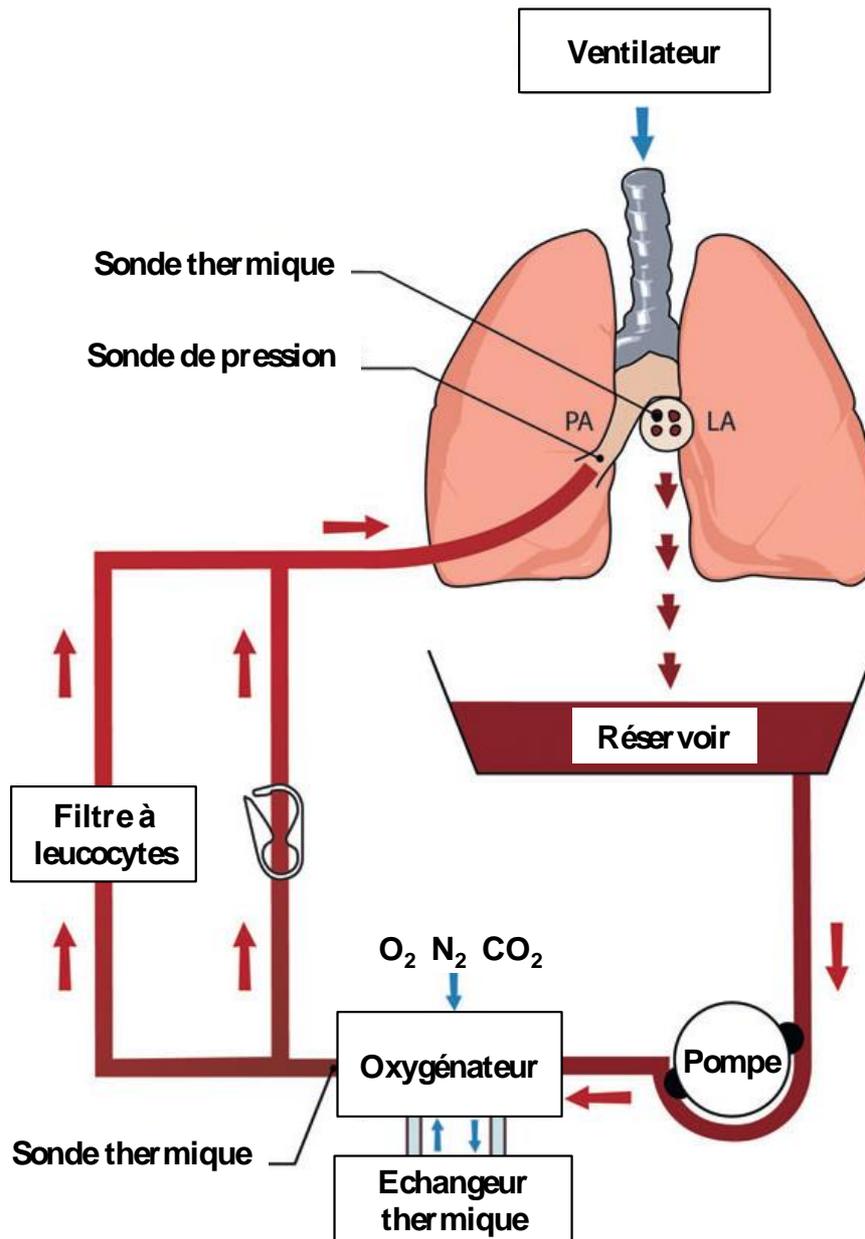


Figure 2. Schéma de la technique d'évaluation pulmonaire *ex vivo* (EVLP).

D'après référence ⁵⁴

Le taux de complications précoces (DPG, infections) ainsi que la mortalité à 30 jours et un an ne semblent pas différentes après EVLP en comparaison avec la procédure standard. Seule une équipe française a montré des durées d'hospitalisation plus longues chez les patients EVLP.⁷¹ Plusieurs études prospectives randomisées sont actuellement en cours afin de

comparer les complications et la mortalité après EVLP par rapport à une procédure standard (NCT01630434 et NCT01365429 notamment).

4. Evaluation du greffon au cours de l'EVLP

L'objectif principal de la procédure d'EVLP est d'évaluer la viabilité d'un greffon, c'est-à-dire de prédire l'absence de dysfonction du greffon s'il est transplanté. Cet objectif est ambitieux car les poumons actuellement évalués par EVLP sont des poumons initialement récusés sur les critères de l'ISHLT (poumons dits « marginaux »).^{54,63-75} Parmi les critères de sélection habituellement utilisés, seule la PaO₂ est applicable à la procédure d'EVLP. Ce critère a donc été logiquement utilisé par toutes les équipes afin de prédire la viabilité du greffon.^{53,64,67,71,77-79} Cependant, Yeung et ses collègues ont montré en 2012 que la caractérisation d'un greffon ne peut pas se baser uniquement sur la PaO₂ au cours de l'EVLP.⁸⁰ En effet, en condition *ex vivo*, la PaO₂ n'est pas étroitement corrélée aux capacités pulmonaires. Du fait de l'utilisation d'un soluté de perfusion sans érythrocyte, le transport de l'O₂ ne s'effectue que sous forme dissoute. Le contenu du perfusat en oxygène est donc réduit et strictement corrélé à la PaO₂.⁸⁰ Ainsi, une PaO₂ élevée ne reflète pas obligatoirement un contenu en oxygène élevé et donc un greffon capable d'une hématose correcte. Yeung et ses collègues ont ainsi montré que des anomalies du rapport ventilation / perfusion (V/Q) ou des shunts intra pulmonaires ne se traduisent pas systématiquement par une diminution de la PaO₂ en condition d'EVLP.⁸⁰ Or, la présence d'une atélectasie, d'une pneumopathie ou d'un œdème pulmonaire sont responsables de l'apparition d'un shunt. La détection d'un œdème pulmonaire lors de l'EVLP est de première importance puisqu'il s'agit d'une des caractéristiques principales de la DPG.¹⁵ En résumé, la PaO₂ ne peut pas être le seul critère de jugement de la viabilité d'un greffon au cours de l'EVLP du fait de l'absence ou du nombre réduit d'érythrocytes dans le liquide de perfusion.^{57,80,81}

Les paramètres hémodynamiques ont également été étudiés en tant que marqueurs de viabilité des greffons. En effet, l'élévation des pressions et des résistances vasculaires pulmonaires sont parmi les premiers indicateurs de mauvais état physiologique du greffon.^{14,80} Ainsi, plusieurs équipes pratiquant l'EVLP recommandent d'adapter le débit de la CEC pour ne pas dépasser des pressions pulmonaires de 20 mmHg et limiter ainsi la survenue d'un œdème pulmonaire.^{53,66} Yeung et ses collègues ont d'ailleurs montré que les résistances vasculaires pulmonaires sont augmentées dès le début de l'EVLP lorsque les poumons sont lésés.⁸⁰ Cependant, les RVP diminuent progressivement au cours de l'EVLP pour atteindre des niveaux identiques observés sur poumons sains. Par ailleurs, il n'existe pas de valeur seuil de RVP pour sélectionner les poumons. La sélection des poumons viables à partir des paramètres hémodynamiques pulmonaires s'effectue donc de façon empirique et repose essentiellement sur la stabilité ou la décroissance des RVP lors de l'EVLP.⁵³

D'autres biomarqueurs, notamment métaboliques, ont été étudiés. Une consommation élevée de glucose durant l'EVLP serait associée à une détérioration des performances du greffon et à la survenue d'un œdème pulmonaire.⁸² L'augmentation de la consommation de glucose traduirait un métabolisme accru du poumon lié à l'inflammation et aux processus actifs de réabsorption de l'œdème pulmonaire.⁸²⁻⁸⁴ Cependant, aucune valeur seuil de consommation de glucose n'a été proposée afin de juger de la viabilité des organes. La concentration de lactate n'est quant à elle pas corrélée au degré de lésions pulmonaires.⁸⁵ Le succès de la transplantation pulmonaire n'est pas prédit par la concentration de lactate au cours de la procédure d'EVLP. La concentration de lactate dans le perfusat n'est que le reflet de la production physiologique pulmonaire en l'absence d'organe assurant la clairance du lactate.^{85,86}

Des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydatif, prédictifs de la DPG lors de transplantations selon la procédure standard, ont également été évalués en tant que facteurs

prédictifs de la viabilité des greffons après EVLP. L'inflammation et le stress oxydatif sont les mécanismes princeps de la DPG et une détection précoce de ces évènements permettrait de sélectionner les greffons au cours de l'EVLP.¹⁵ La concentration de certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) est augmentée en période post transplantation et est corrélée avec l'incidence de DPG.⁸⁷⁻⁸⁹ Sur modèles animaux d'EVLP, la concentration de ces mêmes cytokines est significativement plus élevées dans le perfusat et le liquide de lavage broncho-alvéolaire de poumons lésés.^{58,90-93} Néanmoins, ce résultat varie selon les modèles utilisés.^{94,95} Quatre essais sur poumons humains ont essayé d'établir des profils biochimiques de poumons viables pour la transplantation (résultats résumés en Table 2).⁹⁶⁻⁹⁹ Les résultats de ces études sont aléatoires. En effet, il existe une variabilité importante des capacités de détection des molécules d'intérêt (Table 2). De plus, les variations de concentrations de certaines cytokines ne sont pas identiques selon les études (IL-1 β et IL-6).

Seule la concentration d'IL-8 est invariablement augmentée en cas de lésions pulmonaires. Machuca et ses collègues ont montré que la concentration d'IL-8 possède une aire sous la courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) de 93% pour prédire la DPG de stade 3.⁹⁸ Une valeur seuil de concentration d'IL-8 à 84 pg/ml possède une sensibilité de 86% et une spécificité de 93% pour la détection d'une DPG stade 3.⁹⁸

Enfin, certains marqueurs indirects de l'œdème pulmonaire pourraient prédire la viabilité des greffons. Ainsi, l'endothéline-1 (ET-1) a été étudiée comme marqueur de l'œdème pulmonaire au décours de l'EVLP.⁹⁹ En effet, il existe une corrélation étroite entre les concentrations d'ET-1 et la vasoconstriction artérielle pulmonaire.¹⁰⁰ L'ET-1 inhibe également certains canaux sodiques épithéliaux et diminue la clairance liquidienne alvéolaire.¹⁰¹ Enfin, l'ET-1 favorise la production de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de neutrophiles.¹⁰² En condition d'EVLP, la concentration d'ET-1 est augmentée et prédit la survenue d'une DPG stade 3.

Table 2. Variations des concentrations de protéines et de cytokines au cours de l'EVLP.D'après ⁹⁶⁻⁹⁹.

Biomarqueurs	Résultats	Références
IL-1 β	Augmenté après 12h d'EVLP Pas de variation en cas de DPG3	Sadaria et al. 2011 Machuca et al. 2015
IL-4	Pas de variation après 12h d'EVLP Non détectable	Sadaria et al. 2011 Machuca et al. 2015
IL-6	Augmenté après 6h et 12h d'EVLP Augmenté en cas de DPG3	Sadaria et al. 2011 Machuca et al. 2015
IL-7	Pas de variation après 12h d'EVLP Non détectable	Sadaria et al. 2011 Machuca et al. 2015
IL-8	Augmenté après 6h et 12h d'EVLP Augmenté en cas de DPG3	Sadaria et al. 2011 Machuca et al. 2015
IL-10	Augmenté en cas de DPG3	Machuca et al. 2015
IL-12	Pas de variation après 12h d'EVLP Non détectable	Sadaria et al. 2011 Machuca et al. 2015
G-CSF	Augmenté après 6h et 12h d'EVLP Pas de variation en cas de DPG3	Sadaria et al. 2011 Machuca et al. 2015
GM-CSF	Diminué après 6h et 12h d'EVLP Pas de variation en cas de DPG3	Sadaria et al. 2011 Machuca et al. 2015
INF- γ	Pas de variation après 12h d'EVLP Pas de variation en cas de DPG3	Sadaria et al. 2011 Machuca et al. 2015
MCP-1	Augmenté après 6h et 12h d'EVLP Pas de variation en cas de DPG3	Sadaria et al. 2011 Machuca et al. 2015
MIP-1 β	Pas de variation après 12h d'EVLP Augmenté en cas de DPG3	Sadaria et al. 2011 Machuca et al. 2015
TNF- α	Pas de variation après 12h d'EVLP Non détectable	Sadaria et al. 2011 Machuca et al. 2015
cGMP	Diminué en cas de poumon non viable	Georges et al. 2013
eNOS	Diminué en cas de poumon non viable	Georges et al. 2013

La concentration en protéine Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE) est également augmentée en cas d'évaluation *ex vivo* de poumons présentant une clairance liquidienne alvéolaire diminuée.^{39,103} RAGE est une protéine exprimée par les cellules épithéliales alvéolaires de type 1.^{104,105} La production de RAGE est stimulée par l'inflammation et est un reflet de l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire.³⁹ Plusieurs études ont démontré que la concentration de RAGE est significativement corrélée à la survenue de complications post greffe, notamment de DPG.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Néanmoins, aucune étude n'a pour l'heure corroboré ce résultat en condition d'EVLP.

En résumé, plusieurs biomarqueurs permettraient de prédire la viabilité du greffon. Néanmoins, l'utilisation de ces biomarqueurs présente plusieurs limites dont la principale est l'absence de résultat en temps réel. En effet, la détermination de la concentration des biomarqueurs impose un délai avant résultat ce qui semble peu compatible avec la procédure d'EVLP. Notamment, l'utilisation de ces biomarqueurs ne permettrait pas d'évaluer en temps réel l'évolution du greffon au cours de l'EVLP.

Il n'existe donc pas de consensus sur la sélection des greffons au cours de l'EVLP. L'interprétation de la PaO₂ est soumise à caution et aucun biomarqueur n'a prouvé son utilité en pratique clinique. La sélection des greffons repose donc actuellement sur des protocoles établis au sein de chaque équipe pratiquant l'EVLP.^{53,64,66,76,109} Un rapport PaO₂/FiO₂ > 350 – 400mmHg, des pressions artérielles pulmonaires stables ou en décroissance, une compliance pulmonaire stable ou en augmentation et des pression des voies aériennes stables ou en décroissance sont les critères les plus couramment utilisés.^{53,63,64,66} La compliance pulmonaire et les pressions des voies aériennes sont utilisées en tant que marqueurs de l'œdème pulmonaire. En effet, la présence d'un œdème interstitiel et alvéolaire se traduit par une augmentation des pressions pulmonaires et une diminution de la compliance au cours de l'EVLP.⁸⁰ L'utilisation de ces marqueurs de viabilité des greffons se traduit par un taux de

transplantation post EVLP très variable, entre 39% et 100% selon les séries publiées. Une harmonisation des pratiques et la définition de critères consensuels de transplantation post EVLP sont donc nécessaires. La description de nouveaux biomarqueurs, disponibles en temps réel et non invasifs, permettrait de faciliter la sélection des greffons à transplanter.

B. Monoxyde de Carbone et transplantation pulmonaire

1. Généralités

Le monoxyde de carbone est un gaz inerte de faible masse molaire (28,01 g/mol) dont la solubilité dans l'eau est de 2,3 ml/100mL à 20°C. Ce gaz inodore et incolore est bien connu pour ses effets toxiques identifiés pour la première fois en 1857 par Claude Bernard.¹¹⁰ La production endogène de CO par l'organisme humain est quant à elle moins bien connue et fut décrite en 1952 par Sjostrand.¹¹¹ Cette découverte modifia radicalement la compréhension des phénomènes physiopathologiques liés à l'inhalation de CO et permît de comprendre les effets cellulaires de l'intoxication au CO.^{112,113} Par ailleurs, la description d'une production endogène de CO ouvrit la porte à de nombreuses recherches sur le rôle physiologique du CO en tant que molécule de signalisation.

La production endogène de CO provient quasi exclusivement de la dégradation de l'hème en biliverdine (Figure 3). L'oxydation de molécules organiques et la peroxydation lipidique sont responsables de moins de 15% de la production de CO.^{114,115}

L'hème oxygénase (HO) catalyse la dégradation de l'hème. Cette réaction est caractérisée par trois oxydations successives qui requièrent de l'oxygène et un équivalent réductif (NADPH).^{116,117} Le CO est produit lors de la dernière oxydation de l'hème.^{117,118}

StRE induit la promotion de *HMOX-1*.^{133,134} A l'état stable, la translocation nucléaire de Nrf2 est bloquée par la formation d'un complexe avec Keap1 (Kelch-like erythroid cell-derived associated protein). L'oxydation ou la dégradation de Keap1 permet la libération de Nrf2, sa translocation et la promotion de *HMOX-1*.¹³⁴ D'autres éléments de réponses participent à la régulation de *HMOX-1* notamment l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE : hypoxia response element), l'élément de réponse aux protéines de choc (HSE : heat shock element), l'élément de réponse à l'adénosine monophosphate cyclique (CRE : cAMP responsive element) et l'élément de réponse aux antioxydants (ARE : antioxidant response element).¹²⁰ Ces nombreux éléments de réponses présents sur *HMOX-1* expliquent en partie la multitude de stress induisant l'expression de HO-1.¹²⁰ Parallèlement à ces mécanismes de régulation, le polymorphisme de la région promotrice et la présence de micro ARN interagissant avec les facteurs de transcription participent au contrôle de l'expression de *HMOX-1*.¹³⁵⁻¹³⁸

L'activité de HO induit la formation de CO lors de la dégradation de l'hème. La quantité d'hème présente dans l'organisme ne constitue pas un facteur limitant de cette réaction.¹²⁰ La production endogène de CO est estimée, à l'état basal, à environ 0,42 ml/h.^{139,140} La majorité du CO produit par l'organisme se fixe à des métallo protéines, notamment l'hémoglobine.^{113,141} L'affinité du CO pour l'hémoglobine est 220 fois supérieure à celle de l'oxygène, cette même affinité étant 29 et 2,5 fois celle de l'oxygène pour la myoglobine et le cytochrome C oxydase.^{142,143} La majeure partie du CO de l'organisme est stockée au niveau de l'hémoglobine. En absence de stress, la carboxyhémoglobine représente 0,4 à 1 % de l'hémoglobine totale.^{139,144,145} L'élimination du CO s'effectue à plus de 95 % au niveau pulmonaire.¹⁴⁶ Le CO peut également être oxydé en CO₂ par le cytochrome C oxydase au niveau de la mitochondrie.^{147,148} La demie vie du CO en condition normale est estimée à 190min,¹⁴⁹ mais elle peut être bien inférieure dans certaines conditions d'hyperventilation,¹⁵⁰ d'acidose métabolique,¹⁴⁶ d'augmentation du débit cardiaque¹⁵¹ et d'hyperbarie.¹⁵²

2. Ischémie reperfusion, hème oxygénase et monoxyde de carbone

La production de CO endogène peut être dramatiquement augmentée dans certaines conditions de stress. L'induction de HO-1 et l'augmentation de son activité enzymatique provoquent une dégradation accrue de l'hémoglobine et donc la production de CO.¹²⁰ Les rayonnements ultraviolets,¹⁵³ les métaux lourds,^{154,155} mais aussi les lipopolysaccharides,^{131,156} le stress oxydant¹⁵⁷ et l'hyperoxie^{132,158} augmentent l'activité de HO-1 et la production endogène de CO. Les lésions d'ischémie reperfusion induisent également l'expression de HO-1 (Figure 4).^{37,128,159,160}

En situation d'ischémie reperfusion, les voies de signalisation qui conduisent à l'activation de HO-1 sont multiples.¹²⁰ A la phase précoce, l'hypoxie génère l'activation de HIF (hypoxia inducible factor) et de AP-1 (activator protein 1). Ces deux facteurs de transcription se fixent sur HRE au niveau de la zone promotrice de *HMOX-1* et induisent la formation de HO-1.^{161,162} L'ischémie reperfusion favorise également la translocation de NFκB qui se fixe sur la région promotrice de HO-1.¹⁶³ La diminution de la pression en oxygène, la présence de cytokines pro inflammatoires (IL-1, IL-6, TNFα)¹⁶⁴⁻¹⁶⁷ et de facteurs de croissance (transforming growth factor) activent la cascade des mitogen activated protein kinases (MAPK : p38, ERK et JNK) aboutissant à la translocation nucléaire de Nrf2 et à la transcription de HO-1.¹⁶⁸ Par ailleurs, la production d'espèces réactives de l'oxygène contribue à la régulation de HO-1 en condition d'ischémie reperfusion.¹⁶¹ L'induction de NO est également un puissant promoteur de HO-1. NO provoque l'augmentation de sGC (soluble Guanylate Cyclase) et la formation de cGMP (cyclic guanosine monophosphate) qui elle-même conduit à l'activation de HO-1.^{169,170} Enfin, il existe un rétrocontrôle négatif de l'expression de HO. L'hème induit la translocation nucléaire du facteur de répression Bach-1 qui se fixe sur StRE et permet donc de contrôler l'activation de HO.^{171,172}

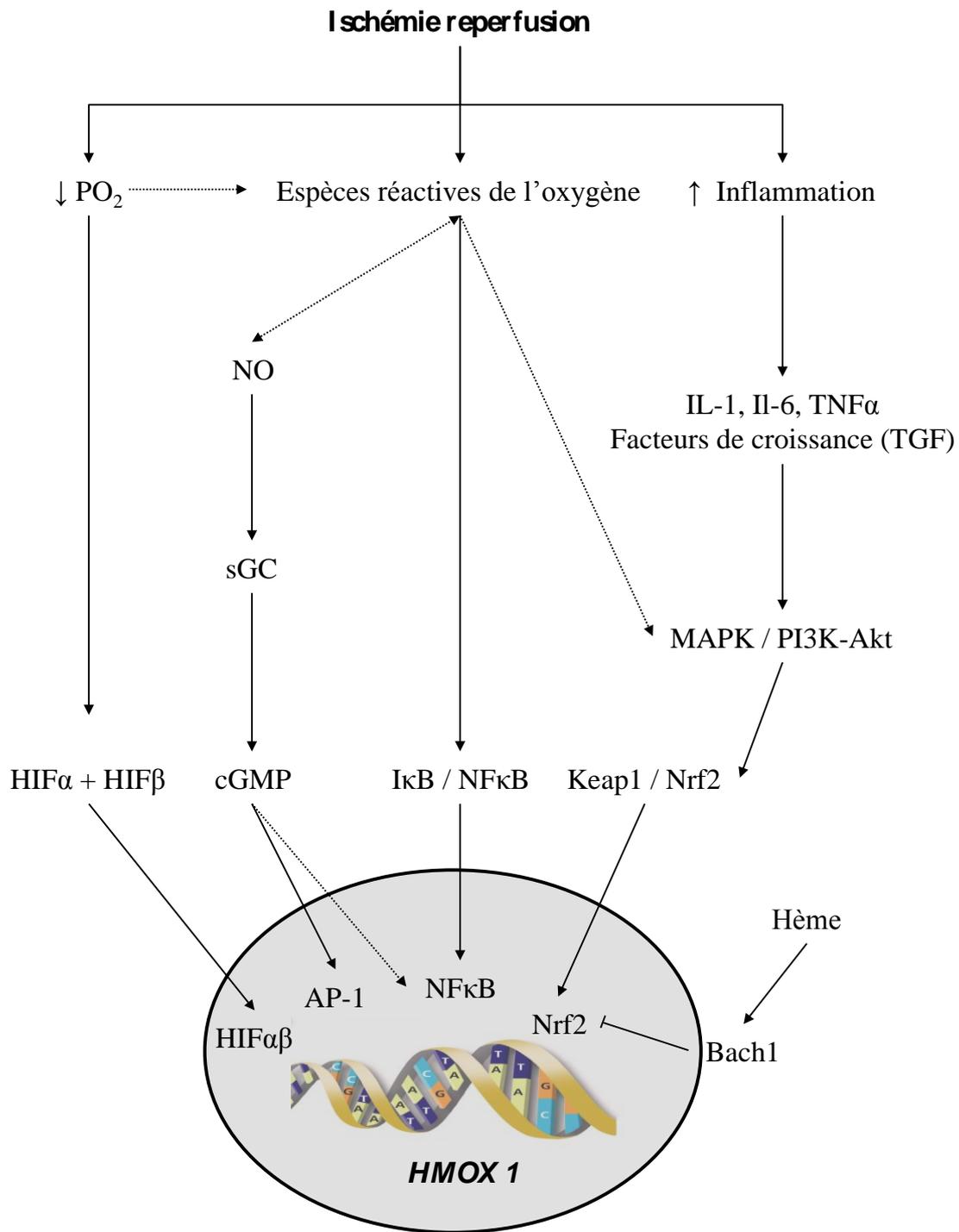


Figure 4. Voies de signalisation conduisant à l'activation de *HMOX-1* en situation d'ischémie reperfusion. (Les abréviations sont définies dans le texte).

Il existe peu de données disponibles sur les concentrations de CO en situation d'ischémie reperfusion. De nombreuses études se sont en effet intéressées à la mesure des concentrations en CO lors d'un sepsis,¹⁷³ d'inflammation ou d'infections pulmonaires,¹⁷⁴⁻¹⁸² de chirurgie ou chez des patients de réanimation.¹⁸³⁻¹⁸⁷ Les quelques résultats concernant l'ischémie reperfusion ont été obtenus chez le rat ou chez l'humain après chirurgie cardiaque et/ou transplantation hépatique. Ainsi, la concentration en CO est augmentée après 45 min de ligature de l'artère rénale chez le rat.¹⁸⁸ Chez l'humain, deux études ont démontré que la concentration en CO exhalé (eCO) est augmentée après transplantation hépatique et est corrélée avec l'intensité des lésions d'ischémie reperfusion.^{189,190} Cependant, la corrélation entre eCO et le devenir des patients est discordante selon les études.^{189,190} Enfin, Schober et ses collègues ont montré que la concentration en CO exhalé est augmentée après mise en place d'une circulation extracorporelle lors d'une chirurgie cardiaque.¹⁹¹

La production de CO n'est pas qu'un simple reflet de l'activité de HO et des lésions d'ischémie reperfusion. Le CO induit de nombreuses cascades de signalisation et joue le rôle de véritable messager endogène (Figure 5).¹²⁸ Ainsi, il possède des propriétés à la fois anti inflammatoire, anti apoptotique, anti proliférative et de vasodilatation.^{120,128} La principale voie de signalisation induite par le CO concerne sGC et cGMP. Le CO se fixe directement sur sGC et l'active ce qui provoque une augmentation de la production de cGMP.^{192,193} L'axe sGC/cGMP induit directement une vasodilatation et, par l'intermédiaire de l'inhibition de PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1), une fibrinolyse.^{192,194-197} La vasodilatation dépend à un moindre degré de l'activation de canaux K⁺ dépendant du Ca⁺⁺ (K_{ca}) et de l'inhibition du cytochrome P450.^{196,198} L'augmentation de cGMP participe également aux propriétés anti inflammatoires du CO, notamment grâce à l'inhibition de erg-1 (early growth response-1).¹⁹⁹⁻²⁰¹ L'axe sGC/cGMP active aussi la voie de p38 MAPK et inhibe la prolifération cellulaire.^{202,203}

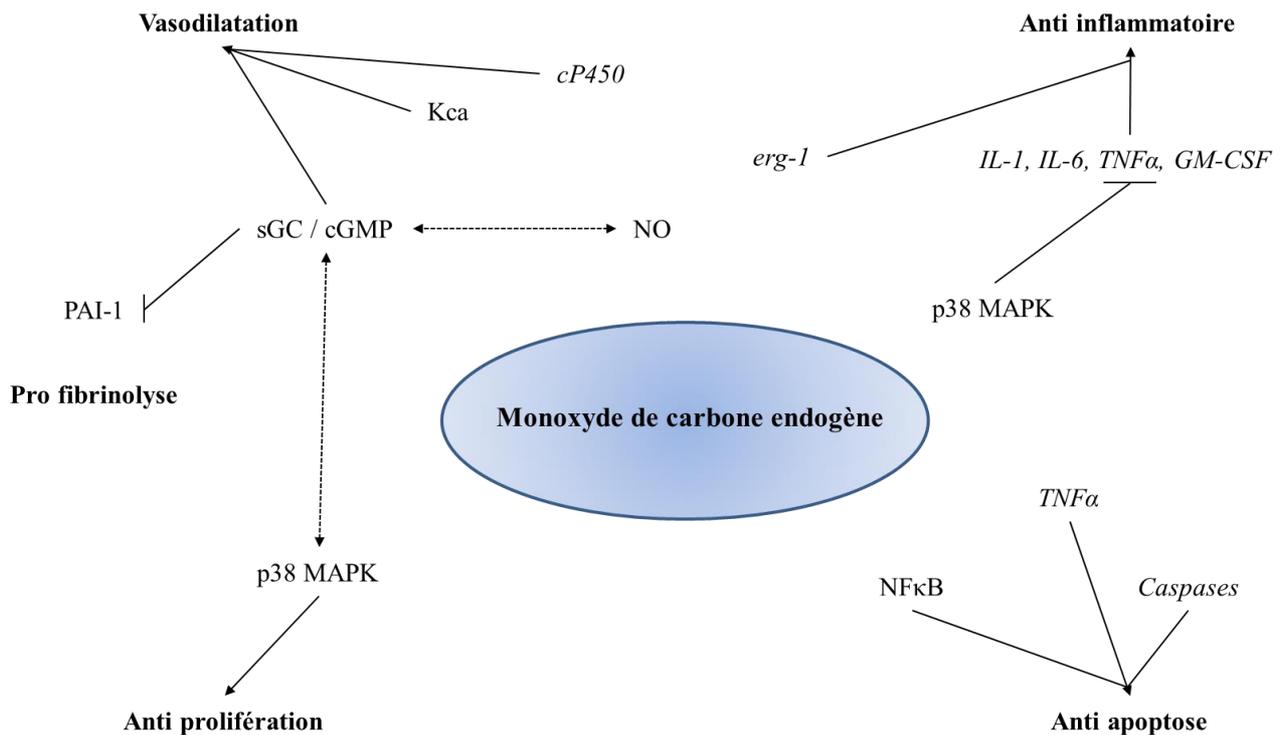


Figure 5. Voies de signalisation induite par le monoxyde de carbone.

La voie des MAPK constitue l'autre mode d'action principal du CO. p38 MAPK inhibe l'activation des caspases et permet la translocation nucléaire de NFκB et la transcription de gènes anti apoptose.²⁰⁴⁻²⁰⁶ L'inhibition de l'apoptose est également dépendante de l'inhibition directe et indirecte de TNFα.²⁰⁷ L'activation de la voie p38 MAPK est responsable des effets anti inflammatoires du CO. IL-1, IL-6, TNFα ainsi que le facteur de croissance GM-CSF sont réprimés par cette cascade de signalisation.²⁰⁸⁻²¹¹ Enfin, il existe une interaction entre NO et CO notamment en termes de vasorégulation et d'inflammation.¹²⁰ L'activation de sGC/cGMP par le CO pourrait jouer un rôle compétitif vis-à-vis du NO.²¹² En résumé, le CO endogène n'est pas un simple produit de dégradation et il joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire, notamment en situation d'ischémie reperfusion. Ses propriétés en font un agent pharmacologique à fort potentiel pour la prévention et le traitement des lésions d'ischémie reperfusion.

L'administration de CO peut s'effectuer selon trois modes. La plus ancienne technique consiste en l'inhalation d'un gaz enrichi en CO (habituellement 250 à 500ppm).^{213,214} Plus récemment, des molécules capables de transporter et délivrer de faibles quantités de CO ont été développées.²¹⁵⁻²¹⁷ Appelées CORM, pour « CO releasing molecules », elles sont constituées d'un complexe alliant un métal de transition lié à des molécules de CO.²¹⁷ Enfin, la transfusion de sang avec une hémoglobine partiellement saturée en CO a été utilisée à quelques reprises.^{218,219} L'administration de CO pour traiter des lésions d'ischémie reperfusion a été pratiquée sur de nombreux modèles pré cliniques. Après ischémie reperfusion du foie, l'administration de CO diminue les résistances portales, réduit la concentration de cytokines pro inflammatoires et la production d'espèces réactives de l'oxygène, diminue les marqueurs d'apoptose et améliore la fonction des hépatocytes.²²⁰⁻²²⁴ L'inhalation de CO réduit également les lésions d'ischémie reperfusion du rein en augmentant la pression de perfusion rénale, en diminuant la production de messagers de mort cellulaire (DAMP : damage associated molecular pattern) et en inhibant l'apoptose.²²⁵⁻²²⁷ Le traitement par CO se traduit par une augmentation de la clairance de la créatinine et du débit urinaire.²²⁸⁻²³¹ Les effets bénéfiques de l'administration de CO ont également été démontrés dans des modèles d'ischémie reperfusion des intestins,^{232,233} du myocarde,^{205,234-238} des vaisseaux²⁰² et de la rétine.²³⁹⁻²⁴¹ Par ailleurs, l'utilisation du CO dans le traitement des lésions d'ischémie reperfusion de la greffe a fait l'objet de nombreuses études chez l'animal.²⁴² Les résultats de ces études sont univoques et plaident largement en faveur d'un traitement par CO.^{202,230,233,243-}²⁵⁰ Néanmoins, il n'existe pas à l'heure actuelle d'essai thérapeutique chez l'homme dont les résultats ont été publiés.

3. Monoxyde de carbone et ischémie reperfusion pulmonaire

Les données concernant HO, CO et ischémie reperfusion pulmonaire sont nombreuses. HO-1 et HO-2 sont présents dans les cellules pulmonaires endothéliales et épithéliales.²⁵¹⁻²⁵⁴ L'expression pulmonaire de HO-1 par les cellules épithéliales est notamment augmentée par l'ischémie reperfusion (Figure 6).²⁵⁵ En situation de stress, HO-1 est également produit en grande quantité par les macrophages présents au niveau pulmonaire.^{251,256} Chez le rat déficient en HO-1 (*hmx-1*^{-/-}), les lésions pulmonaires induites par une ischémie reperfusion sont augmentées et provoquent le décès plus souvent que chez des rats contrôles.²⁵⁷ L'inhalation de CO chez les rats *hmx-1*^{-/-} empêche le décès des animaux et réduit les lésions d'ischémie reperfusion notamment grâce à l'activation de l'axe sGC/cGMP et l'inhibition de PAI-1.²⁵⁷ L'administration de CO après ischémie reperfusion pulmonaire supprime l'activation de la voie ERK et l'expression du facteur de transcription egr-1.²⁵⁸ Les dépôts de fibrine et la leucostase sont ainsi diminués après inhalation de CO. Le CO réduit également l'apoptose post ischémie reperfusion pulmonaire principalement grâce à l'inhibition de la voie des caspases et de TNF α .^{37,259-262} L'administration de CO diminue la concentration pulmonaire de cytokines pro inflammatoires post ischémie reperfusion et inhibe l'expression de ET-1 au niveau des cellules endothéliales pulmonaires.²⁶²⁻²⁶⁴ L'action anti inflammatoire du CO au niveau pulmonaire semble être majoritairement liée à l'activation de la voie des MAPK.^{263,264} L'ensemble des mécanismes de protection conférés par le CO aboutit à une amélioration des capacités physiologiques pulmonaires après ischémie reperfusion, et notamment une amélioration de l'hématose.²⁶⁵

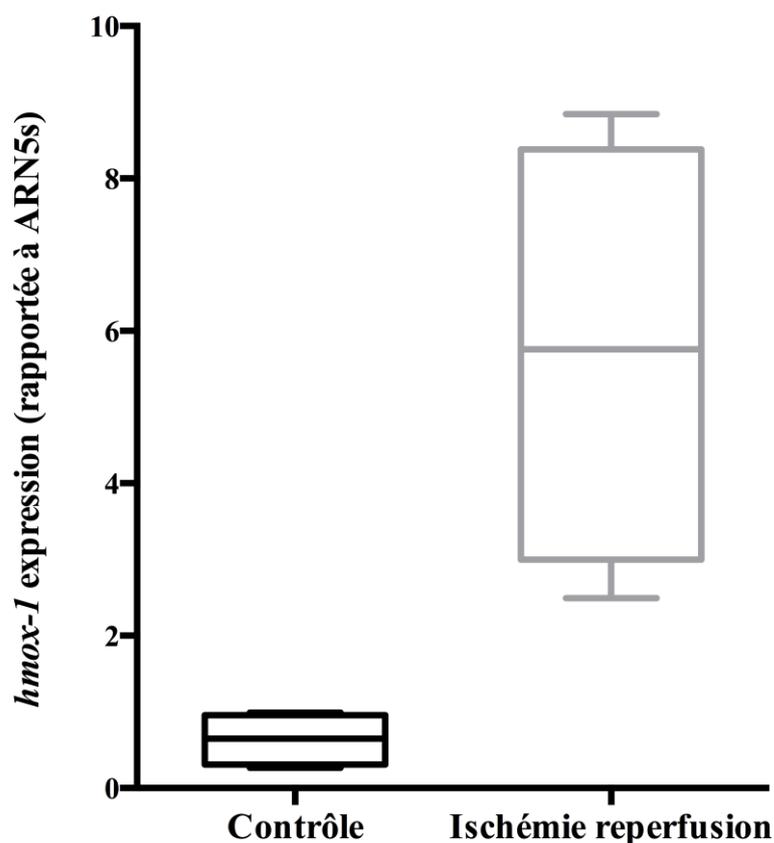


Figure 6. Expression de *hmx-1* chez le rat en situation contrôle et après ischémie reperfusion (ligature de l'artère pulmonaire droite). P=0.02. Données personnelles non publiées.

L'administration de CO dans l'objectif de réduire les lésions d'ischémie reperfusion post greffe pulmonaire a été largement étudiée chez l'animal.^{258,262,264,266-271} Les résultats des études sont résumés dans la table 3.

Toutes les études précliniques d'administration de CO avant, pendant ou après la greffe pulmonaire montrent une amélioration de la fonction pulmonaire, une diminution de l'apoptose et des marqueurs inflammatoires. Un essai thérapeutique chez l'homme est actuellement en cours. Il consiste en l'administration randomisée en double aveugle de CO à 250 ppm ou d'un placebo pendant la procédure d'EVLV (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02032082).

Modèle animal	Traitement	Résultats	Références
Rat Mort encéphalique	CO 250ppm chez le receveur	Amélioration de l'hématose Amélioration de la compliance pulmonaire Diminution du rapport poids humide / poids sec Diminution de l'apoptose, de TNF α et IL-8	Zhou et al. 2011
Porc Modèle de rejet par mismatch	CO 1%	Rejet du greffon retardé Diminution de IL-1 β et IL-6	Sahara et al. 2010
Rat Mort encéphalique	CO 250 ou 500ppm chez le donneur	Amélioration PaO ₂ /FiO ₂ Diminution de l'apoptose, de TNF α et IL-6 Effets de 500ppm > 250ppm	Zhou et al. 2008
Rat Greffé orthotopique	CO 5% ou 100% dans la solution de conservation	Amélioration de l'hématose Diminution de l'apoptose, du recrutement des macrophages et de la leucostase Diminution de TNF α , IL-1 β et IL-6	Kohmoto et al. 2008
Rat Greffé orthotopique	CO 250ppm chez le donneur et le receveur	Amélioration de l'hématose Diminution du recrutement des macrophages et de la leucostase Diminution de TNF α , IL-1 β et IL-6	Kohmoto et al. 2007
Rat Greffé orthotopique	CO 250ppm donneur et receveur	Amélioration de l'hématose Diminution de TNF α , IL-1 β et IL-6	Kohmoto et al. 2006
Rat Mort encéphalique + EVLP	CO 500ppm donneur, circuit EVLP et receveur	Amélioration de l'hématose Diminution du rapport poids humide / poids sec Diminution de IL-1 β et IL-6	Dong et al. 2013
Rat Greffé orthotopique	CO 500ppm chez le receveur	Diminution de l'apoptose Diminution de IL-6	Song et al. 2003
Rat Greffé orthotopique	CO 1000ppm chez le donneur	Diminution des résistances vasculaires pulmonaires Amélioration de l'hématose Diminution de TNF α et IL-1 β	Mishra et al. 2006

Table 3. Récapitulatif des études précliniques d'administration de CO lors de transplantation pulmonaire.

Contrairement aux essais thérapeutiques de CO, peu de données sont disponibles sur la mesure du CO exhalé en tant que marqueur de l'état physiologique du poumon post greffe. Chez le rat transplanté, eCO est plus élevé après une ischémie chaude de 3h en comparaison à une ischémie froide de 3h.²⁷² Cette différence indiquerait une inflammation accrue après 3h d'ischémie chaude. Chez les patients transplantés, eCO est augmenté lors de la survenue d'une bronchiolite oblitérante après transplantation pulmonaire.²⁷³ Vos et ses collègues ont montré une corrélation entre eCO et le pourcentage de neutrophiles et la concentration de

cytokines pro inflammatoires dans le liquide de lavage broncho alvéolaire (LBA) de patients suivis à distance de la transplantation.²⁷⁴ Cependant, ces résultats ont été récemment contredits par Cameli et ses collègues qui ne trouvent pas d'augmentation d'eCO chez les patients présentant une bronchiolite oblitérante.²⁷⁵ De plus, ces auteurs ne montrent pas de différence d'eCO entre des sujets sains contrôles et des patients transplantés.²⁷⁵ La place d'eCO en tant que biomarqueurs des lésions d'ischémie reperfusion après transplantation reste donc débattue. De plus, la détection et la mesure du CO a été décrit comme un facteur limitant son intérêt en tant que biomarqueur.²⁷⁶ Les études cliniques utilisent la chimiluminescence, la chromatographie gazeuse, la spectrométrie de masse ou des capteurs électrochimiques. Cependant ses techniques sont coûteuses ou complexes d'utilisation. Certaines ne permettent pas la mesure en temps réel du CO ou souffrent d'une faible sensibilité.^{277,278}

C. Hypothèses

Le système HO/CO joue un rôle essentiel dans le contrôle des lésions pulmonaires d'ischémie reperfusion. Nous pensons que les lésions observées lors de l'EVLP devraient provoquer une activation de HO et, en conséquence, une augmentation de la production de CO. eCO devrait donc être augmenté à la phase aiguë de la transplantation pulmonaire. Nous pensons ainsi qu'eCO pourrait être un marqueur de l'intensité des lésions pulmonaires. Appliqué à la procédure d'EVLP, eCO pourrait être un biomarqueur de la viabilité des poumons et permettre *in fine* de mieux sélectionner les greffons.

Afin de valider ces hypothèses, nous avons conduit un programme de recherche en deux temps : tout d'abord une méthode de mesure d'eCO au cours d'une procédure d'EVLP était validée, puis les variations d'eCO en fonction de l'intensité des lésions pulmonaires étaient étudiées.

METHODE

II. Méthode

Les expérimentations animales décrites ont obtenu un avis favorable du comité de protection des animaux du Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, La Tronche, France.

A. Description générale de la recherche

Deux campagnes d'expérimentations étaient menées. La première avait pour objectif de valider une mesure d'eCO par spectrométrie laser sur un modèle de poumons porcins évalués *ex vivo* (expérimentation A). La deuxième visait à décrire les variations d'eCO en fonction des lésions d'ischémie reperfusion (expérimentation B). Cette deuxième série d'expérimentations était aussi conduite sur un modèle de poumons porcins évalués *ex vivo*. Afin d'induire des lésions d'ischémie reperfusion d'intensités différentes, les poumons étaient évalués après 30 min (J0) ou après 24 h (J1) d'ischémie froide. La même paire de poumons était évaluée à J0 et à J1 pour sensibiliser la comparaison d'eCO. Ainsi, les poumons étaient séparés au début de l'expérimentation et les poumons gauches et droits étaient aléatoirement étudiés à J0 ou J1.

Le schéma général d'expérimentation était le même entre les deux phases (Figure 7). Les porcs étaient euthanasiés puis une pneumoplégie était réalisée. Le bloc cœur poumon était ensuite prélevé et les cavités cardiaques étaient réséquées. Les poumons étaient alors conservés pendant 30 min ou 24 h à 4 °C. A l'issue de cette ischémie froide, les poumons étaient placés dans une enceinte d'EVLP. Ils étaient ainsi reperfusés et ventilés progressivement jusqu'à obtenir une phase stable d'évaluation. Cette phase stable permettait d'apprécier les paramètres physiologiques des poumons et d'effectuer des mesures biochimiques dans le perfusat et dans le LBA. La mesure d'eCO était débutée dès la reperfusion et se terminait à la fin de l'expérimentation.

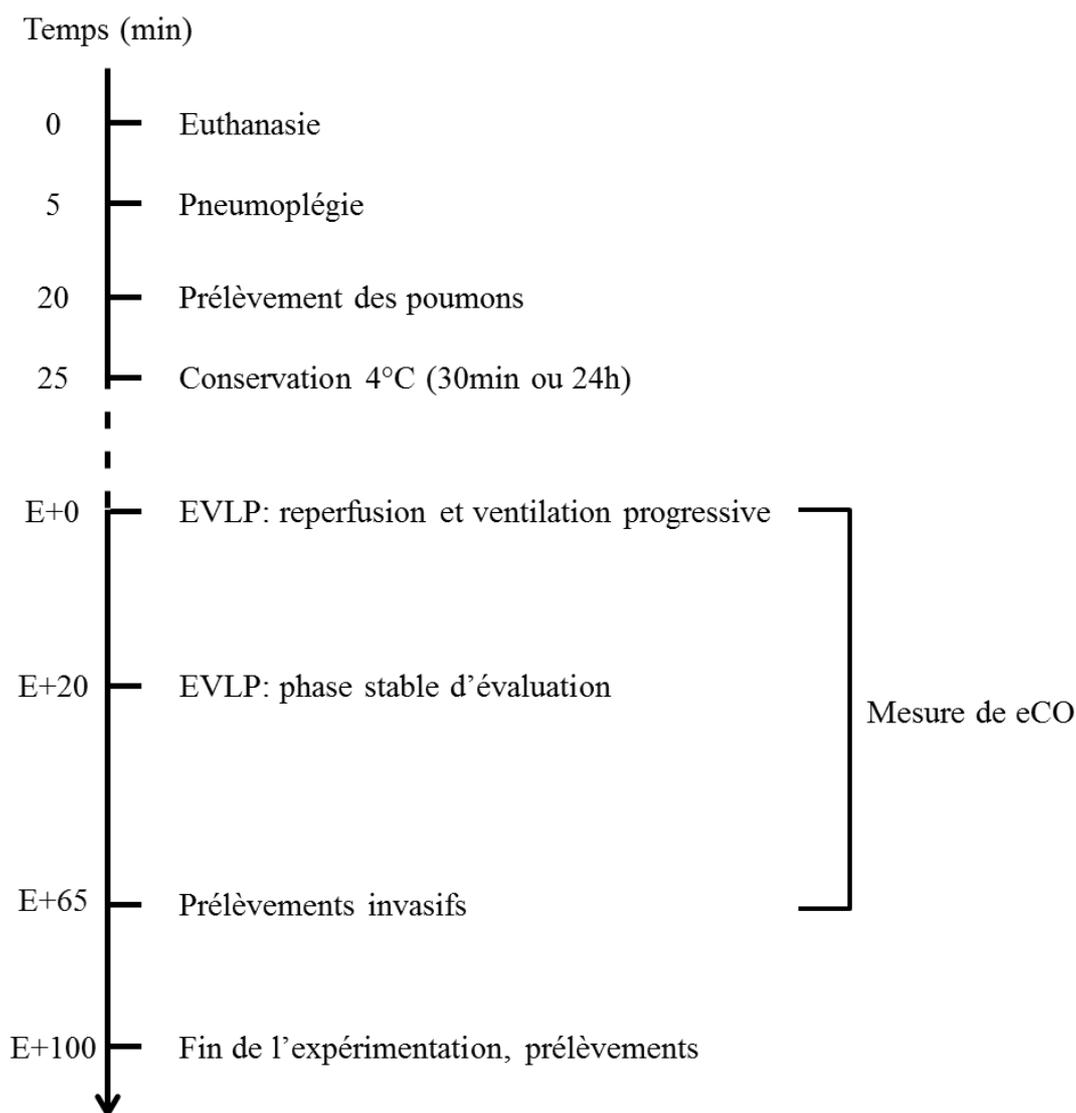


Figure 7. Schéma général des expérimentations.

Le temps est désigné depuis l'euthanasie ou depuis le début de l'EVLP (E+xx).

B. Spectrométrie laser

La mesure d'eCO était effectuée par une technique de spectrométrie laser développée par l'équipe Laser, Molécules et Environnement (LAME) du Laboratoire Interdisciplinaire de Physique (LIPhy) de Grenoble. Cette technique est appelée optical-feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy (OF-CEAS) et a déjà été décrite précédemment.^{279–286}

La mesure par spectrométrie de faibles concentrations de gaz (moins de 1 ppmv) nécessite une grande longueur d'absorption. En effet, la lumière transmise par un milieu suit une loi de décroissance exponentielle (loi de Beer Lambert) :

$$I = I_0 e^{-\alpha L}$$

I est l'intensité sortante

I_0 est l'intensité incidente

L est la longueur d'absorption

α dépend du nombre de molécules par cm^3 et de la surface de section de la cavité d'absorption

Le dispositif OF-CEAS est construit avec une cavité optique résonante à l'intérieur de laquelle circule l'échantillon de gaz (Figure 8). Cette cavité optique est composée de miroirs hautement réfléchissants (réflectivité: $R \sim 99,99\%$) ce qui permet d'obtenir une longueur d'absorption efficace (L_{eff}) de 19 km pour une longueur de cavité (L) d'environ 1 m. La complexité de l'utilisation de miroirs hautement réfléchissants repose sur l'injection d'une quantité suffisante de lumière laser dans la cavité. En effet, la largeur spectrale de la lumière laser est de deux ordres de grandeur plus grands que le profil spectral de la lumière de résonance dans la cavité. Pour surmonter ce problème, la cavité optique est composée de trois miroirs disposés selon une configuration en "V". De cette façon, une fraction de la lumière piégée dans la cavité optique est réfléchi vers le laser, donnant lieu à une "rétroaction optique". En modifiant les spectres d'émission du laser pour correspondre au profil spectral de la lumière piégée dans la cavité, la rétroaction optique fournit une forte puissance de transmission du signal.

Un autre avantage lié à l'utilisation de la technique OF-CEAS est l'absence de calibrage. En effet, cette technique permet d'obtenir des mesures de concentrations absolues sans qu'il ne soit nécessaire de requérir à un étalonnage périodique avec des mélanges de gaz certifiés.

L'absence de calibration est permise par une procédure de normalisation en temps réel de l'absorbance. Cette procédure est basée sur la mesure des pertes de la cavité optique.²⁸⁵ La concentration absolue est calculée en temps réel par l'ajustement des spectres d'absorption acquis sur une petite région spectrale ($\sim 1 \text{ cm}^{-1}$) en balayant les fréquences laser à une vitesse rapide d'acquisition ($\sim 5 \text{ Hz}$). Le plus petit coefficient d'absorption détectable est de plusieurs $10^{-10}/\text{cm}$.

L'acquisition des données sur une région spectrale donnée permet une sélectivité élevée et une mesure simultanée de différents composés. Ceci est un point clé dans l'analyse de l'air expiré puisqu'il est constitué d'un mélange complexe de gaz. Afin d'adapter la technique à la mesure d'eCO, une diode laser émettant autour de $2,3 \mu\text{m}$ était utilisée. Dans cette configuration, la sensibilité pour la mesure du CO était d'environ $0,002\text{ppmv}$ avec un temps d'acquisition de $0,2 \text{ s}$. Les raies d'absorption du méthane (CH_4) se trouvant dans la région spectrale d'intérêt pour le CO, l'instrument permettait également la mesure de ce gaz avec une sensibilité de $0,02\text{ppmv}$ en $0,2\text{s}$.

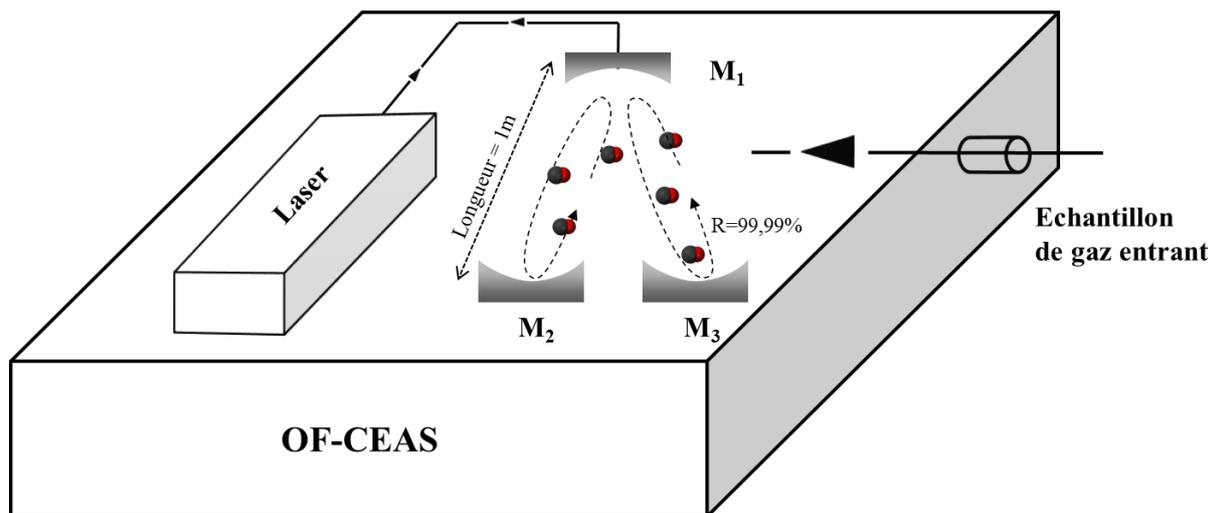


Figure 8. Schéma de l'instrumentation OF-CEAS pour la mesure du CO expiré.

OF-CEAS : optical-feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy

M: miroirs

R: coefficient de réflectivité des miroirs

Concernant le montage expérimental, l'échantillon de gaz était prélevé directement au niveau de l'embout externe de la sonde d'intubation trachéale. L'échantillon était aspiré en continu à l'aide d'une pompe à une vitesse de 100 ml/min avec une pression asservie à 50 mbar. Ces valeurs étaient établies afin d'optimiser le temps de réponse imposé par le taux de purge du gaz à l'intérieur de la cavité optique (volume de la cavité = 18 cm³) d'une part, et par la nécessité de ne pas modifier significativement les volumes de ventilation des poumons (volume minute d'environ 1,7 l/min) d'autre part. L'instrumentation optique était contenue à l'intérieur d'un boîtier de 45x59x13 cm. Un ordinateur portable était connecté au boîtier et permettait le traitement en temps réel et l'enregistrement des données grâce à un logiciel dédié.

C. Technique d'EVLP

Une technique standard d'EVLP était utilisée au cours des expérimentations. Les porcs étaient pré-anesthésiés par 40mg d'azaperone (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) injectés en intramusculaire. Ils étaient ensuite curarisés (1.5 mg/kg de suxaméthonium, Upharm, Boulogne Billancourt, France) par injection intraveineuse au niveau de l'oreille. La sédation était entretenue par une injection intraveineuse continue de pentobarbital (50 mg/kg/h, Chemische Fabrik, Berg, Allemagne). Les porcs étaient alors intubés et ventilés (AS/3 ADU, Datex-Ohmeda, Louisville, Colorado). Le volume courant (V_T) était de 7 ml/kg, la fréquence respiratoire (FR) de 15 /min, la PEEP de 5 cmH₂O et la FiO₂ de 50 %. Une injection intraveineuse de 10 000 unités d'héparine sodique (Sanofi-Aventis, Ploërmel, France) était réalisée. Cinq minutes après cette injection, les animaux étaient euthanasiés (pentobarbital 25

mg/kg et chlorure de potassium 5 g IV). Les poumons étaient alors manuellement gonflés grâce à la valve de pression du respirateur réglée à 10 cmH₂O et la sonde d'intubation était clampée.

Une sternotomie médiane était pratiquée et la veine cave inférieure et l'aorte étaient clampées. La vascularisation pulmonaire était rincée (pneumoplégie) par un litre de Perfadex à 4 °C (Vitrolife AB, Gothenburg, Suède) tamponnée avec du trométamol isotonique (Addex-THAM, Kabi, Suède) perfusé directement dans le ventricule droit. Le ventricule gauche était sectionné au niveau des valves mitrales afin de permettre un écoulement passif du liquide. Après environ 15 min de pneumoplégie, le bloc cœur-poumon était prélevé. Les poumons avec leur vascularisation étaient individualisés. Ils étaient ensuite stockés à 4 °C pendant 30 min (expérimentation A) ou étaient séparés au niveau de la bronche principale et de l'artère pulmonaire pour être conservés à 4 °C soit pendant 30 min soit pendant 24 h (expérimentation B).

Après ischémie froide, les poumons étaient placés dans un réservoir en plexiglass (Vitrolife AB, Gothenburg, Suède). L'artère pulmonaire était canulée (calibre 20-F, Terumo, Ann Arbor, USA) et connectée à une circulation extracorporelle (CEC) comprenant un oxygénateur et un échangeur de chaleur. La trachée ou la bronche principale étaient intubées. Le circuit de CEC contenait 2,8 L de solution de Krebs associée à 5 % d'Albumine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) et 2 mg/L de trinitrine (Sanofi-Aventis, France). Ce perfusat était tamponné par du trométamol afin d'obtenir un pH physiologique. La pression osmotique colloïdale du perfusat était de 20 mmHg. Un capteur de pression (Baxter, Uden, Pays-Bas) était inséré dans l'artère pulmonaire. Deux capteurs de température étaient utilisés : l'un (Sorin Group, Arvada, USA) était connecté à l'oxygénateur membranaire, l'autre (Integral Process, Conflans, Sainte Honorine, France) était placé à la sortie des veines pulmonaires.

L'oxygénateur de la CEC permettait un apport en oxgaz. Les capteurs permettaient des mesures en continu (Biopac, Santa Barbara, CA, USA).

Les poumons étaient progressivement reperfusés jusqu'au débit cardiaque théorique de 70 ml/kg/min. Les débits de reperfusion initiaux étaient lents (30 ml/min) et la température du perfusat initiale de 25 °C. Les débits étaient progressivement augmentés avec comme consigne de respecter une pression artérielle pulmonaire (PAP) inférieure à 25 mmHg. La température du perfusat était augmentée en parallèle. De l'oxygène (2 l/min) et un mélange de CO₂ et d'azote (7 % CO₂, 93 % N₂, 2 l/min) étaient ajoutés au perfusat grâce à l'oxygénateur. Lorsque la température du poumon atteignait 32 °C, le tube trachéal était connecté au respirateur et la ventilation était initiée à 20 ml et augmentée graduellement pour atteindre les paramètres suivants : $V_t = 7$ ml/kg, FR = 12 /min, PEEP = 5 cmH₂O avec une FiO₂ constante de 50 %. Lorsque la température du poumon atteignait 35 °C et que les objectifs de perfusion et de ventilation étaient atteints, l'approvisionnement en O₂ de l'oxygénateur était stoppé tandis que l'apport du mélange CO₂ / N₂ était maintenu. Le débit de gaz frais du respirateur était fixé à 2,5 l/min afin d'éviter le phénomène de ré-inhalation des gaz. Les poumons étaient maintenus dans cet état d'équilibre pendant 45 min (phase stable).

D. Expérimentation A : validation de la mesure d'eCO

Afin de valider la méthode de mesure d'eCO plusieurs expérimentations étaient conduites. Premièrement, les concentrations de CO étaient comparées entre l'atmosphère de la salle d'expérimentation et l'air exsufflé par les procs anesthésiés et par les poumons isolés. Les concentrations de CO dans les gaz du respirateur étaient également mesurées à trois reprises avec différentes bouteilles de gaz et à des niveaux variables de FiO₂ (21, 50 et 100 %). Deuxièmement, des séries de mesures d'eCO étaient réalisées chez les porcs avant euthanasie. V_T, FR, PEEP et FiO₂ étaient modifiés afin d'évaluer l'influence sur les mesures du CO. Lors

de l'EVLP, à la phase stable, les mêmes paramètres ventilatoires étaient modifiés et eCO enregistré en parallèle. Par ailleurs, l'atmosphère du réservoir contenant les poumons *ex vivo* était artificiellement polluée par des mélanges gazeux pauvres (≤ 0.015 ppmv) ou riches (9 ppmv) en CO afin de déterminer l'impact d'une telle pollution sur les mesures d'eCO.

Enfin, une série de mesures d'eCO était réalisée en condition d'EVLP après injection dans le circuit de reperfusion soit de SnPP (50 $\mu\text{mol/kg}$, Frontier Scientific, Logan, Utah, USA) un puissant inhibiteur de HO, soit de placebo. Le SnPP était préparé à partir d'une dilution dans une solution tampon de 0,2 M de NaOH complétée par de l'eau distillée et dont le pH = 7.5 après ajout d'HCl. La solution de SnPP était conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière. Lors de l'administration de SnPP en cours d'EVLP, le circuit de CEC et le réservoir contenant le poumon étaient protégés de la lumière.

Pendant la procédure d'EVLP, les gaz du sang (PaO_2 , PaCO_2 , et pH) étaient mesurés dans le perfusat recueilli directement à l'abouchement des veines pulmonaires dans l'oreillette gauche (ABL5, Radiometer Amérique, Westlake, dans l'Ohio). La concentration d'hémoglobine dans le liquide de perfusion était évaluée à l'état stable en utilisant un kit de dosage colorimétrique de l'hémoglobine pour les porcs (DetectX, Arbor Assays, Ann Arbor, Michigan). La limite de détection de ce kit était de 20 pg/ml d'hémoglobine. A la fin de l'expérience, le lobe supérieur du poumon gauche était excisé et pesé. Il était ensuite placé pendant 48 h à 90 °C et à nouveau pesé afin de déterminer le rapport poids humide / poids sec.

Le lobe supérieur du poumon droit était également prélevé à la fin de l'expérimentation afin de déterminer le niveau de transcription de HO-1. 100 mg de tissu étaient fractionnés par ultrasons. L'ARN total était prélevé à l'aide de NucleoSpinRNA (Macherey Nagel, Düren, Allemagne). L'ADNc était obtenu après transcription inverse de 1 μg d'ARN total (SuperScript III First-Strand Synthesis, Invitrogen, Saint Aubin, France). Un traitement par RNase H était associé. Une q-PCR en temps réel était réalisée en utilisant un kit SYBR Green

RTPCR (Qiagen) et un instrument Stratagene Mx3005P (Agilent technologies, La Jolla, California). Les amorces de gènes étaient synthétisées par Life Technologies (Saint Aubin, France). L'amorce de HO-1 était : sens ATGTGA ATG CAA CCC TGT GA et anti-sens GGA AGC CAG TCA AGA GAC CA (Tm 60 ° C, 400 nM). La β -Actine était utilisée comme gène de référence : sens ATC AAG ATC ATC GCG CCT C et anti-sens TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC (Tm 60 ° C, 400 nM). L'expression des gènes était quantifiée par la méthode de comparaison des cycles seuils (*Ct*). La quantité de HO-1 était normalisée selon la méthode *delta Ct*.

Le critère principal de jugement de cette phase d'expérimentation était l'absence de variation significative d'eCO lors de la pollution du réservoir contenant les poumons *ex vivo*. Les critères secondaires de jugement étaient l'augmentation d'eCO parallèlement à l'augmentation de la FiO₂ chez le porc comme cela a déjà été décrit.¹⁸⁴ A l'inverse, eCO ne devait pas varier en fonction de la FiO₂ pendant la procédure EVLP. Enfin, eCO devait être plus faible dans le groupe de SnPP que dans le groupe placebo.

E. Expérimentation B : eCo et lésions d'ischémie reperfusion

Comme expliqué précédemment, cette série d'expérimentations reposait sur l'évaluation de poumons uniques aléatoirement conservés pendant 30 min ou 24 h à 4 °C. Ce schéma d'expérimentation permettait de comparer, après appariement, les caractéristiques des poumons entre J0 et J1. Le protocole expérimental était donc légèrement modifié par rapport à l'expérimentation A. Les débits de CEC étaient adaptés selon le poumon évalué à l'aide de la formule suivante :

$$D = Dt \times \frac{Pg \cdot d}{Pg + Pd}$$

D : débit de CEC adapté au poumon

Dt : débit cardiaque théorique du porc (70ml/kg/min)

Pg : d : poids du poumon gauche ou du poumon droit

Pg : poids du poumon gauche

Pd : poids du poumon droit

De même, la ventilation des poumons était adaptée avec un $V_T = 4,2$ ml/kg pour le poumon droit (60 % du V_T) et $V_T = 2,8$ ml/kg pour le poumon gauche (40 % du V_T).

L'objectif de l'expérimentation B était d'évaluer les variations d'eCO en fonction de l'intensité des lésions pulmonaires d'ischémie reperfusion. Ainsi, l'un des axes majeurs de cette série d'expériences était de caractériser au mieux l'état physiologique des poumons. Pour ce faire, plusieurs paramètres physiologiques et biochimiques étaient mesurés, reflets de la fonction pulmonaire globale (gaz du sang), de l'état hémodynamique des poumons (PAP, résistances vasculaires pulmonaires et pression capillaire pulmonaire), de l'état du parenchyme pulmonaire et des bronches (pression de pic, compliance dynamique et espace mort physiologique, rapport poids humide / poids sec), de l'état de la barrière alvéolo capillaire (clairance liquidienne alvéolaire, perméabilité de la barrière, concentrations de RAGE) et de l'inflammation du poumon (IL-1 β , IL-6 et TNF α). Le détail des mesures effectuées est expliqué ci-dessous.

Les *gaz du sang* (PaO₂, PaCO₂, et pH) étaient mesurés dans le perfusat recueilli directement à l'abouchement des veines pulmonaires dans l'oreillette gauche (ABL5, Radiometer Amérique, Westlake, dans l'Ohio).

La *PAP* étaient enregistré comme indiqué précédemment et les *résistances vasculaires pulmonaires* (RVP) calculées selon la formule :

$$RVP = 80 \times \frac{(PAP - POG)}{D}$$

RVP : résistances vasculaires pulmonaires

PAP : pression artérielle pulmonaire

D : débit de perfusion

POD : pression de l'oreillette gauche, considérée comme nulle lors de l'EVLP

La *pression capillaire pulmonaire* (Pcap) était estimée en utilisant un modèle considérant la vascularisation pulmonaire comme une série de trois compartiments compliants (artériel, capillaire et veineux) séparés par deux résistances (artérielle et veineuse).²⁸⁷ La Pcap était estimée par l'extrapolation au temps zéro du composant lent du profil d'occlusion artérielle obtenu après arrêt de la pompe de CEC (décroissance du débit, Figure 9).

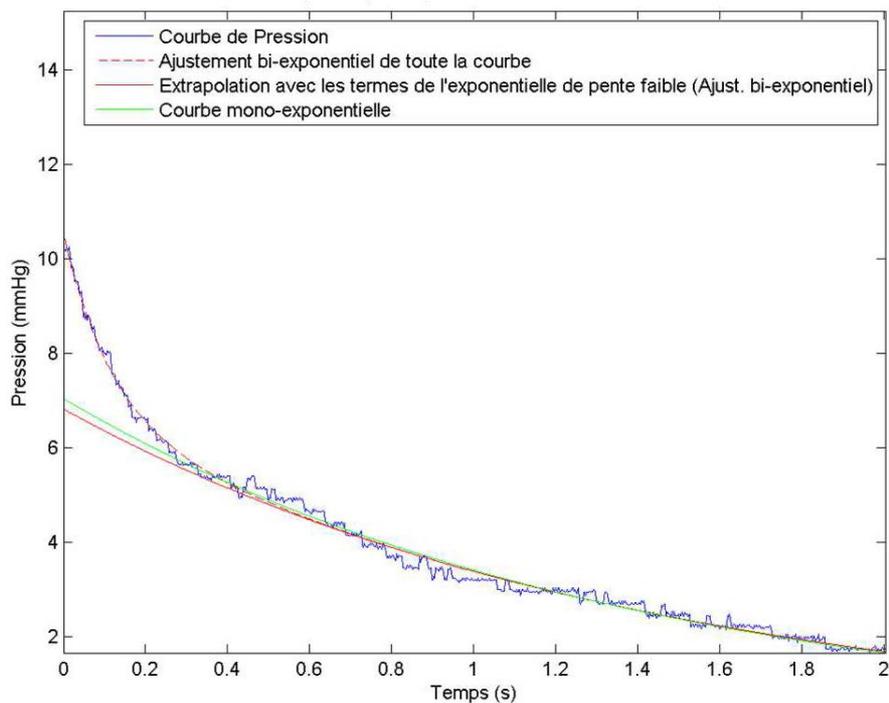


Figure 9. Exemple d'estimation des pressions capillaires pulmonaires

La *compliance dynamique pulmonaire* était calculée à partir des mesures de pressions de pic :

$$C_{dyn} = \frac{V_T}{P_{pic} - PEEP}$$

C_{dyn} = compliance dynamique

V_T : volume courant

P_{pic} : pression de pic

PEEP : pression positive télé expiratoire

L'*espace mort physiologique* était estimé à partir de la mesure de l'EtCO₂ et de la PaCO₂ (équation de Bohr / Enghoff):

$$\frac{V_D}{V_T} = \frac{PaCO_2 - EtCO_2}{PaCO_2}$$

V_D : espace mort physiologique

V_T : volume courant

PaCO₂ : pression artérielle en CO₂

EtCO₂ : pression de CO₂ de fin d'expiration

A la fin de la phase stable, un cathéter (PE240 tubing, BD, Le Pont de Claix, France) était introduit à travers le tube bronchique afin de réaliser un LBA. 100 ml de NaCl 0,9 % à 36 °C contenant 5 % d'albumine étaient injectés. Après 5 min (T0) et 35 min (T30), des échantillons étaient prélevés à travers le cathéter. La variation de la concentration en protéines entre T0 et T30 était utilisée pour *déterminer la clairance liquidienne alvéolaire* :

$$C_{liq} = 2 \times \left(1 - \frac{C_0}{C_{30}}\right)$$

C_{liq} : clairance liquidienne alvéolaire

C_0 : concentration en protéines à T0

C_{30} : concentration en protéines à T30

La *perméabilité alvéolo-capillaire* était estimée lors de la même procédure de LBA. Un marqueur macromoléculaire fluorescent (FITC-D70, 73.1 kDa, Sigma, St. Quentin Fallavier, France) était ajouté au perfusat 30 min avant la réalisation du LBA. Les concentrations de FITC-D70 étaient ensuite mesurées de façon simultanée dans le perfusat et le liquide prélevé par LBA (spectrophotomètre NanoDrop ND-3300, LabTech, Palaiseau, France). Le coefficient de transport K du FITC-D70 du liquide de perfusion à l'alvéole, reflet de la perméabilité de la membrane alvéolo capillaire aux macromolécules, était calculé :

$$K = \frac{C_{LBA}}{C_{Perf}} \div 30$$

K: coefficient de transport du FITC-D70

C_{LBA} : concentration de FITC-D70 dans le LBA

C_{Perf} : concentration de FITC-D70 dans le perfusat

Enfin, les *concentrations en cytokines pro inflammatoires* IL-1 β , IL-6 et TNF α étaient déterminées dans le perfusat et le LBA à la fin de l'expérience. Une technologie de biopuces de protéines était utilisée (Randox Laboratories Ltd, Antrim, United Kingdom). La concentration de RAGE était mesurée dans le LBA et le perfusat à l'aide d'un kit ELISA spécifique (ELISA kit, Cliniscienses, France). Le rapport poids humide / poids sec était calculé comme décrit précédemment.

L'hypothèse principale de l'expérimentation B était qu'eCO serait significativement plus élevé à J1. Les poumons à J1 devaient présenter un profil physiologique plus altéré (PA et RVP plus élevées, C_{dyn} plus faible, clairance liquidienne alvéolaire plus faible et coefficient de perméabilité plus important) et des concentrations en cytokines pro inflammatoires plus élevées. L'objectif était de déterminer un niveau seuil d'eCO permettant de distinguer les poumons répondant à tous les critères de viabilités suivants : $PaO_2 / FiO_2 \geq 400$ mmHg ; PAP stable ou en diminution ; pression artérielle pulmonaire stable ou en décroissance ; pression pic stable ou en diminution, C_{dyn} stable ou en augmentation.⁵³ La valeur prédictive de ce seuil était ensuite déterminée.

F. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme d'effectifs (%) pour les variables dichotomiques et de médiane (interquartile 25 ; interquartile 75) pour les variables numériques. Le test du χ^2 ou le test exact de Fisher étaient utilisés pour comparer les variables dichotomiques. Les variables numériques non normales étaient analysées à l'aide d'un test de Kruskal Wallis ou, en cas d'appariement, d'un test de Wilcoxon. Le test de Scheirer-Ray-Hare était utilisé pour comparer des mesures répétées entre deux groupes. Pour les variables numériques normales, le test t de Student apparié ou non et le test de MANOVA étaient utilisés. Le test de Spearman était utilisé pour étudier une corrélation entre deux variables numériques. L'aire sous la courbe ROC (Receiver operating characteristic) permettait d'analyser la valeur prédictive d'un test diagnostique, de même que la sensibilité et la spécificité. Les valeurs de P reportées sont à deux sens et le risque alpha était fixé à 5 %. Les analyses étaient réalisées à l'aide du logiciel SPSS, version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTATS

III. Résultats

A. Expérimentation A

15 porcs de 19,8 [18,5 – 20,2] kg étaient étudiés : 5 porcs pour les mesures standards d'eCO et 10 porcs pour les mesures avec inhibiteur de HO (5 recevaient du SnPP et 5 recevaient du placebo).

1. Mesures standards d'eCO

La concentration de CO dans l'air de la salle d'expérimentation était de $0,30 \pm 0,06$ ppmv. Elle était de $0,006 \pm 0,002$ ppmv, $0,092 \pm 0,006$ ppmv et $0,129 \pm 0,009$ ppmv dans les gaz du respirateur avec une FiO_2 de 100 %, 50 % et 21 % respectivement. La concentration de CO dans les gaz médicaux était soustraite des concentrations d'eCO pour tenir compte de la variabilité induite. Chez les porcs anesthésiés, la mesure d'eCO en temps réel montrait des oscillations rythmées par la fréquence respiratoire (Figure 10) et dont le pic se situait en fin d'expiration. Ces oscillations n'étaient pas retrouvées lors de la mesure d'eCO dans l'air de la salle ou dans les gaz médicaux.

Les modifications du V_T , de la FR et de la PEEP n'avaient pas d'impact significatif sur la valeur pic d'eCO. L'augmentation du rapport I/E provoquait une augmentation de la valeur pic d'eCO. Lorsque la FiO_2 était augmentée à 100 %, eCO était significativement plus élevé en condition *in vivo* (Table 4). Les valeurs d'eCO étaient constamment supérieures aux concentrations de CO dans l'air de la salle d'expérimentation et dans les gaz médicaux (eCO = $3,2 \pm 1,3$ ppmv ; $p < 0,001$).

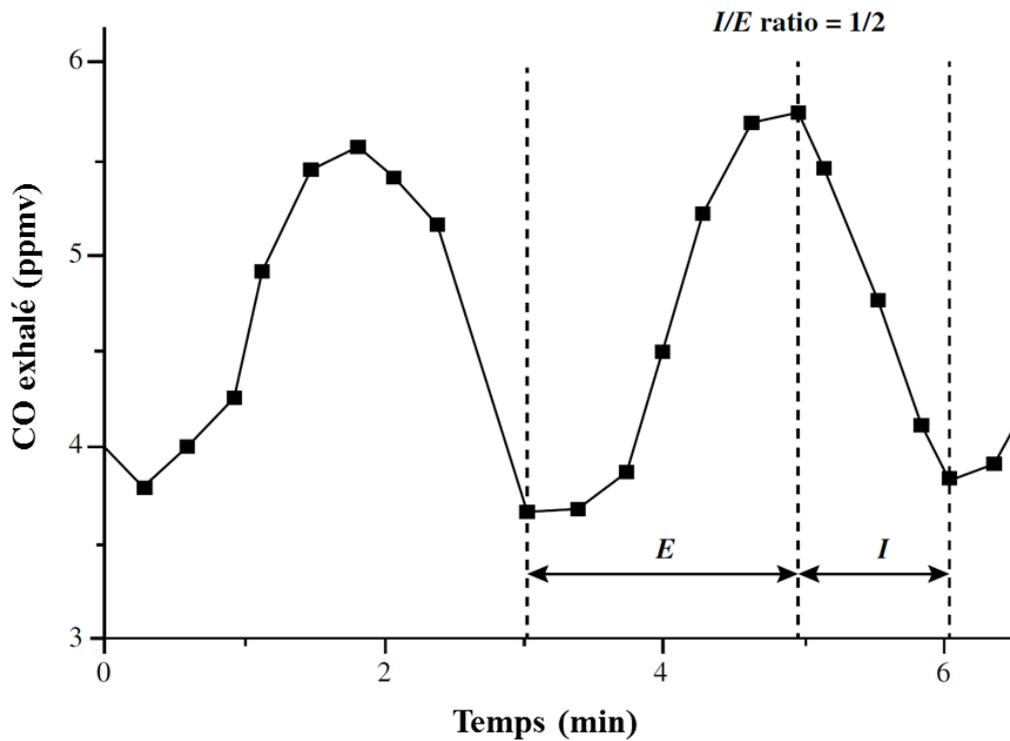


Figure 10. Mesure d'eCO chez le porc anesthésié.

	FiO ₂ 21%	FiO ₂ 50%	FiO ₂ 100%
Mesures <i>in vivo</i>			
eCO (ppmv)		3,2 ± 1,3	7,4 ± 2,3 *
eCH ₄ (ppmv)		330 ± 80	280 ± 80
Mesures <i>ex vivo</i>			
eCO (ppmv)	0,45±0,30	0,45±0,19	0,41±0,26
eCH ₄ (ppmv)	5,9±0,6	6,2±0,6	6,5±0,6

Table 4. Mesures d'eCO et eCH₄ chez les porcs anesthésiés (*in vivo*) et sur poumons isolés (*ex vivo*) en fonction des paramètres de FiO₂ du respirateur. * : p < 0.001

En condition d'EVLP, les paramètres physiologiques des poumons ventilés à la fin de la phase stable étaient : $PaO_2 / FiO_2 = 410 \pm 90$ mmHg, $PaCO_2 = 36 \pm 2$ mmHg, $pH = 7,12 \pm 0,04$, pression de pic = 17 ± 3 cmH₂O, PAP = $11,2 \pm 0,7$ mmHg, Pcap = $6,0 \pm 0,8$ mmHg, et RVP = $8,7 \pm 0,6$ mmHg/L/min. Le rapport poids humide / poids sec des poumons après EVLP était de $5,4 \pm 0,7$. Les mesures d'eCO montraient les mêmes oscillations en EVLP que celles observées chez le porc anesthésié. Les concentrations d'eCO étaient significativement plus basses lors de l'EVLP qu'en condition *in vivo* ($0,44 \pm 0,19$ ppmv contre $3,2 \pm 1,3$ ppmv; $p < 0,001$). Les valeurs *ex vivo* d'eCO étaient cependant plus élevées que la concentration de CO dans les gaz médicaux ($p < 0,001$). Contrairement aux mesures effectuées chez le porc anesthésié, eCO n'était pas modifié par la variation de FiO_2 durant l'EVLP (Table 4). La pollution du réservoir contenant les poumons *ex vivo*, par un gaz riche ou pauvre en CO, ne provoquait pas de variation significative d'eCO (Figure 11 et Table 5).

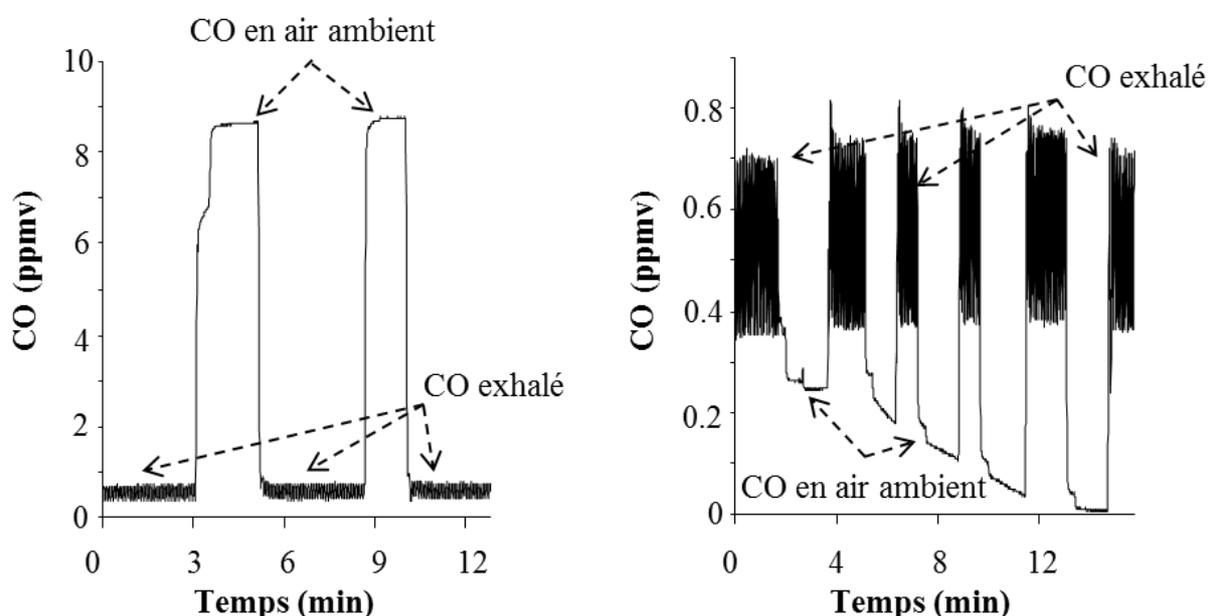


Figure 11. Mesures alternées de CO dans le réservoir (air ambient pollué par des gaz riches ou pauvres en CO) et dans l'air exhalé d'un poumon isolé.

	Air non pollué	Air enrichi en CO	Air appauvri en CO
CO dans l'air ambiant (ppmv)	0,29 ± 0,06	8,78 ± 0,05*	0,010 ± 0,002*
eCO (ppmv)	0,50 ± 0,30	0,45 ± 0,35	0,45 ± 0,32

Table 5. Comparaison des mesures d'eCO et de CO dans le réservoir (air ambiant).

* : $p < 0,001$

Au cours de cette série d'expérimentations, la concentration en hémoglobine du perfusé était de $34 \pm 5 \mu\text{g/dl}$. Enfin, le transcrite de HO-1 était détecté dans tous les poumons. Son niveau n'était pas différent entre les poumons (*delta Ct* moyen = $6,5 \pm 0,6$; $p = 0,56$). Il n'existait pas de corrélation entre eCO et le niveau d'expression de HO-1 (rho de Spearman 0,22, $p = 0,78$).

2. Mesures d'eCO après traitement par SnPP

Une heure après traitement par SnPP ou placebo, les paramètres physiologiques n'étaient pas différents entre les groupes (Table 6).

	Placebo n=5	SnPP n=5	P
PaO ₂ / FiO ₂	372 ± 60	314 ± 70	0,57
PaCO ₂ (mmHg)	29 ± 1	29 ± 3	0,95
pH	7,16 ± 0,02	7,19 ± 0,03	0,49
Pression pic (mmHg)	18 ± 1	20 ± 1	0,25
Pression artérielle pulmonaire (mmHg)	17 ± 2	18 ± 3	0,70

Table 6. Paramètres physiologiques à la fin de la phase stable selon les groupes.

Les variations d'eCO n'étaient pas non plus différentes entre les groupes, tant en terme de variations absolues que de pourcentages de variation ($p=0,91$ et $p=0,87$ respectivement) (Figure 12).

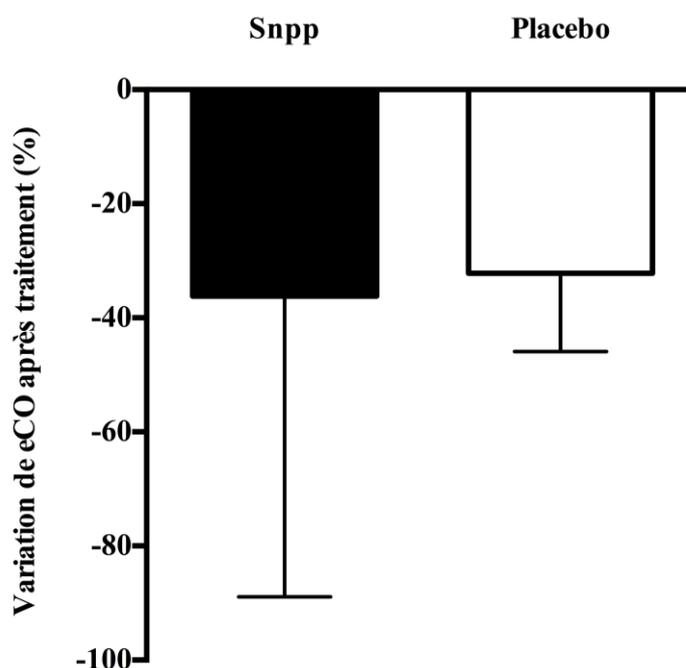


Figure 12. Pourcentages de variation d'eCO avant et après traitement par SnPP ou Placebo.

B. Expérimentation B

Six porcs, 40,8 [38,5 – 41,4] kg, étaient euthanasiés afin d'étudier par EVLP six paires de poumons. Les caractéristiques des poumons sont présentées dans la Table 7. Brièvement, les poumons à J1 présentaient des capacités d'hématose et des propriétés mécaniques altérées. L'œdème pulmonaire était plus important à J1. Les concentrations en cytokines dans le perfusat semblaient montrer une inflammation accrue à J1.

Les variations d'eCO sont affichées dans la Figure 13. eCO était significativement plus élevé à J1 à tous les temps ($p < 0,01$). Au début de la phase stable, eCO était de $0,951 \pm 0,313$ ppmv

à J0 et $1,35 \pm 0,259$ ppmv à J1, $p = 0,01$. Pour toutes les paires de poumons étudiées, eCO était significativement plus élevé à J1 (augmentation moyenne: $48 \pm 34\%$) (Figure 14).

Variables	J0 (n= 6)	J1 (n= 6)	P
PaO ₂ / FiO ₂ (mmHg)	527 ± 86	358 ± 142	0,004
Δ Compliance dynamique (ml/cmH ₂ O)	2,26 ± 1,28	0,32 ± 2,45	0,14
Δ V _D / V _T (%)	0,02 ± 0,12	0,14 ± 0,11	0,11
Pression artérielle pulmonaire (mmHg)	10 ± 2	15 ± 3	0,004
Résistance vasculaires pulmonaires (mmHg/l/min)	19 ± 5	25 ± 4	0,16
Pression capillaire pulmonaire (mmHg)	9 ± 3	11 ± 4	0,35
Clairance du liquide alvéolaire (% du volume initial)	49 ± 46	0 ± 0	0,05
Perméabilité alvéolo capillaire (a,u.)	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03
Ratio poids humide / poids sec	5,23 ± 0,54	6,46 ± 0,59	0,03
IL1β (pg/ml)	61 ± 109	657 ± 586	0,07
IL6 (pg/ml)	88 ± 119	342 ± 217	0,12
TNFα (pg/ml)	204 ± 153	63 ± 52	0,09

Table 7. Caractéristiques des poumons évalués à J0 et J1.

Δ : variation entre le début et la fin de la phase stable. V_D : espace mort physiologique, V_T : volume courant

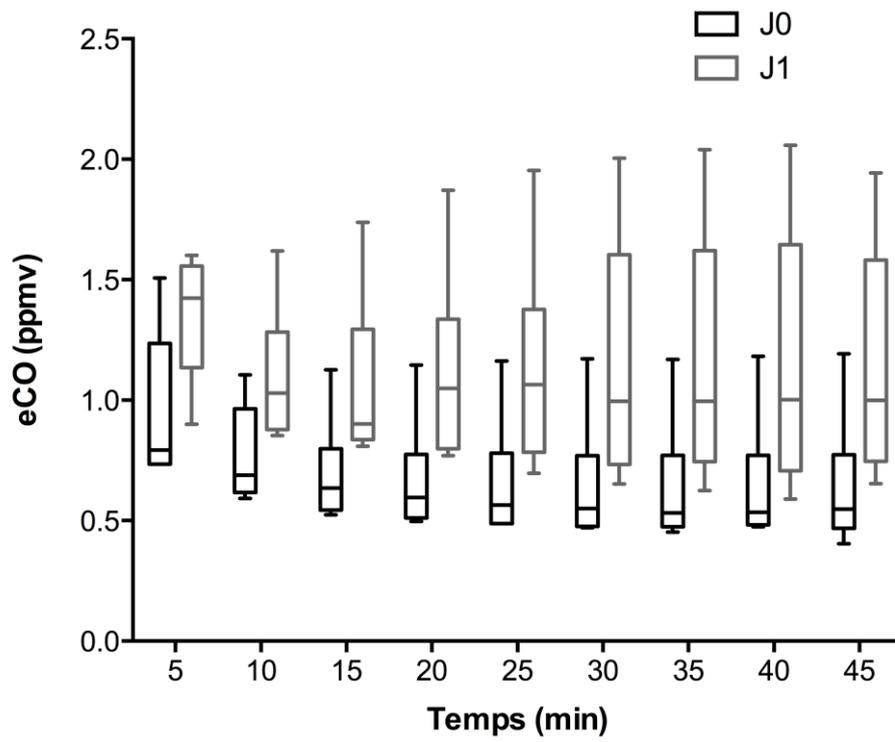


Figure 13. Concentrations en CO exhalé du début à la fin de la phase stable

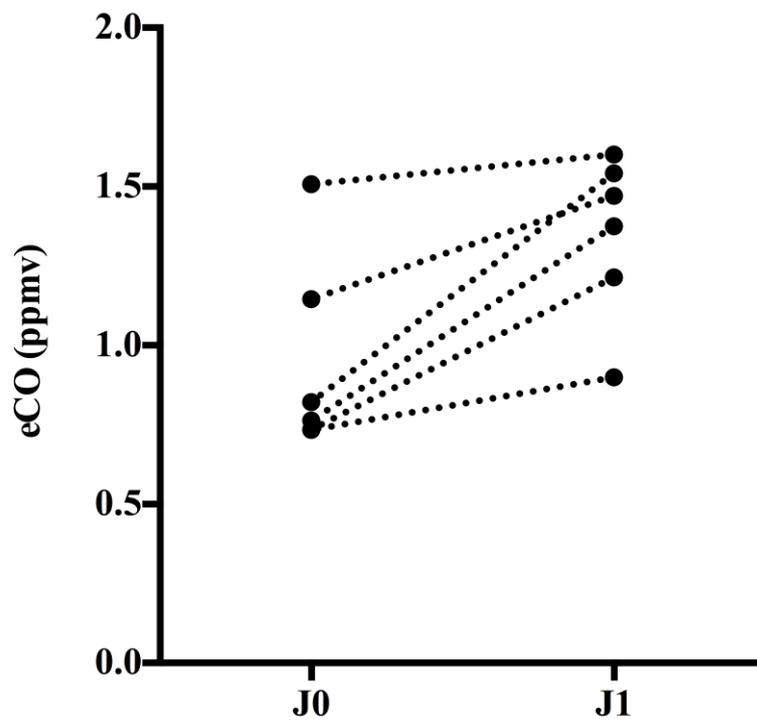


Figure 14. Variations par paires d'eCO

Parmi toutes les variables étudiées, seul le coefficient K de perméabilité alvéolo capillaire était corrélé avec eCO (rho = 0,60 ; p=0,04) alors qu'eCO était inversement corrélé avec TNF α (rho = 0,64 ; p=0,02).

D'après les critères prédéfinis, 8 poumons étaient transplantables (6 à J0 et 2 à J1, p=0,06). La courbe ROC d'eCO en début de phase stable pour prédire la viabilité des poumons est présentée en Figure 15.

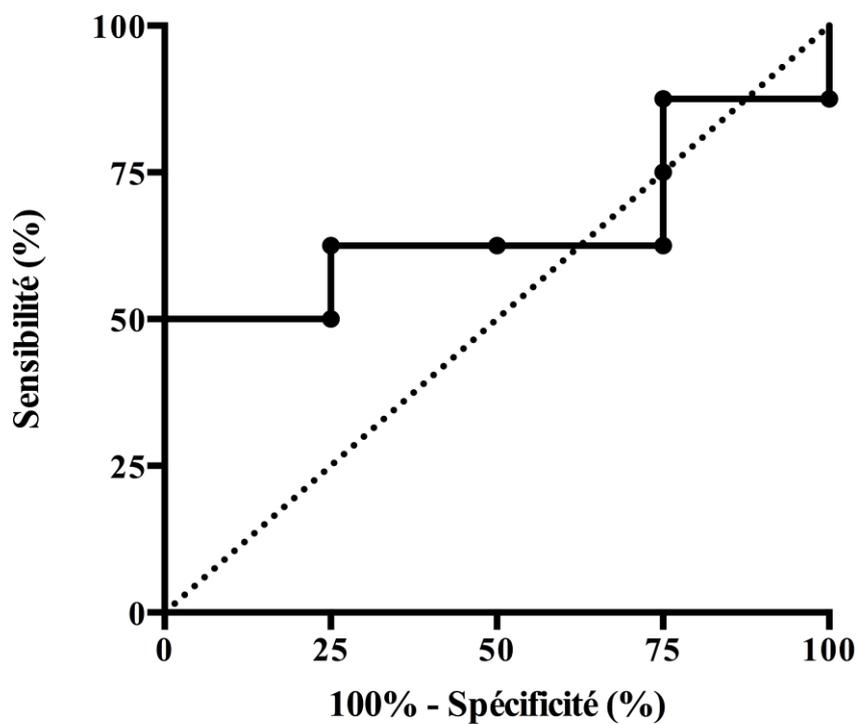


Figure 15. Courbe ROC de prédiction de la viabilité des poumons en fonction d'eCO.

L'aire sous la courbe n'était pas significative (0,65 [95% : 0,34 – 0,97, p = 0,40). La meilleure valeur limite d'eCO était déterminée à partir des coordonnées de la courbe ROC. Le choix était effectué pour avoir la meilleure valeur prédictive négative possible. La valeur limite idéale se situait entre 0,860 et 1,020 ppmv. Une valeur seuil à 0,860 ppmv conduisait à une sensibilité de 1 (0,31 – 1), une spécificité de 0,44 (0,15 – 0,77) et une valeur prédictive

positive de 0,37 (0,10 – 0,74) et une valeur prédictive négative de 1 (0,39 – 1). Une valeur seuil à 1,020 ppmv conduisait à une sensibilité de 0,67 (0,12 – 0,98), une spécificité de 0,67 (0,31 – 0,91), une valeur prédictive positive de 0,40 (0,0 – 0,83), et une valeur prédictive négative de 0,86 (0,42 – 0,99).

DISCUSSION

IV. Discussion

Nos résultats montrent qu'une mesure précise, en temps réel, du CO exhalé est possible en condition d'EVLP. La technique d'OF-CEAS permet de détecter des concentrations d'eCO inférieures au ppmv. De plus, cette technique permet la mesure d'eCO en fin d'expiration, à son maximum, grâce à une fréquence d'acquisition rapide. Lors de l'évaluation *ex vivo* de poumons, eCO est augmenté après 24 h d'ischémie froide. eCO semble être principalement corrélé à la survenue de l'œdème pulmonaire de reperfusion. Ainsi, la mesure d'eCO semble être un biomarqueur non invasif des lésions pulmonaires en condition d'EVLP. Cependant, sa valeur prédictive ne paraît pas être suffisante pour prédire à elle seule la viabilité des greffons.

A. Validation de la technique de mesure d'eCO

La sensibilité requise pour la mesure du CO au cours de l'EVLP interdit l'utilisation de dispositifs commerciaux portables basés sur des mesures électrochimiques. Ces appareils sont adaptés à la détection de concentrations élevées de CO (plusieurs ppmv) par exemple dans l'air expiré de patients fumeurs. Avec une sensibilité de 1 ppmv, ils sont parfaitement adaptés à la mesure de la qualité de l'air et à la détection d'une intoxication au CO. D'autres systèmes commerciaux plus complexes permettent des mesures de CO en temps réel avec une sensibilité inférieure au ppmv. Cependant, leur vitesse d'acquisition est insuffisante pour une utilisation en clinique humaine (par exemple, appareil Logan Research LR4000, 0.2 ppmv en 5 s). Les instruments basées sur la chromatographie gazeuse ou la spectrométrie de masse, bien qu'hautelement sensibles, ne permettent pas des mesures en temps réel et au chevet du patient du fait de leur encombrement et de la nécessité de réaliser des échantillonnages.²⁸⁸ Pour les mesures en temps réel à une sensibilité inférieure à 0.2 ppmv, quelques instruments de spectroscopie laser ont été mis au point et utilisés pour la quantification d'eCO.^{177,283,289,290} En plus de fournir la sensibilité requise, la spectroscopie laser est la seule méthode permettant

une acquisition des mesures plus rapide qu'un cycle respiratoire. Cependant, certains spectromètres sont très volumineux et empêchent la réalisation de mesures in situ.²⁸⁹ Par ailleurs, d'autres spectromètres nécessitent un volume d'échantillonnage important (entre 0,5 et 6 litres) du fait de la technique de mesure employée (cellules d'absorption à multiples passages).^{177,290} En conséquence, la technique de mesure basée sur les cellules d'absorption à multiples passages ne peut pas être utilisée en condition d'EVLP car elle perturberait de façon significative la ventilation des poumons ($V_T \pm 140\text{mL}$ dans nos expériences). En outre, une acquisition des mesures plus rapide qu'un cycle respiratoire permet de distinguer les concentrations de CO dans l'air expiré du CO présent dans l'air insufflé. Sans une acquisition rapide, une valeur moyenne de CO peut être calculée en soustrayant la concentration de CO présent dans l'air inspirée, laquelle doit être maintenue constante pendant l'expérimentation. Néanmoins, une telle mesure moyenne de CO sous-estime eCO puisqu'elle ne prend pas en compte uniquement le pic expiratoire de CO. Nous souhaitons démontrer que la technique OF-CEAS réunit toutes les exigences pour l'évaluation en temps réel d'eCO lors de procédures d'EVLP : une sensibilité inférieure au ppmv, un temps d'acquisition plus rapide qu'un cycle respiratoire, un volume d'échantillonnage faible, le tout obtenu grâce à un dispositif compact et robuste ne requérant pas de calibrations itératives. À notre connaissance, la technique OF-CEAS est la seule qui offre de telles possibilités à l'heure actuelle.

Au-delà de la précision de l'OF-CEAS, nous souhaitons prouver que le CO mesuré provenait du métabolisme pulmonaire. Nos résultats semblent indiquer que tel est le cas puisqu'eCO était systématiquement plus élevé que les concentrations en CO de l'air ambiant. De plus, les concentrations d'eCO suivaient un rythme calqué sur les cycles ventilatoires des porcs et des poumons *ex vivo* sans que l'on observe de pollution par l'air ambiant enrichi ou appauvri en CO. Parallèlement à ces constatations, nos résultats sont cohérents avec les mécanismes physiologiques connus de production et d'excrétion du CO. La concentration en CO exhalé

dépend de la concentration de CO dans l'air inspiré, des capacités de transport sanguin et des propriétés de diffusion de la membrane alvéolo capillaire.¹⁴¹ Les mesures d'eCO étaient donc réalisées à la phase stable dans des conditions très contrôlées afin d'éviter toute variation des capacités de diffusion du poumon. Dans ces conditions expérimentales, eCO doublait lorsque la FiO₂ était réglée à 100 %. Cette variation est cohérente avec les mécanismes connus d'élimination sanguine du CO, l'augmentation de la PaO₂ provoquant une augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et donc une excrétion accrue de CO.¹⁸⁴ De façon intéressante, l'augmentation de la FiO₂ ne se traduisait pas par une augmentation d'eCO lors des expérimentations *ex vivo* sur poumons isolés. Au cours de la chirurgie précédant l'EVLP, les poumons sont rincés avec une solution de conservation (phase de pneumoplégie), ce qui diminue considérablement le nombre d'érythrocytes présents dans le système vasculaire pulmonaire et dans le perfusat de l'EVLP. Ainsi, l'hématocrite est inférieur à 1 % dans le perfusat, et les gaz sont transportés sous forme dissoute. Ces conditions expérimentales particulières pourraient expliquer l'absence de variation d'eCO en fonction de la FiO₂ au cours de l'EVLP. Par ailleurs, l'absence de stockage de CO sur l'hémoglobine au sein du perfusat est en faveur d'une relation directe entre eCO et production de CO par les poumons isolés.¹⁴¹ La variation d'un facteur de 10 d'eCO entre les expérimentations *in vivo* et *ex vivo* tendent à la même conclusion. Cet écart n'est vraisemblablement pas lié à une diminution du substrat d'HO (diminution d'hème dans le perfusat) car eCO reste stable pendant les 45 minutes de la phase stable. Les différences d'eCO entre *ex vivo* et *in vivo* ne semblent donc pas expliquées par une modification de la ventilation alvéolaire, de la PaO₂ ou de la capacité de diffusion des poumons. Une production de CO endogène ubiquitaire pour les expérimentations *in vivo* et une production limitée aux poumons isolés en *ex vivo* semblent être les principales raisons d'une telle différence. Par conséquent, dans ce modèle d'EVLP,

les concentrations d'eCO semblent être le reflet de la production endogène de CO par les poumons.

Afin de confirmer la provenance du CO mesuré, un inhibiteur de la production endogène de CO était administré au cours de l'EVLP. Le SnPP, ou protoporphyrine à l'étain, est un inhibiteur puissant de l'activité de HO. Son pic d'action sur HO est estimé entre 1h et 4h selon les études et sa demi-vie est de l'ordre de 4h.²⁹¹⁻²⁹⁴ Au cours de nos expérimentations, l'administration de SnPP ne se traduisait pas par une diminution d'eCO. Cette absence d'effet peut être expliquée par différents mécanismes. Premièrement, il est possible que le CO mesurée au cours de l'EVLP ne reflète pas la production endogène de CO mais plutôt le stock endogène de CO. Cette hypothèse est en partie contredite par la demi-vie courte du CO dans les poumons ($0,6 \pm 0,2h$ ²⁹⁵) alors que la mesure d'eCO était réalisée pendant plus d'une heure (reperfusion/ reventilation et phase stable). La deuxième hypothèse pour expliquer l'absence d'effet du SnPP est la surexpression d'HO induite par cette molécule. En effet, SnPP inhibe l'activité de HO et donc la dégradation de l'hème. La concentration relativement haute en hème est responsable d'un rétrocontrôle positif sur l'expression de HO-1.²⁹⁶ Néanmoins ce rétrocontrôle positif est significatif plus d'une heure après l'administration de SnPP et donc n'explique vraisemblablement pas nos résultats. Finalement, l'explication la plus plausible de l'absence d'effet du SnPP est liée au pic d'action de cette molécule. En effet, le SnPP était administré au cours de la phase d'EVLP afin d'établir une cinétique de décroissance du CO. Ce choix méthodologique n'était peut être pas idéal puisque le délai entre l'administration de SnPP et la dernière mesure de CO était d'environ 60min, pour un pic d'action du SnPP compris entre 1 et 4h. D'autres auteurs ont mis en avant ces délais pour expliquer l'absence de résultats après injection de SnPP.²⁹⁷ Il aurait sans doute été préférable d'administrer le SnPP quelques heures avant les expérimentations.

De façon intéressante, les concentrations mesurées d'eCO dans nos expériences étaient autour de 1 ppmv. Ces concentrations sont bien inférieures aux valeurs détectées chez l'humain (<50 ppmv).²⁹⁸ L'administration thérapeutique de CO a été utilisée dans plusieurs modèles animaux de lésions d'ischémie reperfusion (Table 3).^{258,262,264,266-271} Dans les différents protocoles publiés, les concentrations de CO délivrées par inhalation varient de 250 à 500 ppmv. Ces concentrations se rapprochent des limites de doses toxiques généralement admises de CO²⁹⁹ et sont environ 1000 fois plus élevées que les concentrations d'eCO mesurées dans notre modèle d'EVLP. La plupart des études d'inhalation de CO ont été réalisées en condition *in vivo* ce qui rend la comparaison avec nos résultats difficile. Néanmoins, même en condition *in vivo*, les concentrations d'eCO étaient de l'ordre de quelques ppmv, soit 50 fois moins élevées que les doses thérapeutiques proposées. Quelques études sur les effets de l'administration de faibles doses de CO (10 à 100ppmv) ont été menés, avec toutefois des résultats moins probants en terme d'inflammation et d'apoptose.^{300,301} Le recours nécessaire à des concentrations élevées de CO pourrait s'expliquer par la distribution et le stockage du CO inhalé au niveau de l'organisme, provoquant ainsi une diminution du CO disponible au niveau de l'organe cible. L'administration de CORM pourrait ainsi être avantageuse et limiter d'éventuels effets indésirables liés à l'administration de CO à hautes concentrations.^{216,302} En effet, certains auteurs soulèvent le problème de l'administration de fortes concentrations de CO puisque l'inhalation de 50 ppm de CO pendant une heure provoque une fuite capillaire et une séquestration de leucocytes chez l'animal et chez l'homme.^{303,304}

Les résultats de cette première série d'expérimentation doivent être interprétés en tenant compte des limites du protocole utilisé. Premièrement, les poumons étudiés ne présentaient pas de lésions d'ischémie reperfusion significatives comme le montre le rapport PaO₂ / FiO₂, vraisemblablement du fait d'une ischémie non prolongée. L'objectif de ces expérimentations était de valider la mesure d'eCO en condition d'EVLP. Même si les résultats de la littérature

semblent indiquer qu'eCO pourrait être un biomarqueur de l'intensité des lésions d'ischémie reperfusion, des expérimentations spécifiques devraient répondre à cette question. Deuxièmement, nos résultats indiquent que la mesure d'eCO doit être réalisée en prenant en compte les paramètres ventilatoires, notamment la FiO₂. Cette donnée pourrait limiter la comparaison d'eCO entre différents poumons. Enfin, l'absence de corrélation entre eCO et l'expression de HO-1 semble indiquer la présence de mécanismes de régulation de la production, du transport et de l'expression de CO en condition d'EVLP qu'il conviendrait d'appréhender au mieux afin de correctement interpréter la mesure d'eCO.

B. Monoxyde de carbone et ischémie reperfusion pulmonaire

Notre principal objectif était de décrire la variation d'eCO en fonction de différentes conditions expérimentales d'ischémie reperfusion pulmonaire. Nous avons choisi d'apparier les poumons entre une ischémie courte (30 min) et une ischémie longue (24 h) avant EVLP. Or, il a été démontré récemment qu'une ischémie froide de 4h avant EVLP pourrait être bénéfique en termes d'inflammation et de lésions du greffon.³⁰⁵ Cependant, une ischémie froide plus prolongée induit des lésions d'ischémie reperfusion et est corrélée à la détérioration de la fonction pulmonaire après transplantation.^{306,307} Nos résultats sont cohérents avec ce concept physiopathologique et suggèrent l'apparition d'importantes lésions pulmonaires à J1. La compliance pulmonaire diminuait à J1 et l'espace mort physiologique augmentait traduisant possiblement l'apparition d'atélectasies ou tout du moins d'anomalies du rapport V/Q. Par ailleurs, un œdème pulmonaire était présent après 24 h d'ischémie froide: la clairance liquide alvéolaire était considérablement diminuée à J1 tandis que la perméabilité alvéolo capillaire et le rapport poids humide / poids sec étaient augmentés. Cet œdème était principalement d'origine lésionnelle puisque les pressions capillaires n'étaient pas significativement augmentées à J1 alors que les biomarqueurs de l'inflammation l'étaient.

Néanmoins, l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires à J1 traduisait une composante vasculaire de l'œdème pulmonaire liée aux lésions endothéliales pulmonaires. L'ensemble de ces constatations au cours des expérimentations nous amène à penser que le modèle d'ischémie reperfusion utilisé (30 min vs. 24 h d'ischémie froide) reflète de façon pertinente l'œdème alvéolaire observé au décours de la greffe pulmonaire.^{24,308} Dans notre modèle animal, les lésions pulmonaires d'ischémie occasionnaient une réduction de l'oxygénation du sang avec un rapport $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ nettement diminué à J1. Les niveaux observés de $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ à J1 correspondaient à ceux décrits lors de procédures d'EVLP ou après transplantation d'organes marginaux.^{309,310} Ainsi, nous pensons que le modèle d'ischémie reperfusion utilisé dans nos expérimentations était pertinent pour l'étude des variations d'eCO.

Les lésions d'ischémie reperfusion, notamment de part la production d'espèces réactives de l'oxygène et de cytokines pro inflammatoires, induisent l'expression de HO-1 et la production endogène de CO.^{120,311} Le CO ainsi libéré régule le recrutement des cellules inflammatoires, certaines voies de l'apoptose et la fonction de canaux ioniques.^{120,312} Notamment, deux études ont démontré que le CO peut modifier l'activité du canal sodique épithélial ENaC.^{313,314} Bien que leurs résultats soient contradictoires, ces études affirment le rôle du CO dans la régulation du transport sodique épithélial et donc dans la régulation de l'œdème pulmonaire. Par ailleurs, de nombreuses expérimentations animales ont mis en avant l'intérêt thérapeutique du CO pour la réduction de l'œdème pulmonaire post transplantation.^{265–269,271} La production endogène de CO jouerait donc un rôle non négligeable dans la pathogénèse ou la résorption de l'œdème pulmonaire après greffe, l'un des principaux mécanismes de la DPG.³¹⁵ Au cours de nos expérimentations, eCO augmentait lorsque les lésions d'ischémie reperfusion étaient accrues. La comparaison d'eCO entre J0 et J1 montrait que l'excrétion de CO était systématiquement plus importante à J1 dès le début de la phase stable et jusqu'à la fin de

l'expérimentation. De plus, il existait une corrélation entre eCO et le coefficient K de perméabilité alvéolo capillaire. Nous pensons donc que la mesure d'eCO permettrait de surveiller et d'anticiper la survenue d'un œdème pulmonaire au cours de l'EVLP. Ces résultats et cette hypothèse semblent en adéquation avec une précédente étude mesurant eCO chez le rat transplanté.²⁷² Dans ce travail, Yamamoto et ses collègues comparaient une ischémie froide de trois heures à une ischémie chaude de même durée. Les rats greffés dans le groupe ischémie chaude présentaient un état inflammatoire marqué et une DPG était présente dès la première heure de reperfusion. De façon intéressante, eCO était plus élevé dès le début de la reperfusion dans le groupe ischémie chaude.²⁷² Cependant, ces résultats sont à interpréter avec précaution du fait de l'absence de groupe contrôle et de l'absence de standardisation des paramètres ventilatoires (notamment FiO₂) lors de la mesure d'eCO.¹⁸⁴ De façon contradictoire, une étude réalisée chez l'homme ne montrait pas de différence d'eCO entre des sujets sains contrôles et des patients transplantés.²⁷⁵ Néanmoins, il est possible qu'un biais méthodologique soit venu perturber les résultats de cette dernière étude. En effet, les auteurs mesuraient eCO après avoir réalisé différentes manœuvres ventilatoires afin de mesurer la concentration de NO exhalé. Notamment, l'hyperventilation et les manœuvres de recrutement pourraient avoir influencé les résultats de cette étude.³¹⁶ Par ailleurs, ces résultats discordants posent également le problème de la méthode de mesure qui n'était pas détaillée par les auteurs. En effet, plusieurs études ont démontré l'influence de la technique de mesure pour obtenir des résultats fiables d'eCO.^{289,317} En résumé et à la lumière des données antérieures publiées, l'interprétation de nos résultats doit être effectuée avec précaution même si des arguments forts sont en faveur de la mesure d'eCO en tant que biomarqueur des lésions pulmonaire d'ischémie reperfusion.

Un deuxième objectif de notre étude était de déterminer les capacités de prédiction de viabilité du greffon par eCO. La meilleure valeur prédictive négative d'eCO était obtenue

avec une valeur seuil de 0,86 ppmv. Les poumons évalués dont eCO était inférieur à cette valeur seuil remplissaient tous les critères de viabilités suivants : $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \geq 400\text{mmHg}$; PAP stable ou en diminution ; pression artérielle pulmonaire stable ou en décroissance ; pression pic stable ou en diminution, C_{dyn} stable ou en augmentation. L'intérêt d'eCO résidait dans la précocité de la prédiction de viabilité. En effet, la valeur seuil de 0,86 ppmv était fixée dès le début de la phase stable tandis que les différents critères de viabilités usuels ne sont disponibles qu'après au minimum une heure d'EVLP.⁸⁰ Cependant, l'utilisation d'eCO pour décider de la transplantation ou non des poumons aurait abouti, dans notre étude, au rejet de 3 poumons considérés comme viables après une heure d'EVLP. La courbe ROC d'eCO est à ce titre éloquent. eCO ne semblent donc pas être en mesure de prédire, à lui seul, la viabilité des greffons. Du fait de ses caractéristiques (non invasive, précoce, en temps réel), la mesure d'eCO pourrait venir en complément d'autres marqueurs de viabilité afin de guider les cliniciens dans le choix des greffons. Par exemple, eCO pourrait être analysé conjointement au profil d'expression protéique des greffons. Ces profils d'expression de protéines ont été étudiés au cours de l'EVLP afin de détecter des patterns spécifiques qui pourraient aider les cliniciens.^{96,98} Cependant, aucun pattern d'expression protéique n'a démontré une capacité de prédiction suffisante en termes d'acceptation ou de rejet des greffons. Le principal problème de l'étude des protéines et/ou des cytokines au cours de l'EVLP est la limite de détection de ces molécules dans le perfusat ou le LBA.^{96,98} Dans notre étude, IL-1 β et IL-6 étaient augmentés à J1 alors que TNF α était étonnamment diminué après 24h de ischémie froide. Le dosage de ces différents marqueurs dans le LBA soit était impossible, soit donnait des résultats aberrants. Certaines études précliniques ont montré que TNF α était augmenté, d'autres que TNF α était inchangé après 12 heures de EVLP ou même que cette molécule était indétectable dans le perfusat.^{96,98,305,318} D'autres cytokines telles qu'IL-1 β , IL-6 et IL-8 semblent montrer des variations plus constantes. Notamment, IL-8 semble avoir une bonne

valeur prédictive de DPG.⁹⁸ Nous n'avons malheureusement pas dosé IL-8 dans notre étude, l'importance de cette cytokine n'ayant été mise en avant que récemment.⁹⁸ En résumé, nous pensons que l'évaluation du poumon pendant la procédure d'EVLP devrait reposer sur une analyse globale des paramètres physiologiques et des marqueurs biochimiques y compris eCO et IL-8.

Plusieurs limites à ce travail doivent être prises en considération. Premièrement, un modèle préclinique de cochon était utilisé et la prochaine étape sera de confirmer ces résultats en milieu clinique en corrélant eCO à l'apparition de la DPG. Les capacités de prédiction d'une valeur de seuil d'eCO aux alentours de 800ppmv devront être testées. Deuxièmement, les variations d'eCO induites par le reconditionnement des poumons, pendant l'EVLP, n'étaient pas étudiées. L'un des intérêts d'eCO pourrait être sa rapidité d'évolution en fonction de l'état du greffon. Ainsi, les variations d'eCO pendant la procédure d'EVLP permettraient de juger de l'efficacité d'une thérapeutique visant à améliorer l'état du greffon. La valeur prédictive d'eCO obtenu en début de phase stable est en faveur de cette hypothèse qui doit cependant être confirmée par d'autres études. Enfin, et il s'agit là du principal biais pour l'interprétation de nos résultats, les capacités de production de CO des poumons n'étaient pas évaluées. Nos résultats indiquent qu'eCO était augmenté lorsque les lésions d'ischémie reperfusion étaient accrues. Cependant, de part ses propriétés, la production endogène de CO peut être considérée comme un mécanisme d'adaptation des poumons au stress. L'augmentation d'eCO ne serait donc que le reflet des capacités d'adaptation du poumon. Selon cette théorie, un poumon avec d'importantes lésions d'ischémie reperfusion mais produisant beaucoup de CO pourrait, après reconditionnement *ex vivo*, être viable. A l'inverse, un poumon soumis à d'importantes lésions mais excréant peu de CO serait à considérer comme non viable, ou serait potentiellement candidat à un traitement par CO inhalé. Cette limite souligne une fois de plus l'importance d'analyser eCO en fonction d'autres paramètres physiologiques et biochimiques.

CONCLUSION

V. Conclusion

Nous avons mis au point une procédure standardisée de mesure du CO exhalé pendant l'évaluation *ex vivo* de greffons pulmonaires. Cette mesure s'est avérée possible grâce à l'utilisation d'une nouvelle technique de spectrométrie laser appelée OF-CEAS. Pendant la procédure d'EVLP, eCO est soumis à d'importantes variations notamment en fonction de la FiO_2 , mais l'utilisation d'un perfusat acellulaire permet de s'affranchir de cette contrainte. Nous avons par ailleurs démontré qu'eCO est augmenté lorsque les lésions pulmonaires d'ischémie reperfusion sont accrues. eCO semble notamment corrélé à la survenue d'un œdème pulmonaire pendant l'EVLP. Ces caractéristiques font d'eCO un potentiel biomarqueur de viabilité des greffons. Néanmoins, nos résultats indiquent que l'interprétation d'eCO associée à d'autres marqueurs physiologiques et biochimiques serait sans doute la stratégie la plus pertinente pour prédire la viabilité des greffons.

RÉFÉRENCES

VI. Références

1. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-first Adult Lung and Heart–Lung Transplant Report—2014; Focus Theme: Retransplantation. *J Heart Lung Transplant* 2014;33(10):1009–24.
2. Agence de la biomédecine - Le rapport annuel médical et scientifique 2013 [Internet]. [cited 2015 Jul 25]; Available from: <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2013/donnees/organes/04-coeur-poumon/synthese.htm>
3. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2006;28(3):523–32.
4. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, et al. International variation in the prevalence of COPD (The BOLD Study): a population-based prevalence study. *The Lancet* 2007;370(9589):741–50.
5. Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, et al. International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update--a consensus report from the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006;25(7):745–55.
6. Kreider M, Kotloff RM. Selection of Candidates for Lung Transplantation. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6(1):20–7.
7. Weill D, Benden C, Corris PA, et al. A consensus document for the selection of lung transplant candidates: 2014--an update from the Pulmonary Transplantation Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2015;34(1):1–15.
8. Zheng P, Kornfield R, Olmo C, Guy J, Inadomi J, Biggins SW. Reduced effectiveness of standard recruitment for deceased organ donor registration: the need for population-specific recruitment materials. *Dig Dis Sci* 2011;56(5):1535–41.
9. Deedat S, Kenten C, Morgan M. What are effective approaches to increasing rates of organ donor registration among ethnic minority populations: a systematic review. *BMJ Open* 2013;3(12):e003453.
10. Date H, Yamane M, Toyooka S, Okazaki M, Aoe M, Sano Y. Current status and potential of living-donor lobar lung transplantation. *Front Biosci* 2008;13:1433–9.
11. Aoyama A, Chen F, Minakata K, et al. Sparing Native Upper Lobes in Living-Donor Lobar Lung Transplantation: Five Cases From a Single Center. *Am J Transplant* 2015.
12. Date H, Sato M, Aoyama A, et al. Living-donor lobar lung transplantation provides similar survival to cadaveric lung transplantation even for very ill patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2015;47(6):967–72
13. Aigner C, Mazhar S, Jaksch P, et al. Lobar transplantation, split lung transplantation and peripheral segmental resection--reliable procedures for downsizing donor lungs. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;25(2):179–83.
14. Orens JB, Boehler A, de Perrot M, et al. A review of lung transplant donor acceptability criteria. *J Heart Lung Transplant* 2003;22(11):1183–200.
15. Lee JC, Christie JD, Keshavjee S. Primary graft dysfunction: definition, risk factors, short- and long-term outcomes. *Semin Respir Crit Care Med* 2010;31(2):161–71.

16. de Perrot M, Bonser RS, Dark J, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part III: donor-related risk factors and markers. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(10):1460–7.
17. Christie JD, Kotloff RM, Ahya VN, et al. The Effect of Primary Graft Dysfunction on Survival after Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(11):1312–6.
18. Diamond JM, Christie JD. The contribution of airway and lung tissue ischemia to primary graft dysfunction. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2010;15(5):552–7.
19. Arcasoy SM, Fisher A, Hachem RR, Scavuzzo M, Ware LB. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction Part V: Predictors and Outcomes. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(10):1483–8.
20. Kotloff RM, Thabut G. Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184(2):159–71.
21. Christie JD, Carby M, Bag R, Corris P, Hertz M, Weill D. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part II: definition. A consensus statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(10):1454–9.
22. Kreisel D, Krupnick AS, Puri V, et al. Short- and long-term outcomes of 1000 adult lung transplant recipients at a single center. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 2011;141(1):215–22.
23. Whitson BA, Prekker ME, Herrington CS, et al. Primary Graft Dysfunction and Long-term Pulmonary Function After Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(10):1004–11.
24. Perrot M de, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia–Reperfusion–induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(4):490–511.
25. De Perrot M, Sekine Y, Fischer S, et al. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(2):211–5.
26. Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol* 1997;150(5):1773–84.
27. Eppinger MJ, Jones ML, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung. *J Surg Res* 1995;58(6):713–8.
28. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, et al. Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121(6):1069–75.
29. Covarrubias M, Ware LB, Kawut SM, et al. Plasma intercellular adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Transplant* 2007;7(11):2573–8.
30. Diamond JM, Wigfield CH. Role of innate immunity in primary graft dysfunction after lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2013;18(5):518–23.
31. Schmid RA, Zollinger A, Singer T, et al. Effect of soluble complement receptor type 1 on reperfusion edema and neutrophil migration after lung allotransplantation in swine. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116(1):90–7.
32. Keshavjee S, Davis RD, Zamora MR, de Perrot M, Patterson GA. A randomized, placebo-controlled trial of complement inhibition in ischemia-reperfusion injury after lung transplantation in human beings. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129(2):423–8.
33. Shah RJ, Emtiazjoo AM, Diamond JM, et al. Plasma complement levels are associated with primary graft dysfunction and mortality after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189(12):1564–7.
34. Pinsky DJ, Liao H, Lawson CA, et al. Coordinated induction of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and inhibition of plasminogen activator gene expression by hypoxia promotes pulmonary vascular fibrin

deposition. *J Clin Invest* 1998;102(5):919–28.

35. Okada K, Fujita T, Minamoto K, Liao H, Naka Y, Pinsky DJ. Potentiation of endogenous fibrinolysis and rescue from lung ischemia/reperfusion injury in interleukin (IL)-10-reconstituted IL-10 null mice. *J Biol Chem* 2000;275(28):21468–76.

36. Idell S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31(4 Suppl):S213–20.

37. Zhang X, Shan P, Alam J, Davis RJ, Flavell RA, Lee PJ. Carbon monoxide modulates Fas/Fas ligand, caspases, and Bcl-2 family proteins via the p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway during ischemia-reperfusion lung injury. *J Biol Chem* 2003;278(24):22061–70.

38. 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(3):980–8.

39. 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(1):L52–9.

40. Matthay MA, Robriquet L, Fang X. Alveolar Epithelium Role in Lung Fluid Balance and Acute Lung Injury. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(3):206–13.

41. Kaplan JD, Trulock EP, Cooper JD, Schuster DP. Pulmonary vascular permeability after lung transplantation. A positron emission tomographic study. *Am Rev Respir Dis* 1992;145(4 Pt 1):954–7.

42. Hunter DN, Morgan CJ, Yacoub M, Evans TW. Pulmonary endothelial permeability following lung transplantation. *Chest* 1992;102(2):417–21.

43. Garutti I, Sanz J, Olmedilla L, et al. Extravascular Lung Water and Pulmonary Vascular Permeability Index Measured at the End of Surgery Are Independent Predictors of Prolonged Mechanical Ventilation in Patients Undergoing Liver Transplantation. *Anesth Analg* 2015;

44. Matthay MA. Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189(11):1301–8.

45. Whitson BA, Nath DS, Johnson AC, et al. Risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131(1):73–80.

46. Pilcher DV, Snell GI, Scheinkestel CD, Bailey MJ, Williams TJ. High Donor Age, Low Donor Oxygenation, and High Recipient Inotrope Requirements Predict Early Graft Dysfunction in Lung Transplant Recipients. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(11):1814–20.

47. Samano MN, Fernandes LM, Baranauskas JCB, et al. Risk factors and survival impact of primary graft dysfunction after lung transplantation in a single institution. *Transplant Proc* 2012;44(8):2462–8.

48. Diamond JM, Lee JC, Kawut SM, et al. Clinical risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187(5):527–34.

49. Liu Y, Liu Y, Su L, Jiang S. Recipient-related clinical risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2014;9(3):e92773.

50. Gulack BC, Hirji SA, Hartwig MG. Bridge to lung transplantation and rescue post-transplant: the expanding role of extracorporeal membrane oxygenation. *J Thorac Dis* 2014;6(8):1070–9.

51. Currey J, Pilcher DV, Davies A, et al. Implementation of a management guideline aimed at minimizing the severity of primary graft dysfunction after lung transplant. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 2010;139(1):154–61.

52. Steen S, Sjöberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet* 2001;357(9259):825–9.
53. Van Raemdonck D, Neyrinck A, Cypel M, Keshavjee S. Ex-vivo lung perfusion. *Transpl Int* 2015;28(6):643–56.
54. Wallinder A, Ricksten S-E, Silverborn M, et al. Early results in transplantation of initially rejected donor lungs after ex vivo lung perfusion: a case-control study. *Eur J Cardiothorac Surg* 2014;45(1):40–4.
55. Okamoto T, Chen F, Zhang J, et al. Comparison of extracellular-type-Kyoto solution and Perfadex as a preservation solution in a pig ex vivo lung perfusion model: impact of potassium level. *Transplant Proc* 2011;43(5):1525–8.
56. Soares PRO, Braga K a. DO, Nepomuceno NA, et al. Comparison between Perfadex and locally manufactured low-potassium dextran solution for pulmonary preservation in an ex vivo isolated lung perfusion model. *Transplant Proc* 2011;43(1):84–8.
57. Roman M, Gjorgjimajkoska O, Neil D, et al. Comparison between cellular and acellular perfusates for ex vivo lung perfusion in a porcine model. *J Heart Lung Transplant* 2015;34(7):978–87.
58. Halldorsson AO, Kronon M, Allen BS, et al. Controlled reperfusion prevents pulmonary injury after 24 hours of lung preservation. *Ann Thorac Surg* 1998;66(3):877–84; discussion 884–5.
59. Guth S, Prüfer D, Kramm T, Mayer E. Length of pressure-controlled reperfusion is critical for reducing ischaemia-reperfusion injury in an isolated rabbit lung model. *J Cardiothorac Surg* 2007;2:54.
60. de Perrot M, Imai Y, Volgyesi GA, et al. Effect of ventilator-induced lung injury on the development of reperfusion injury in a rat lung transplant model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124(6):1137–44.
61. Soluri-Martins A, Sutherasan Y, Silva PL, Pelosi P, Rocco PRM. How to minimise ventilator-induced lung injury in transplanted lungs: The role of protective ventilation and other strategies. *Eur J Anaesthesiol* 2015.
62. Stone JP, Sevenoaks H, Sjöberg T, Steen S, Yonan N, Fildes JE. Mechanical removal of dendritic cell-generating non-classical monocytes via ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant* 2014;33(8):864–9.
63. Lindstedt S, Hlebowicz J, Koul B, et al. Comparative outcome of double lung transplantation using conventional donor lungs and non-acceptable donor lungs reconditioned ex vivo. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2011;12(2):162–5.
64. Ingemansson R, Eyjolfsson A, Mared L, et al. Clinical transplantation of initially rejected donor lungs after reconditioning ex vivo. *Ann Thorac Surg* 2009;87(1):255–60.
65. Wallinder A, Ricksten S-E, Hansson C, et al. Transplantation of initially rejected donor lungs after ex vivo lung perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;144(5):1222–8.
66. Cypel M, Yeung JC, Liu M, et al. Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med* 2011;364(15):1431–40.
67. Cypel M, Yeung JC, Machuca T, et al. Experience with the first 50 ex vivo lung perfusions in clinical transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;
68. Pêgo-Fernandes PM, de Medeiros IL, Mariani AW, et al. Ex vivo lung perfusion: early report of Brazilian experience. *Transplant Proc* 2010;42(2):440–3.
69. Zych B, Popov AF, Stavri G, et al. Early outcomes of bilateral sequential single lung transplantation after ex-vivo lung evaluation and reconditioning. *J Heart Lung Transplant* 2012;31(3):274–81.
70. Aigner C, Slama A, Hötzenecker K, et al. Clinical ex vivo lung perfusion--pushing the limits. *Am J*

Transplant 2012;12(7):1839–47.

71. Sage E, Mussot S, Trebbia G, et al. Lung transplantation from initially rejected donors after ex vivo lung reconditioning: the French experience. *Eur J Cardiothorac Surg* 2014;46(5):794–9.
72. Boffini M, Ricci D, Bonato R, et al. Incidence and severity of primary graft dysfunction after lung transplantation using rejected grafts reconditioned with ex vivo lung perfusion. *Eur J Cardiothorac Surg* 2014;46(5):789–93.
73. Boffini M, Ricci D, Barbero C, et al. Ex vivo lung perfusion increases the pool of lung grafts: analysis of its potential and real impact on a lung transplant program. *Transplant Proc* 2013;45(7):2624–6.
74. Warnecke G, Moradiellos J, Tudorache I, et al. Normothermic perfusion of donor lungs for preservation and assessment with the Organ Care System Lung before bilateral transplantation: a pilot study of 12 patients. *Lancet* 2012;380(9856):1851–8.
75. Valenza F, Rosso L, Gatti S, et al. Extracorporeal Lung Perfusion and Ventilation to Improve Donor Lung Function and Increase the Number of Organs Available for Transplantation. *Transplantation Proceedings* 2012;44(7):1826–9.
76. Fildes JE, Archer LD, Blaikley J, et al. Clinical Outcome of Patients Transplanted with Marginal Donor Lungs via Ex Vivo Lung Perfusion Compared to Standard Lung Transplantation. *Transplantation* 2015;99(5):1078–83.
77. Egan TM, Haithcock JA, Nicotra WA, et al. Ex vivo evaluation of human lungs for transplant suitability. *Ann Thorac Surg* 2006;81(4):1205–13.
78. Fildes JE, Archer LD, Blaikley J, et al. Clinical Outcome of Patients Transplanted with Marginal Donor Lungs via Ex Vivo Lung Perfusion Compared to Standard Lung Transplantation. *Transplantation* 2015;99(5):1078–83.
79. Medeiros IL, Pêgo-Fernandes PM, Mariani AW, et al. Histologic and functional evaluation of lungs reconditioned by ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant* 2012;31(3):305–9.
80. Yeung JC, Cypel M, Machuca TN, et al. Physiologic assessment of the ex vivo donor lung for transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2012;31(10):1120–6.
81. Cypel M, Yeung JC, Hirayama S, et al. Technique for prolonged normothermic ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant* 2008;27(12):1319–25.
82. Valenza F, Rosso L, Pizzocri M, et al. The consumption of glucose during ex vivo lung perfusion correlates with lung edema. *Transplant Proc* 2011;43(4):993–6.
83. Effros RM, Mason GR, Sietsema K, Silverman P, Hukkanen J. Fluid reabsorption and glucose consumption in edematous rat lungs. *Circ Res* 1987;60(5):708–19.
84. Valenza F, Rosso L, Coppola S, et al. β -adrenergic agonist infusion during extracorporeal lung perfusion: effects on glucose concentration in the perfusion fluid and on lung function. *J Heart Lung Transplant* 2012;31(5):524–30.
85. Koike T, Yeung JC, Cypel M, et al. Kinetics of lactate metabolism during acellular normothermic ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant* 2011;30(12):1312–9.
86. Fisher AB, Dodia C. Lactate and regulation of lung glycolytic rate. *Am J Physiol* 1984;246(5 Pt 1):E426–9.
87. Hoffman SA, Wang L, Shah CV, et al. Plasma Cytokines and Chemokines in Primary Graft Dysfunction Post-Lung Transplantation. *Am J Transplant* 2009;9(2):389.

88. Moreno I, Vicente R, Ramos F, Vicente JL, Barberá M. Determination of Interleukin-6 in Lung Transplantation: Association With Primary Graft Dysfunction. *Transplantation Proceedings* 2007;39(7):2425–6.
89. Allen JG, Lee MT, Weiss ES, Arnaoutakis GJ, Shah AS, Detrick B. Preoperative Recipient Cytokine Levels Are Associated With Early Lung Allograft Dysfunction. *Annals of Thoracic Surgery* 2012;93(6):1843–9.
90. Emaminia A, Lapar DJ, Zhao Y, et al. Adenosine A₂ A agonist improves lung function during ex vivo lung perfusion. *Ann Thorac Surg* 2011;92(5):1840–6.
91. Inci I, Hillinger S, Arni S, Kaplan T, Inci D, Weder W. Reconditioning of an injured lung graft with intrabronchial surfactant instillation in an ex vivo lung perfusion system followed by transplantation. *J Surg Res* 2013;184(2):1143–9.
92. Khalifé-Hocquemiller T, Sage E, Dorfmüller P, et al. Exogenous surfactant attenuates lung injury from gastric-acid aspiration during ex vivo reconditioning in pigs. *Transplantation* 2014;97(4):413–8.
93. Noda K, Shigemura N, Tanaka Y, et al. Hydrogen preconditioning during ex vivo lung perfusion improves the quality of lung grafts in rats. *Transplantation* 2014;98(5):499–506.
94. Gennai S, Souilamas R, Maignan M, Brouta A, Pison C, Fontaine E, Briot R. Effect Of Cyclosporine A In Ex Vivo Reperfused Pig Lungs. *Microcirculation*. 2014 Jan;21(1):84-92.
95. Stanzi A, Neyrinck A, Somers J, et al. Do we need to cool the lung graft after ex vivo lung perfusion? A preliminary study. *J Surg Res* 2014;192(2):647–55.
96. Sadaria MR, Smith PD, Fullerton DA, et al. Cytokine Expression Profile in Human Lungs Undergoing Normothermic Ex-Vivo Lung Perfusion. *The Annals of Thoracic Surgery* 2011;92(2):478–84.
97. George TJ, Arnaoutakis GJ, Beaty CA, et al. A Physiologic and Biochemical Profile of Clinically Rejected Lungs on a Normothermic Ex Vivo Lung Perfusion Platform. *J Surg Res* 2013;183(1):75–83.
98. Machuca TN, Cypel M, Yeung JC, et al. Protein expression profiling predicts graft performance in clinical ex vivo lung perfusion. *Ann Surg* 2015;261(3):591–7.
99. Machuca TN, Cypel M, Zhao Y, et al. The role of the endothelin-1 pathway as a biomarker for donor lung assessment in clinical ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant* 2015;
100. Roberts AM, Slaaf DW, Joshua IG. Potentiation of pulmonary arteriolar vasoconstriction to endothelin-1 by inhibition of nitric oxide synthesis in the intact lung. *Microcirculation* 1998;5(4):289–98.
101. Berger MM, Rozendal CS, Schieber C, et al. The effect of endothelin-1 on alveolar fluid clearance and pulmonary edema formation in the rat. *Anesth Analg* 2009;108(1):225–31.
102. Sato Y, Hogg JC, English D, van Eeden SF. Endothelin-1 changes polymorphonuclear leukocytes' deformability and CD11b expression and promotes their retention in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23(3):404–10.
103. 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(2):269–75.
104. Shirasawa M, Fujiwara N, Hirabayashi S, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes Cells* 2004;9(2):165–74.
105. Buckley ST, Ehrhardt C. The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and the Lung. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010;2010:1–12.
106. Calfee CS, Budev MM, Matthay MA, et al. Plasma Receptor for Advanced Glycation Endproducts Predicts

Duration of ICU Stay and Mechanical Ventilation in Patients Following Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(7):675–80.

107. Christie JD, Shah CV, Kawut SM, et al. Plasma Levels of Receptor for Advanced Glycation End Products, Blood Transfusion, and Risk of Primary Graft Dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180(10):1010–5.

108. Pelaez A, Force SD, Gal AA, et al. Receptor for advanced glycation end products in donor lungs is associated with primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Transplant* 2010;10(4):900–7.

109. Sanchez PG, Rajagopal K, Pham SM, Griffith BP. Defining quality during ex vivo lung perfusion: The University of Maryland experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015;

110. Bernard C. Leçons sur les effets des substances toxiques et médicamenteuses / par Claude Bernard,... ; publié par le Dr A. Tripier [Internet]. J.-B. Baillière et fils (Paris); 1857 [cited 2015 Aug 3]. Available from: <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k773289>

111. Sjostrand T. The formation of carbon monoxide by the decomposition of haemoglobin in vivo. *Acta Physiol Scand* 1952;26(4):338–44.

112. Haldane JB. Carbon Monoxide as a Tissue Poison. *Biochem J* 1927;21(5):1068–75.

113. Roderique JD, Josef CS, Feldman MJ, Spiess BD. A modern literature review of carbon monoxide poisoning theories, therapies, and potential targets for therapy advancement. *Toxicology* 2015;334:45–58.

114. Rodgers PA, Vreman HJ, Dennery PA, Stevenson DK. Sources of carbon monoxide (CO) in biological systems and applications of CO detection technologies. *Semin Perinatol* 1994;18(1):2–10.

115. Vreman HJ, Wong RJ, Sanesi CA, Dennery PA, Stevenson DK. Simultaneous production of carbon monoxide and thiobarbituric acid reactive substances in rat tissue preparations by an iron-ascorbate system. *Can J Physiol Pharmacol* 1998;76(12):1057–65.

116. Noguchi M, Yoshida T, Kikuchi G. Specific requirement of NADPH-cytochrome c reductase for the microsomal heme oxygenase reaction yielding biliverdin IX alpha. *FEBS Lett* 1979;98(2):281–4.

117. Yoshida T, Migita CT. Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. *J Inorg Biochem* 2000;82(1-4):33–41.

118. Ryter SW, Choi AMK. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Transl Res.* 2015 Jun 23. pii: S1931-5244(15)00216-9.

119. Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 1986;261(1):411–9.

120. Ryter SW, Alam J, Choi AMK. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006;86(2):583–650.

121. Levitt DG, Levitt MD. Carbon monoxide: a critical quantitative analysis and review of the extent and limitations of its second messenger function. *Clin Pharmacol* 2015;7:37–56.

122. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517–54.

123. Cruse I, Maines MD. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J Biol Chem* 1988;263(7):3348–53.

124. Rotenberg MO, Maines MD. Characterization of a cDNA-encoding rabbit brain heme oxygenase-2 and identification of a conserved domain among mammalian heme oxygenase isozymes: possible heme-binding site? *Arch Biochem Biophys* 1991;290(2):336–44.

125. Shibahara S, Müller R, Taguchi H, Yoshida T. Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *PNAS* 1985;82(23):7865–9.
126. Ishikawa K, Sato M, Yoshida T. Expression of rat heme oxygenase in *Escherichia coli* as a catalytically active, full-length form that binds to bacterial membranes. *Eur J Biochem* 1991;202(1):161–5.
127. Kim HP, Wang X, Galbiati F, Ryter SW, Choi AMK. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J* 2004;18(10):1080–9.
128. Ozaki KS, Kimura S, Murase N. Use of carbon monoxide in minimizing ischemia/reperfusion injury in transplantation. *Transplant Rev* 2012;26(2):125–39.
129. Alam J. Multiple elements within the 5' distal enhancer of the mouse heme oxygenase-1 gene mediate induction by heavy metals. *J Biol Chem* 1994;269(40):25049–56.
130. Alam J, Cai J, Smith A. Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals. *J Biol Chem* 1994;269(2):1001–9.
131. Camhi SL, Alam J, Wiegand GW, Chin BY, Choi AMK. Transcriptional Activation of the HO-1 Gene by Lipopolysaccharide Is Mediated by 5' Distal Enhancers: Role of Reactive Oxygen Intermediates and AP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18(2):226–34.
132. Lee PJ, Camhi SL, Chin BY, Alam J, Choi AM. AP-1 and STAT mediate hyperoxia-induced gene transcription of heme oxygenase-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(1):L175–82.
133. Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 1999;274(37):26071–8.
134. Alam J, Cook JL. Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway. *Curr Pharm Des* 2003;9(30):2499–511.
135. Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med* 2004;37(8):1097–104.
136. Beckman JD, Chen C, Nguyen J, et al. Regulation of heme oxygenase-1 protein expression by miR-377 in combination with miR-217. *J Biol Chem* 2011;286(5):3194–202.
137. Aguado-Fraile E, Ramos E, Sáenz-Morales D, et al. miR-127 Protects Proximal Tubule Cells against Ischemia/Reperfusion: Identification of Kinesin Family Member 3B as miR-127 Target. *PLoS One*. 2012;7(9):e44305.
138. Lorenzen JM, Kaucsar T, Schauerte C, et al. MicroRNA-24 antagonism prevents renal ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2014;25(12):2717–29.
139. Coburn RF, Blakemore WS, Forster RE. Endogenous carbon monoxide production in man. *J Clin Invest* 1963;42:1172–8.
140. Coburn RF. The measurement of endogenous carbon monoxide production. *J Appl Physiol* 2012;112(11):1949–55.
141. Luomanmaki K, Coburn R. Effects of metabolism and distribution of carbon monoxide on blood and body stores. *Am J Physiol* 1969;217:354–63.
142. Brown SD, Piantadosi CA. In vivo binding of carbon monoxide to cytochrome c oxidase in rat brain. *J Appl Physiol* 1990;68(2):604–10.
143. Agostoni A, Stabilini R, Viggiano G, Luzzana M, Samaja M. Influence of capillary and tissue PO₂ on carbon monoxide binding to myoglobin: a theoretical evaluation. *Microvasc Res* 1980;20(1):81–7.

144. Coburn RF, Forster RE, Kane PB. Considerations of the physiological variables that determine the blood carboxyhemoglobin concentration in man. *J Clin Invest* 1965;44(11):1899–910.
145. Von Burg R. Carbon monoxide. *J Appl Toxicol* 1999;19(5):379–86.
146. Stadie WC, Martin KA. The elimination of carbon monoxide from the blood. *J Clin Invest* 1925;2(1):77–91.
147. Fenn WO. The burning of CO in tissues. *Ann N Y Acad Sci* 1970;174(1):64–71.
148. Young LJ, Caughey WS. Mitochondrial oxygenation of carbon monoxide. *Biochem J* 1986;239(1):225–7.
149. Wagner JA, Horvath SM, Dahms TE. Carbon monoxide elimination. *Respir Physiol* 1975;23(1):41–7.
150. Zavorsky GS, Smoliga JM, Longo LD, et al. Increased carbon monoxide clearance during exercise in humans. *Med Sci Sports Exerc* 2012;44(11):2118–24.
151. Ishida S, Takeuchi A, Azami T, et al. Cardiac output increases the rate of carbon monoxide elimination in hyperpneic but not normally ventilated dogs. *J Anesth* 2007;21(2):181–6.
152. Rose CS, Jones RA, Jenkins LJ, Siegel J. The acute hyperbaric toxicity of carbon monoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 1970;17(3):752–60.
153. Keyse SM, Tyrrell RM. Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 1987;262(30):14821–5.
154. Taketani S, Kohno H, Yoshinaga T, Tokunaga R. The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS Lett* 1989;245(1-2):173–6.
155. Chin BY, Trush MA, Choi AMK, Risby TH. Transcriptional regulation of the HO-1 gene in cultured macrophages exposed to model airborne particulate matter. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284(3):L473–80.
156. Camhi SL, Alam J, Otterbein L, Sylvester SL, Choi AM. Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13(4):387–98.
157. Calabrese V, Scapagnini G, Catalano C, et al. Regulation of heat shock protein synthesis in human skin fibroblasts in response to oxidative stress: role of vitamin E. *Int J Tissue React* 2001;23(4):127–35.
158. Otterbein LE, Kolls JK, Mantell LL, Cook JL, Alam J, Choi AM. Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury. *J Clin Invest* 1999;103(7):1047–54.
159. Ryter SW, Morse D, Choi AMK. Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36(2):175–82.
160. Zhang PL, Lun M, Schworer CM, et al. Heat Shock Protein Expression Is Highly Sensitive to Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Kidneys. *Ann Clin Lab Sci* 2008;38(1):57–64.
161. Aggeli I-KS, Gaitanaki C, Beis I. Involvement of JNKs and p38-MAPK/MSK1 pathways in H₂O₂-induced upregulation of heme oxygenase-1 mRNA in H9c2 cells. *Cell Signal* 2006;18(10):1801–12.
162. Ockaili R, Natarajan R, Salloum F, et al. HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(2):H542–8.
163. Wu S-Y, Li M-H, Ko F-C, Wu G-C, Huang K-L, Chu S-J. Protective effect of hypercapnic acidosis in ischemia-reperfusion lung injury is attributable to upregulation of heme oxygenase-1. *PLoS ONE* 2013;8(9):e74742.

164. Ning W, Song R, Li C, et al. TGF-beta1 stimulates HO-1 via the p38 mitogen-activated protein kinase in A549 pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283(5):L1094–102.
165. Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. TNF-alpha and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 via protein kinase C, Ca²⁺, and phospholipase A2 in endothelial cells. *Am J Physiol* 1999;276(5 Pt 2):H1493–501.
166. Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;274(3 Pt 2):H883–91.
167. Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, Immenschuh S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol* 2010;80(12):1895–903.
168. Zhang X, Bedard EL, Potter R, et al. Mitogen-activated protein kinases regulate HO-1 gene transcription after ischemia-reperfusion lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283(4):L815–29.
169. Jones AW, Durante W, Korthuis RJ. Heme oxygenase-1 deficiency leads to alteration of soluble guanylate cyclase redox regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;335(1):85–91.
170. Wang WZ, Jones AW, Wang M, Durante W, Korthuis RJ. Preconditioning with soluble guanylate cyclase activation prevents postischemic inflammation and reduces nitrate tolerance in heme oxygenase-1 knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;305(4):H521–32.
171. Ogawa K, Sun J, Taketani S, et al. Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J* 2001;20(11):2835–43.
172. Oyake T, Itoh K, Motohashi H, et al. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol Cell Biol* 1996;16(11):6083–95.
173. Zegdi R, Perrin D, Burdin M, Boiteau R, Tenaillon A. Increased endogenous carbon monoxide production in severe sepsis. *Intensive Care Med* 2002;28(6):793–6.
174. Montuschi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled carbon monoxide and nitric oxide in COPD. *Chest* 2001;120(2):496–501.
175. Sato S, Nishimura K, Koyama H, et al. Optimal Cutoff Level of Breath Carbon Monoxide for Assessing Smoking Status in Patients With Asthma and COPD. *Chest* 2003;124(5):1749–54.
176. Chatkin G, Chatkin JM, Aued G, Petersen GO, Jeremias ET, Thiesen FV. Evaluation of the exhaled carbon monoxide levels in smokers with COPD. *J Bras Pneumol* 2010;36(3):332–8.
177. Shorter JH, Nelson DD, McManus JB, Zahniser MS, Sama SR, Milton DK. Clinical study of multiple breath biomarkers of asthma and COPD (NO, CO₂, CO and N₂O) by infrared laser spectroscopy. *J Breath Research* 2011;5(3):037108.
178. Paredi P, Shah PL, Montuschi P, et al. Increased carbon monoxide in exhaled air of patients with cystic fibrosis. *Thorax* 1999;54(10):917–20.
179. Zayasu K, Sekizawa K, Okinaga S, Yamaya M, Ohru T, Sasaki H. Increased Carbon Monoxide in Exhaled Air of Asthmatic Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(4):1140–3.
180. Horvath I, Loukides S, Wodehouse T, Kharitonov S, Cole P, Barnes P. Increased levels of exhaled carbon monoxide in bronchiectasis: a new marker of oxidative stress. *Thorax* 1998;53(10):867–70.
181. Zhang J, Yao X, Yu R, et al. Exhaled carbon monoxide in asthmatics: a meta-analysis. *Respir Res* 2010;11:50.
182. Shaoqing Y, Ruxin Z, Yingjian C, Jianqiu C, Yanshen W, Genhong L. A meta-analysis of the association of

- exhaled carbon monoxide on asthma and allergic rhinitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;41(1):67–75.
183. Hayashi M, Takahashi T, Morimatsu H, et al. Increased carbon monoxide concentration in exhaled air after surgery and anesthesia. *Anesth Analg* 2004;99(2):444–8.
184. Adachi T, Hirota K, Hara T, Sasaki Y, Hara Y. Exhaled carbon monoxide levels change in relation to inspired oxygen fraction during general anesthesia. *Anesth Analg* 2007;105(3):696–9.
185. Scharte M, Bone HG, Van Aken H, Meyer J. Increased carbon monoxide in exhaled air of critically ill patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267(1):423–6.
186. Scharte M, von Ostrowski TA, Daudel F, Freise H, Van Aken H, Bone HG. Endogenous carbon monoxide production correlates weakly with severity of acute illness. *Eur J Anaesthesiol* 2006;23(2):117–22.
187. Morimatsu H, Takahashi T, Maeshima K, et al. Increased heme catabolism in critically ill patients: correlation among exhaled carbon monoxide, arterial carboxyhemoglobin, and serum bilirubin IXalpha concentrations. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290(1):L114–9.
188. Hou J, Cai S, Kitajima Y, et al. 5-Aminolevulinic acid combined with ferrous iron induces carbon monoxide generation in mouse kidneys and protects from renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013;305(8):F1149–57.
189. Matsusaki T, Morimatsu H, Takahashi T, et al. Increased exhaled carbon monoxide concentration during living donor liver transplantation. *Int J Mol Med* 2008;21(1):75–81.
190. Matsumi J, Morimatsu H, Matsusaki T, et al. Heme breakdown and ischemia/reperfusion injury in grafted liver during living donor liver transplantation. *Int J Mol Med* 2012;29(2):135–40.
191. Schober P, Kalmanowicz M, Schwarte LA, Loer SA. Cardiopulmonary bypass increases endogenous carbon monoxide production. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2009;23(6):802–6.
192. Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 1994;33(18):5636–40.
193. Deinum G, Stone JR, Babcock GT, Marletta MA. Binding of nitric oxide and carbon monoxide to soluble guanylate cyclase as observed with Resonance raman spectroscopy. *Biochemistry* 1996;35(5):1540–7.
194. Matsumoto H, Ishikawa K, Itabe H, Maruyama Y. Carbon monoxide and bilirubin from heme oxygenase-1 suppresses reactive oxygen species generation and plasminogen activator inhibitor-1 induction. *Mol Cell Biochem* 2006;291(1-2):21–8.
195. Maruyama K, Morishita E, Yun T, et al. Carbon monoxide (CO)-releasing molecule-derived CO regulates tissue factor and plasminogen activator inhibitor type 1 in human endothelial cells. *Thromb Res* 2012;130(3):e188–93.
196. Failli P, Vannacci A, Di Cesare Mannelli L, Motterlini R, Masini E. Relaxant effect of a water soluble carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) on spontaneously hypertensive rat aortas. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012;26(4):285–92.
197. Foresti R, Hammad J, Clark JE, et al. Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Br J Pharmacol* 2004;142(3):453–60.
198. Sylvester JT, McGowan C. The effects of agents that bind to cytochrome P-450 on hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circ Res* 1978;43(3):429–37.
199. Hasan RN, Schafer AI. Hemin upregulates Egr-1 expression in vascular smooth muscle cells via reactive

- oxygen species ERK-1/2-Elk-1 and NF-kappaB. *Circ Res* 2008;102(1):42–50.
200. Hoetzel A, Dolinay T, Vallbracht S, et al. Carbon monoxide protects against ventilator-induced lung injury via PPAR-gamma and inhibition of Egr-1. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(11):1223–32.
201. Bernardini C, Zannoni A, Bacci ML, Forni M. Protective effect of carbon monoxide pre-conditioning on LPS-induced endothelial cell stress. *Cell Stress Chaperones* 2010;15(2):219–24.
202. Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, et al. Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med* 2003;9(2):183–90.
203. Song R, Mahidhara RS, Liu F, Ning W, Otterbein LE, Choi AMK. Carbon monoxide inhibits human airway smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27(5):603–10.
204. Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH, Soares MP. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277(20):17950–61.
205. Zhao S, Lin Q, Li H, et al. Carbon monoxide releasing molecule-2 attenuated ischemia/reperfusion-induced apoptosis in cardiomyocytes via a mitochondrial pathway. *Mol Med Rep* 2014;9(2):754–62.
206. Wang X, Wang Y, Lee S-J, Kim HP, Choi AM, Ryter SW. Carbon monoxide inhibits Fas activating antibody-induced apoptosis in endothelial cells. *Med Gas Res* 2011;1(1):8.
207. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000;192(7):1015–26.
208. Dérijard B, Raingeaud J, Barrett T, et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 1995;267(5198):682–5.
209. Sawle P, Foresti R, Mann BE, Johnson TR, Green CJ, Motterlini R. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *Br J Pharmacol* 2005;145(6):800–10.
210. Song R, Ning W, Liu F, et al. Regulation of IL-1beta -induced GM-CSF production in human airway smooth muscle cells by carbon monoxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284(1):L50–6.
211. Tsoyi K, Lee TY, Lee YS, et al. Heme-Oxygenase-1 Induction and Carbon Monoxide-Releasing Molecule Inhibit Lipopolysaccharide (LPS)-Induced High-Mobility Group Box 1 Release in Vitro and Improve Survival of Mice in LPS- and Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis Model in Vivo. *Mol Pharmacol* 2009;76(1):173–82.
212. Alshehri A, Bourguignon M-P, Clavreul N, et al. Mechanisms of the vasorelaxing effects of CORM-3, a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule: interactions with eNOS. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2013;386(3):185–96.
213. Ryter SW, Choi AMK. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: novel therapeutic strategies in critical care medicine. *Curr Drug Targets* 2010;11(12):1485–94.
214. Foresti R, Bani-Hani MG, Motterlini R. Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges. *Intensive Care Med* 2008;34(4):649–58.
215. Motterlini R, Mann BE, Foresti R. Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. *Expert Opin Investig Drugs* 2005;14(11):1305–18.

216. Motterlini R. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): vasodilatory, anti-ischaemic and anti-inflammatory activities. *Biochemical Society Transactions* 2007;35(5):1142–6.
217. Romão CC, Blättler WA, Seixas JD, Bernardes GJL. Developing drug molecules for therapy with carbon monoxide. *Chemical Society Reviews* 2012;41(9):3571.
218. Cabrales P, Tsai AG, Intaglietta M. Hemorrhagic shock resuscitation with carbon monoxide saturated blood. *Resuscitation* 2007;72(2):306–18.
219. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide-bound red blood cell resuscitation ameliorates hepatic injury induced by massive hemorrhage and red blood cell resuscitation via hepatic cytochrome P450 protection in hemorrhagic shock rats. *J Pharm Sci* 2014;103(7):2199–206.
220. Amersi F. Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway. *Hepatology* 2002;35(4):815–23.
221. Brugger J, Schick MA, Brock RW, et al. Carbon monoxide has antioxidative properties in the liver involving p38 MAP kinase pathway in a murine model of systemic inflammation. *Microcirculation*. 2010;17(7):504-13.
222. Kim HJ, Joe Y, Kong JS, et al. Carbon monoxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury via ROS-dependent Akt signaling and inhibition of glycogen synthase kinase 3 β . *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:306421.
223. Kim HJ, Joe Y, Yu JK, et al. Carbon monoxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by modulating the miR-34a/SIRT1 pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2015;1852(7):1550–9.
224. Wei Y, Chen P, de Bruyn M, Zhang W, Bremer E, Helfrich W. Carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2) attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *BMC gastroenterology* 2010;10(1):42.
225. Stec DE, Bishop C, Rimoldi JM, Poreddy SR, Vera T, Salahudeen AK. Carbon monoxide (CO) protects renal tubular epithelial cells against cold-rewarm apoptosis. *Ren Fail* 2007;29(5):543–8.
226. Faleo G, Neto JS, Kohmoto J, et al. Carbon monoxide ameliorates renal cold ischemia-reperfusion injury with an upregulation of vascular endothelial growth factor by activation of hypoxia-inducible factor. *Transplantation* 2008;85(12):1833–40.
227. Ruan Y, Wang L, Zhao Y, et al. Carbon monoxide potently prevents ischemia-induced high-mobility group box 1 translocation and release and protects against lethal renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 2014;86(3):525–37.
228. Bagul A, Hosgood SA, Kaushik M, Nicholson ML. Carbon monoxide protects against ischemia-reperfusion injury in an experimental model of controlled nonheartbeating donor kidney. *Transplantation* 2008;85(4):576–81.
229. Hosgood SA, Bagul A, Kaushik M, Rimoldi J, Gadepalli RS, Nicholson ML. Application of nitric oxide and carbon monoxide in a model of renal preservation. *Br J Surg* 2008;95(8):1060–7.
230. Hanto DW, Maki T, Yoon MH, et al. Intraoperative administration of inhaled carbon monoxide reduces delayed graft function in kidney allografts in Swine. *Am J Transplant* 2010;10(11):2421–30.
231. Snijder PM, van den Berg E, Whiteman M, Bakker SJL, Leuvenink HGD, van Goor H. Emerging role of gasotransmitters in renal transplantation. *Am J Transplant* 2013;13(12):3067–75.
232. Katada K, Bihari A, Mizuguchi S, et al. Carbon monoxide liberated from CO-releasing molecule (CORM-

- 2) attenuates ischemia/reperfusion (I/R)-induced inflammation in the small intestine. *Inflammation* 2010;33(2):92–100.
233. Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, et al. Protective effect of carbon monoxide inhalation for cold-preserved small intestinal grafts. *Surgery* 2003;134(2):285–92.
234. Varadi J, Lekli I, Juhasz B, et al. Beneficial effects of carbon monoxide-releasing molecules on post-ischemic myocardial recovery. *Life Sci* 2007;80(17):1619–26.
235. Bak I, Varadi J, Nagy N, Vecsernyes M, Tosaki A. The role of exogenous carbon monoxide in the recovery of post-ischemic cardiac function in buffer perfused isolated rat hearts. *Cell Mol Biol* 2005;51(5):453–9.
236. Soni H, Patel P, Rath AC, Jain M, Mehta AA. Cardioprotective effect with carbon monoxide releasing molecule-2 (CORM-2) in isolated perfused rat heart: Role of coronary endothelium and underlying mechanism. *Vascul Pharmacol* 2010;53(1-2):68–76.
237. Soni HM, Jain MR, Mehta AA. Mechanism(s) Involved in Carbon Monoxide-releasing Molecule-2-mediated Cardioprotection During Ischaemia-reperfusion Injury in Isolated Rat Heart. *Indian J Pharm Sci* 2012;74(4):281–91.
238. Goebel U, Siepe M, Mecklenburg A, et al. Reduced pulmonary inflammatory response during cardiopulmonary bypass: effects of combined pulmonary perfusion and carbon monoxide inhalation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34(6):1165–72.
239. Schallner N, Fuchs M, Schwer CI, et al. Postconditioning with inhaled carbon monoxide counteracts apoptosis and neuroinflammation in the ischemic rat retina. *PLoS One* 2012;7(9):e46479.
240. Szabo ME, Gallyas E, Bak I, et al. Heme oxygenase-1-related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(10):3727–32.
241. Biermann J, Lagrèze WA, Dimitriu C, Stoykow C, Goebel U. Preconditioning with inhalative carbon monoxide protects rat retinal ganglion cells from ischemia/reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(7):3784–91.
242. Ozaki KS, Yoshida J, Ueki S, et al. Carbon monoxide inhibits apoptosis during cold storage and protects kidney grafts donated after cardiac death. *Transpl Int* 2012;25(1):107–17.
243. Nakao A, Neto JS, Kanno S, et al. Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am J Transplant* 2005;5(2):282–91.
244. Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, et al. Carbon monoxide inhalation protects rat intestinal grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2003;163(4):1587–98.
245. Sandouka A, Fuller BJ, Mann BE, Green CJ, Foresti R, Motterlini R. Treatment with CO-RMs during cold storage improves renal function at reperfusion. *Kidney Int* 2006;69(2):239–47.
246. Tomiyama K, Ikeda A, Ueki S, et al. Inhibition of Kupffer cell-mediated early proinflammatory response with carbon monoxide in transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Hepatology* 2008;48(5):1608–20.
247. Yoshida J, Ozaki KS, Nalesnik MA, et al. Ex vivo application of carbon monoxide in UW solution prevents transplant-induced renal ischemia/reperfusion injury in pigs. *Am J Transplant* 2010;10(4):763–72.
248. Neto JS, Nakao A, Kimizuka K, et al. Protection of transplant-induced renal ischemia-reperfusion injury with carbon monoxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287(5):F979–89.
249. Musameh MD, Green CJ, Mann BE, Fuller BJ, Motterlini R. Improved myocardial function after cold

- storage with preservation solution supplemented with a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3). *J Heart Lung Transplant* 2007;26(11):1192–8.
250. Ikeda A, Ueki S, Nakao A, et al. Liver graft exposure to carbon monoxide during cold storage protects sinusoidal endothelial cells and ameliorates reperfusion injury in rats. *Liver Transpl* 2009;15(11):1458–68.
251. Donnelly LE, Barnes PJ. Expression of heme oxygenase in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24(3):295–303.
252. Lee PJ, Alam J, Wiegand GW, Choi AM. Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(19):10393–8.
253. Fogg S, Agarwal A, Nick HS, Visner GA. Iron regulates hyperoxia-dependent human heme oxygenase 1 gene expression in pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20(4):797–804.
254. Solari V, Piotrowska AP, Puri P. Expression of heme oxygenase-1 and endothelial nitric oxide synthase in the lung of newborns with congenital diaphragmatic hernia and persistent pulmonary hypertension. *J Pediatr Surg* 2003;38(5):808–13.
255. Park Y-Y. Ischemia/reperfusion Lung Injury Increases Serum Ferritin and Heme Oxygenase-1 in Rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 2009;13(3):181–7.
256. Polla BS, Kantengwa S, Gleich GJ, Kondo M, Reimert CM, Junod AF. Spontaneous heat shock protein synthesis by alveolar macrophages in interstitial lung disease associated with phagocytosis of eosinophils. *Eur Respir J* 1993;6(4):483–8.
257. Fujita T, Toda K, Karimova A, et al. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat Med* 2001;7(5):598–604.
258. Mishra S, Fujita T, Lama VN, et al. Carbon monoxide rescues ischemic lungs by interrupting MAPK-driven expression of early growth response 1 gene and its downstream target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(13):5191–6.
259. Zhang X, Shan P, Otterbein LE, et al. Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogen-activated protein kinase pathway and involves caspase 3. *J Biol Chem* 2003;278(2):1248–58.
260. Zhang X, Shan P, Alam J, Fu X-Y, Lee PJ. Carbon monoxide differentially modulates STAT1 and STAT3 and inhibits apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 kinase-dependent STAT3 pathway during anoxia-reoxygenation injury. *J Biol Chem* 2005;280(10):8714–21.
261. Chin BY, Jiang G, Wegiel B, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(12):5109–14.
262. Song R, Kubo M, Morse D, et al. Carbon monoxide induces cytoprotection in rat orthotopic lung transplantation via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Am J Pathol* 2003;163(1):231–42.
263. Sethi JM, Otterbein LE, Choi AMK. Differential modulation by exogenous carbon monoxide of TNF- α stimulated mitogen-activated protein kinases in rat pulmonary artery endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2002;4(2):241–8.
264. Kohmoto J, Nakao A, Stolz DB, et al. Carbon monoxide protects rat lung transplants from ischemia-reperfusion injury via a mechanism involving p38 MAPK pathway. *Am J Transplant* 2007;7(10):2279–90.
265. Sahara H, Shimizu A, Setoyama K, et al. Carbon monoxide reduces pulmonary ischemia-reperfusion injury

- in miniature swine. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;139(6):1594–601.
266. Dong B, Stewart PW, Egan TM. Postmortem and ex vivo carbon monoxide ventilation reduces injury in rat lungs transplanted from non-heart-beating donors. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013;146(2):429–36.e1.
267. Zhou H, Qian H, Liu J, et al. Protection against lung graft injury from brain-dead donors with carbon monoxide, biliverdin, or both. *J Heart Lung Transplant* 2011;30(4):460–6.
268. Sahara H, Shimizu A, Setoyama K, et al. Beneficial effects of perioperative low-dose inhaled carbon monoxide on pulmonary allograft survival in MHC-inbred CLAWN miniature swine. *Transplantation* 2010;90(12):1336–43.
269. Zhou H-C, Ding W-G, Cui X-G, Pan P, Zhang B, Li W-Z. Carbon monoxide inhalation ameliorates conditions of lung grafts from rat brain death donors. *Chin Med J* 2008;121(15):1411–9.
270. Kohmoto J, Nakao A, Sugimoto R, et al. Carbon monoxide-saturated preservation solution protects lung grafts from ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;136(4):1067–75.
271. Kohmoto J, Nakao A, Kaizu T, et al. Low-dose carbon monoxide inhalation prevents ischemia/reperfusion injury of transplanted rat lung grafts. *Surgery* 2006;140(2):179–85.
272. Yamamoto S, Okazaki M, Yamane M, et al. Peculiar mechanisms of graft recovery through anti-inflammatory responses after rat lung transplantation from donation after cardiac death. *Transpl Immunol* 2012;26(2-3):133–9.
273. VanMuylem A, Knoop C, Estenne M. Early detection of chronic pulmonary allograft dysfunction by exhaled biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(7):731–6.
274. Vos R, Cordemans C, Vanaudenaerde BM, et al. Exhaled carbon monoxide as a noninvasive marker of airway neutrophilia after lung transplantation. *Transplantation* 2009;87(10):1579–83.
275. Cameli P, Bargagli E, Fossi A, et al. Exhaled nitric oxide and carbon monoxide in lung transplanted patients. *Respir Med*. 2015 Jul 9. pii: S0954-6111(15)30018-4.
276. Ryter SW, Choi AMK. Carbon monoxide in exhaled breath testing and therapeutics. *J Breath Res* 2013;7(1):017111.
277. Obermeier J, Trefz P, Wex K, Sabel B, Schubert JK, Miekisch W. Electrochemical sensor system for breath analysis of aldehydes, CO and NO. *J Breath Res* 2015;9(1):016008.
278. Konvalina G, Haick H. Sensors for breath testing: from nanomaterials to comprehensive disease detection. *Acc Chem Res* 2014;47(1):66–76.
279. Kosterev AA, Malinovsky AL, Tittel FK, et al. Cavity ringdown spectroscopic detection of nitric oxide with a continuous-wave quantum-cascade laser. *Appl Opt* 2001;40(30):5522–9.
280. Mürtz M, Halmer D, Horstjann M, Thelen S, Hering P. Ultra sensitive trace gas detection for biomedical applications. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2006;63(5):963–9.
281. Parameswaran KR, Rosen DI, Allen MG, Ganz AM, Risby TH. Off-axis integrated cavity output spectroscopy with a mid-infrared interband cascade laser for real-time breath ethane measurements. *Appl Opt* 2009;48(4):B73–9.
282. Thorpe MJ, Balslev-Clausen D, Kirchner MS, Ye J. Cavity-enhanced optical frequency comb spectroscopy: application to human breath analysis. *Opt Express* 2008;16(4):2387–97.
283. Ventrillard-Courtillot I, Gonthiez T, Clerici C, Romanini D. Multispecies breath analysis faster than a single respiratory cycle by optical-feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy. *J Biomed Opt*

2009;14(6):064026.

284. Kassi S, Chenevier M, Gianfrani L, et al. Looking into the volcano with a Mid-IR DFB diode laser and Cavity Enhanced Absorption Spectroscopy. *Opt Express* 2006;14(23):11442–52.

285. Kerstel E, Lannone R, Chenevier M, Kassi S, Jost H, Romanini D. A water isotope (2H , 17O , and 18O) spectrometer based on optical-feedback cavity enhanced absorption for in-situ airborne applications. *Apl Phys B* 2006;85:397–406.

286. Morville J, Kassi S, Chenevier M, Romanini D. Fast, low-noise, mode-by-mode, cavity-enhanced absorption spectroscopy by diode-laser self-locking. *Apl Phys B* 2005;80:1027–38.

287. Baconnier PF, Eberhard A, Grimbert FA. Theoretical analysis of occlusion techniques for measuring pulmonary capillary pressure. *J Appl Physiol* 1992;73(4):1351–9.

288. Stepanov E. Methods of highly sensitive gas analysis of molecular biomarkers in study of exhaled air. *Physics of Wave Phenomena* 2007;15(3):149–81.

289. Fritsch T, Hering P, Mürtz M. Infrared laser spectroscopy for online recording of exhaled carbon monoxide—a progress report. *J Breath Res* 2007;1(1):014002.

290. Moeskops B, Naus H, Cristescu S, Harren F. Quantum cascade laser-based carbon monoxide detection on a second time scale from human breath. *Appl Phys B* 2006;82(4):649–54.

291. Kappas A, Drummond GS, Sardana MK. Sn-protoporphyrin rapidly and markedly enhances the heme saturation of hepatic tryptophan pyrrolase. Evidence that this synthetic metalloporphyrin increases the functional content of heme in the liver. *J Clin Invest* 1985;75(1):302–5.

292. Sassa S, Drummond GS, Bernstein SE, Kappas A. Long-term administration of massive doses of Sn-protoporphyrin in anemic mutant mice (spha/spha). *J Exp Med* 1985;162(3):864–76.

293. Simionatto CS, Anderson KE, Drummond GS, Kappas A. Studies on the mechanism of Sn-protoporphyrin suppression of hyperbilirubinemia. Inhibition of heme oxidation and bilirubin production. *J Clin Invest* 1985;75(2):513–21.

294. Sardana MK, Kappas A. Dual control mechanism for heme oxygenase: tin(IV)-protoporphyrin potently inhibits enzyme activity while markedly increasing content of enzyme protein in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84(8):2464–8.

295. Vanova K, Suk J, Petr T, et al. Protective effects of inhaled carbon monoxide in endotoxin-induced cholestasis is dependent on its kinetics. *Biochimie* 2014;97:173–80.

296. Kaizu T, Tamaki T, Tanaka M, et al. Preconditioning with tin-protoporphyrin IX attenuates ischemia/reperfusion injury in the rat kidney. *Kidney Int* 2003;63(4):1393–403.

297. Goebel U, Siepe M, Mecklenburg A, et al. Carbon monoxide inhalation reduces pulmonary inflammatory response during cardiopulmonary bypass in pigs. *Anesthesiology* 2008;108(6):1025–36.

298. Bruce MC, Bruce EN. Analysis of factors that influence rates of carbon monoxide uptake, distribution, and washout from blood and extravascular tissues using a multicompartiment model. *J Appl Physiol* 2006;100(4):1171–80.

299. Koistinen K, Kotzias D, Kephelopoulos S, et al. The INDEX project: executive summary of a European Union project on indoor air pollutants. *Allergy* 2008;63(7):810–9.

300. Dolinay T, Szilasi M, Liu M, Choi AMK. Inhaled carbon monoxide confers antiinflammatory effects against ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(6):613–20.

301. Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999;276(4 Pt 1):L688–94.
302. Hampson NB, Weaver LK, Piantadosi CA. “Low-Level” Carbon Monoxide Administration May Carry Risk. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(6):784–784.
303. Parving HH. The effect of hypoxia and carbon monoxide exposure on plasma volume and capillary permeability to albumin. *Scand J Clin Lab Invest* 1972;30(1):49–56.
304. Thom SR, Fisher D, Xu YA, Garner S, Ischiropoulos H. Role of nitric oxide-derived oxidants in vascular injury from carbon monoxide in the rat. *Am J Physiol* 1999;276(3 Pt 2):H984–92.
305. Mulloy DP, Stone ML, Crosby IK, et al. Ex vivo rehabilitation of non-heart-beating donor lungs in preclinical porcine model: delayed perfusion results in superior lung function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;144(5):1208–15.
306. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, et al. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg* 2002;73(4):1041–7.
307. Thabut G, Mal H, Cerrina J, et al. Graft ischemic time and outcome of lung transplantation: a multicenter analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(7):786–91.
308. Hengst WA den, Gielis JF, Lin JY, Schil PEV, Windt LJD, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299(5):H1283–99.
309. Sommer W, Kühn C, Tudorache I, et al. Extended criteria donor lungs and clinical outcome: results of an alternative allocation algorithm. *J Heart Lung Transplant* 2013;32(11):1065–72.
310. Zych B, García Sáez D, Sabashnikov A, et al. Lung transplantation from donors outside standard acceptability criteria – are they really marginal? *Transpl Int* 2014;27(11):1183–91.
311. Kim Y-M, Pae H-O, Park JE, et al. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2011;14(1):137–67.
312. Wilkinson WJ, Kemp PJ. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels. *J Physiol* 2011;589:3055–62.
313. Althaus M, Fronius M, Buchäcker Y, et al. Carbon monoxide rapidly impairs alveolar fluid clearance by inhibiting epithelial sodium channels. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41(6):639–50.
314. Wang S, Publicover S, Gu Y. An oxygen-sensitive mechanism in regulation of epithelial sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(8):2957–62.
315. Suzuki Y, Cantu E, Christie JD. Primary graft dysfunction. *Semin Respir Crit Care Med* 2013;34(3):305–19.
316. Cavaliere F, Volpe C, Gargaruti R, et al. Effects of acute hypoventilation and hyperventilation on exhaled carbon monoxide measurement in healthy volunteers. *BMC Pulm Med* 2009;9:51.
317. Moscato U, Poscia A, Gargaruti R, Capelli G, Cavaliere F. Normal values of exhaled carbon monoxide in healthy subjects: comparison between two methods of assessment. *BMC Pulm Med* 2014;14:204.
318. Kakishita T, Oto T, Hori S, et al. Suppression of inflammatory cytokines during ex vivo lung perfusion with an adsorbent membrane. *Ann Thorac Surg* 2010;89(6):1773–9.

Abstract

Rationale: *Ex vivo* lung perfusion (EVLP) is a promising technique to reduce the shortage of organs available for transplantation. Carbon monoxide (CO) might help in the selection of grafts during EVLP as its endogenous production is increased by ischemia reperfusion.

Objectives: To develop a measurement technique of exhaled CO (eCO) during EVLP and to study its variations depending on ischemia reperfusion injuries.

Methods: Using a pig model of EVLP and using a laser spectrometer technique based on the principle of a resonant cavity (optical feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy-OF-CEAS), we measured eCO under different ventilatory parameters, various polluted environments with poor (<0,015ppmv) or rich (9ppmv) CO gas, and after infusion of an inhibitor of heme oxygenase (SnPP). We then compared eCO after 30 min (D0) or 24 h (D1) of cold ischemia and determined the predictive value of eCO to select lung grafts.

Results: In isolated lungs, the concentration of eCO reached 0.45 ± 0.19 ppmv. eCO peaks during the expiratory phase. Neither variations of the fraction of inspired oxygen, nor the pollution of the ambient air altered eCO. eCO concentrations were not different after SnPP infusion. eCO was higher on day 1 compared to day 0 (1.35 ± 0.259 vs. 0.951 ± 0.313 ppmv, $p = 0.01$) and correlated with an index of the permeability of the alveolar capillary membrane. The best threshold value of eCO determined from the ROC curve was 0.860 ppmv (sensitivity 1 (0.31 to 1), specificity of 0.44 (0.15 to 0.77), positive predictive value of 0, 37 (0.10 to 0.74), negative predictive value of 1 (0.39 to 1)).

Conclusions: Measurements of eCO during EVLP is feasible. eCO is significantly higher when ischemia-reperfusion injuries are increased. However, eCO can not be used in isolation to select lung grafts.

Keywords: ischemia reperfusion, lung transplantation, carbon monoxide

Résumé

Rationnel : Le développement des techniques de reperfusion pulmonaire *ex vivo* (*Ex vivo* lung perfusion : EVLP) vise à réduire la pénurie d'organes disponibles pour la transplantation.

Le monoxyde de carbone (CO) pourrait aider à la sélection des greffons en cours d'EVLP puisque sa production endogène est augmentée en situation d'ischémie reperfusion.

Objectifs : Mettre au point une technique de mesure du CO exhalé (eCO) lors de l'EVLP et étudier ses variations en fonction des lésions d'ischémie reperfusion.

Méthodes : À partir d'un modèle porcin d'EVLP et à l'aide d'un appareil de spectrométrie laser basé sur le principe d'une cavité résonnante (optical-feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy: OF-CEAS), eCO était mesuré selon différents paramètres ventilatoires, en ambiances polluées par des gaz pauvres ($< 0,015$ ppmv) ou riches (9ppmv) en CO et après perfusion d'un inhibiteur de l'hème oxygénase (SnPP). eCO était ensuite comparé après 30 min (J0) ou 24 h (J1) d'ischémie froide et sa valeur prédictive pour sélectionner des greffons était calculée.

Résultats : La concentration d'eCO de poumons isolés était de $0,45 \pm 0,19$ ppmv. Les pics d'eCO se produisaient pendant la phase expiratoire. Ni les variations de fraction inspirée en oxygène, ni la pollution de l'air ambiant ne modifiaient eCO. Les concentrations d'eCO n'étaient pas différentes après perfusion de SnPP. eCO était plus élevé à J1 par rapport à J0 ($1,35 \pm 0,259$ ppmv vs. $0,951 \pm 0,313$, $p = 0,01$) et était corrélé à un indice de perméabilité de la membrane alvéolo capillaire. La meilleure valeur seuil d'eCO déterminée à partir de la courbe ROC était 0,860 ppmv (sensibilité de 1 (0,31 – 1), spécificité de 0,44 (0,15 – 0,77), valeur prédictive positive de 0,37 (0,10 – 0,74), valeur prédictive négative de 1 (0,39 – 1)).

Conclusions : La mesure d'eCO en condition d'EVLP est faisable. eCO est significativement augmenté lorsque les lésions d'ischémie reperfusion sont accrues mais eCO ne peut pas être utilisé de façon isolée pour sélectionner les greffons pulmonaires.

Mots clés: ischémie reperfusion, transplantation pulmonaire, monoxyde de carbone