



HAL
open science

Monitoring of pulmonary inflammation by endogenous carbon monoxide exhaled in a model of human lungs: Application during optimization of lung grafts in Ex-Vivo pulmonary perfusion. Étude BreathDiag-COe

Vivien Brenckmann

► To cite this version:

Vivien Brenckmann. Monitoring of pulmonary inflammation by endogenous carbon monoxide exhaled in a model of human lungs: Application during optimization of lung grafts in Ex-Vivo pulmonary perfusion. Étude BreathDiag-COe. Biotechnologies. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALS006 . tel-03123141

HAL Id: tel-03123141

<https://theses.hal.science/tel-03123141>

Submitted on 24 Feb 2021

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 : BIS - Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Vivien BRECKMANN

Thèse dirigée par **Raphaël BRIOT**, Université Grenoble Alpes

préparée au sein du **Laboratoire Techniques de L'Ingénierie Médicale et de la Complexité - Informatique, Mathématiques et Applications (TIMC-IMAG)**.

dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement**

**Monitoring de l'inflammation pulmonaire par le monoxyde de carbone endogène exhalé dans un modèle de poumons humains : Application lors d'optimisation de greffons en perfusion pulmonaire Ex-Vivo avant transplantation pulmonaire.
Étude BreathDiag-COe**

Thèse soutenue publiquement le **14 septembre 2020**, devant le jury composé de :

Monsieur Raphaël BRIOT

MAITRE DE CONF UNIV. - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE GRENOBLE ALPES, Directeur de thèse

Monsieur Jean-Luc FELLAHI

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE LYON 1, Rapporteur

Monsieur Olaf MERCIER

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE PARIS-SUD, Rapporteur

Monsieur Edouard SAGE

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE DE VERSAILLES - UVSQ, Examineur

Monsieur Christophe PISON

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE GRENOBLE ALPES, Président

Monsieur Dirk VAN RAEMDONCK

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., KU LEUVEN - BELGIQUE, Examineur

Madame Irène VENTRILLARD

MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES, Examinatrice

RESUME	7
INTRODUCTION	7
MOTS CLES	9
LISTE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	11
1- LA GREFFE PULMONAIRE.....	12
A- <i>Description, indications et intérêts pour les receveurs</i>	12
B- <i>Lésions d'ischémie-reperfusion et répercussions chez les receveurs</i>	13
C- <i>Sélection des donneurs</i>	15
D- <i>Développement de la Perfusion pulmonaire Ex-Vivo (PPEV)</i>	16
E- <i>Description des procédures de PPEV</i>	18
2 - LE MONOXYDE DE CARBONE EXPIRE COMME MARQUEUR PHYSIOLOGIQUE DE L'INFLAMMATION PULMONAIRE..	24
3 - TECHNIQUE OF-CEAS (OPTICAL FEEDBACK - CAVITY ENHANCED ABSORPTION SPECTROSCOPY) POUR LA	
MESURE DU MONOXYDE DE CARBONE EXHALE	28
A- <i>Description du mode de fonctionnement</i>	28
B- <i>Avantages de l'OF-CEAS</i>	30
OBJECTIFS	31
METHODE	32
1- PHASE DE TRAVAIL PREPARATOIRE EN AMONT DES MESURES SUR GREFFONS.....	33
A- <i>Développement du ProCEAS[®] Médical</i>	33
B- <i>Analyse de Risque du ProCEAS[®] médical</i>	35
C- <i>Validation de l'utilisation du ProCEAS[®] sur volontaires sains en bloc opératoire</i>	36
2- ÉTUDE SUR GREFFONS PULMONAIRES HUMAINS	38
A- <i>Financement du développement du ProCEAS[®] médical : ANR BreathDiag</i>	38
B- <i>Rapprochement avec l'équipe chirurgicale de l'hôpital Foch de Suresnes</i>	39
C- <i>Aspects éthiques</i>	39
D- <i>Type d'étude</i>	40
E- <i>Critères d'inclusion</i>	40
3- METHODOLOGIE DE L'ETUDE	41
<i>Réalisation des mesures</i>	41
A- <i>Installation et mesures préparatoires au bloc opératoire</i>	41
B- <i>Branchement du ProCEAS[®]</i>	41
4- RECUEIL ET TRAITEMENT DES DONNEES	43
A- <i>Mesure du CO exhalé</i>	43
B- <i>Traitement des données du ProCEAS[®] médical</i>	43
C- <i>Description générale des courbes de monitoring de COe</i>	44
D- <i>Choix de l'analyse du COe en fin de recrutement</i>	49
E- <i>Données provenant des donneurs décédés : fiches cristaux</i>	49
F- <i>Données des greffons pulmonaires lors des procédures de PPEV</i>	49
G- <i>Analyses des protéines inflammatoires</i>	50
H- <i>Recueil des données chez les receveurs</i>	51
I- <i>Analyses statistiques</i>	52

RESULTATS	53
1- PROCEDURES DE PPEV INCLUSES, CARACTERISTIQUES DES DONNEURS ET DES RECEVEURS	54
<i>Diagramme de flux</i>	56
2- FAISABILITE DU MONITORAGE DE COE, ANALYSE DES COURBES ET FIABILITE DES MESURES	57
A- <i>Faisabilité</i>	57
B- <i>Données générales, moyennes (max-min) sur 5 minutes lors des phases d'intérêt</i>	57
C- <i>Fiabilité : Aspect des courbes de COe, stabilité des mesures de COe sur 5 minutes</i>	61
3- MONITORAGE DU COE POUR L' EVALUATION DES GREFFONS PER PPEV	61
A- <i>Caractéristiques anamnestiques des donneurs, caractéristiques physiologiques des poumons avant prélèvement et liens avec le COe</i>	61
B- <i>Raison d'entrée en procédure de PPEV et taux de COe</i>	66
C- <i>Taux moyen de COe en fin de recrutement</i>	67
D- <i>Acceptation des greffons pour la transplantation et taux de COe</i>	68
E- <i>Détermination d'un seuil de COe élevé</i>	69
F- <i>Variation de production du COe au cours des procédures pour chaque greffon</i>	71
G- <i>Taux de COe en fonction du temps de première ischémie froide</i>	72
H- <i>Comparaison du COe aux autres marqueurs habituellement testés durant les procédures de PPEV pour l'évaluation des greffons</i>	74
I- <i>Évolution post opératoire des receveurs et taux de COe per PPEV</i>	79
4- ANALYSE DES MARQUEURS BIOLOGIQUES INFLAMMATOIRES (CYTOKINES)	85
A- <i>Comparaisons des cytokines à l'acceptation des greffons</i>	85
B- <i>Comparaisons des cytokines aux taux de COe</i>	85
C- <i>Comparaison des cytokines à d'autres marqueurs testés lors des procédures de PPEV</i>	88
D- <i>Analyse des protéines inflammatoires et données cliniques post-opératoires</i>	89
DISCUSSION	91
1- PRINCIPAUX RESULTATS	92
2- DESCRIPTION DES MESURES DE COE	94
A- <i>Interprétation des courbes de COe et influence des paramètres ventilatoires</i>	94
B- <i>Interprétation du COe en fonction du donneur</i>	99
C- <i>Taux de COe et durée de première ischémie froide</i>	103
3- LE MONOXYDE DE CARBONE EXHALE COMME MARQUEUR PRONOSTIQUE	105
A- <i>Taux de COe et acceptation des greffons</i>	105
B- <i>COe, rapport PaO₂/FiO₂ et compliances pulmonaires per PPEV</i>	106
C- <i>Comparaison aux autres marqueurs habituellement testés</i>	107
D- <i>COe et évolution des receveurs post transplantation</i>	109
E- <i>Seuil de COe en fin de premier recrutement</i>	110
F- <i>Analyse des marqueurs biologiques</i>	110
G- <i>COe comme marqueur de lutte du tissu pulmonaire</i>	113
4- LIMITES	114
CONCLUSION	117
BIBLIOGRAPHIE	118
ANNEXES	124
ANNEXE 1 : ÉTUDE DE FAISABILITE SUR VOLONTAIRES SAINS : ARTICLE PUBLIE	124
ANNEXE 2 : ASPECTS ADMINISTRATIFS	132
<i>Rapport de l'analyse de risque du ProCEAS®</i>	132

Remerciements

Aux membres du jury

Monsieur le Professeur Christophe Pison

Je vous remercie énormément pour votre enthousiasme et vos encouragements répétés tout au long de ce travail. Votre aide a été très précieuse à de nombreuses reprises pour faciliter le rapprochement avec l'équipe du Pr Sage, via vos conseils lors de nos nombreuses réunions pour la réalisation du projet ou encore dans l'élaboration du jury. J'aime vous côtoyer et j'espère que nous aurons l'occasion de travailler de nouveau ensemble. Je suis vraiment honoré que vous ayez accepté de présider ce jury.

Monsieur le Dr Raphael Briot

Raphael, merci pour tout ce que tu m'as apporté dans ma formation d'urgentiste, de chercheur et dans ma vie personnelle. Je me souviens encore de cette réunion d'information sur la médecine d'urgence au tout début de mon internat. Naïvement j'avais levé la main pour savoir par où commencer pour faire de la recherche, nous avons pris rendez-vous, très rapidement le contact était passé. Tu m'as fait confiance. Se retrouver au milieu d'un tel projet a été extrêmement enrichissant notamment sur les plans scientifique, administratif, relationnel et également personnel, travaillant la confiance et la persévérance. Le projet BreathDiag dans son ensemble a été une sacrée aventure. Nous avons rencontré de nombreux obstacles et tu as su nous orienter toujours justement pour les contourner.

Tu m'as aiguillé et éclairé dans beaucoup de mes choix. Ta gentillesse, ton calme et ton humanité m'impressionnent en toutes circonstances.

Merci pour ces opportunités que tu m'as offertes. Que de chemin depuis le début de l'aventure, la route est encore longue et je m'en réjouis d'avance. Merci.

Monsieur le Pr Édouard Sage

Merci Édouard d'avoir accepté de collaborer avec nous et merci de m'avoir ouvert les portes de ton bloc opératoire. Tu as été enthousiaste dès la première présentation du projet et je dois bien avouer que cela m'a bien « boosté » pour qu'il se réalise et que je vienne à Paris. J'ai adoré passer du temps avec toi que ce soit au bloc opératoire ou en dehors. J'espère sincèrement que nous aurons l'occasion de nous revoir.

Tu m'impressionnes dans ta capacité à synthétiser et simplifier les problèmes. Merci pour ton aide précieuse et ton expertise sur le sujet de la greffe pulmonaire et dans l'analyse des résultats.

Madame le Docteur Irène Ventrillard

Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance à chaque fois que nous nous sommes rencontrés. Merci pour toutes tes explications sur le fonctionnement de l'OF-CEAS, pour ton soutien, ton accompagnement et tes encouragements répétés. Merci de m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire de physique. T'avoir à mes côtés a été déterminant dans la réalisation du projet.

Monsieur le Professeur Jean-Luc Fellahi

Nous ne nous connaissons pas encore mais je suis honoré que vous ayez accepté de juger mon travail. Je suis heureux que vous représentiez l'équipe lyonnaise et j'espère que nous pourrons continuer à tisser des liens entre les deux équipes.

Monsieur le Professeur Olaf Mercier

Vous m'avez été chaudement recommandé pour juger mon travail et je suis très heureux que vous ayez accepté.

Monsieur le Professeur Dirk Van Raemdonck

Je suis honoré de vous savoir membre de mon jury. Vous avez accepté instantanément. Vous êtes un des grands experts internationaux de la greffe pulmonaire et je suis très heureux que vous jugiez ce travail. Vous compter parmi les membres du jury est à la fois une chance et un challenge.

A tous ceux qui m'ont aidé et accompagné dans la réalisation de ce projet

A l'équipe de transplantation de l'hôpital Foch et plus particulièrement Gérard, Marie-Caroline, Frédéric, Dr Julien de Wolf et Dr Mathieu Glorion

Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe, pour toutes vos explications et votre aide dans la réalisation des mesures.

Monsieur le Professeur Alexandre Moreau-Gaudry

Merci de m'avoir encouragé à prendre la route de la recherche. Je me souviens encore de ce café que vous m'aviez offert lorsque que je commençais à réfléchir à prendre le chemin du Master. Merci également pour votre aide pour la réalisation du projet.

Madame Maud Barbado

Merci énormément pour ton aide, notamment pour la rédaction du protocole.

A l'équipe du CIC de Grenoble

Merci pour votre aide dans la réalisation du projet.

Madame le Docteur Candice Trocmé et Madame Angélique Brouta

Merci pour votre aide et votre collaboration pour l'analyse des liquides de perfusion.

A l'Equipe PRETA

Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe et votre laboratoire.

Monsieur le Professeur Guillaume Debaty

Travailler à tes côtés est un réel plus. Ton expertise dans la médecine d'urgence nous éclaire à chaque staff. Merci pour la confiance dont tu me témoignes pour la réalisation de différents projets.

Monsieur le Professeur Maxime Maignan

Merci pour tes conseils. Merci pour ton implication dans le service. Nous nous connaissons au final assez peu et j'espère que nous aurons l'occasion de partager plus de projets à l'avenir.

A toute l'équipe des urgences et du SAMU 38, ma famille professionnelle

Mathilde

Merci de partager notre vie. Merci pour tes encouragements, ton soutien et ta patience. Vivre avec toi est ce qui me rend le plus heureux.

Etienne

Merci d'avoir été un modèle depuis mon plus jeune âge.

Françoise

Merci pour tes encouragements, ton soutien et la relecture de ce travail. J'ai vraiment eu de la chance d'être libre et accompagné dans tous mes choix.

Oriane

Merci d'avoir partagé la maison et de m'avoir vu et fait grandir.

Résumé

Introduction

Pour pallier au manque de greffons pulmonaires, des techniques de Perfusion Pulmonaire *Ex-Vivo* (PPEV) ont été développées. Les critères d'évaluation sont basés sur les paramètres physiologiques comme la qualité des échanges gazeux, les résistances vasculaires pulmonaires, la formation d'œdème, et l'aspect général des poumons.

La production endogène de monoxyde de carbone (CO) est influencée par les phénomènes inflammatoires et est plus particulièrement en lien avec les mécanismes d'ischémie-reperfusion.

La mesure du CO exhalé (COe) est possible grâce à un spectromètre laser (ProCeas®). Cet appareil est précis (concentrations inférieures au Partie par million (ppm)) et rapide permettant un monitoring cycle à cycle, en temps réel.

Le but de l'étude était d'évaluer le taux de COe des greffons pulmonaires humains en cours de procédure de PPEV et de le comparer à l'acceptation des greffons, aux autres paramètres testés et au devenir à court terme des receveurs.

Matériel et méthode

Des greffons pulmonaires ont été optimisés et évalués en PPEV normothermique. Les poumons étaient progressivement réchauffés, perfusés et ventilés. S'en suivait une phase d'évaluation (incluant des manœuvres de recrutement) durant deux à quatre heures.

Le ProCeas® était connecté en dérivation sur le circuit ventilatoire. La production de CO était moyennée sur cinq minutes à la fin de chaque phase de recrutement.

En fin de procédure de PPEV, la décision de transplanter les poumons était prise selon les critères habituels de l'équipe chirurgicale sans avoir connaissance des valeurs de COe.

Résultats et Discussion

21 procédures de PPEV ont eu lieu à l'hôpital Foch de Suresnes de Décembre 2018 à Juillet 2019, dont 13 greffons à « critères élargis » (CE) et 8 issus de donneurs après arrêt cardiaque (de la catégorie III de Maastricht) (DDAC-M3).

La présence de sang dans les voies aériennes faussait les résultats de COe, ainsi trois procédures ont été exclues. Il n'y avait pas de différence de COe en fonction de l'origine CE ou DDAC-M3 des poumons.

Sur les 18 greffons, deux ont été définitivement récusés à la greffe. Il y avait une tendance à un COe plus élevé pour les poumons récusés ($p=0,068$). Cette tendance était présente dès le début des procédures.

Concernant les paramètres physiologiques testés lors des procédures de PPEV, le COe était corrélé à la consommation de glucose ($\rho=0,64$; $p=0,04$) et à la production de lactates ($\rho=0,53$; $p=0,025$). Il y avait une relation non significative avec les résistances vasculaires ($p=0,062$). Il n'y avait pas de lien entre COe ni avec la formation d'œdème ni avec le rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ per PPEV.

Concernant les données post-opératoires, en séparant les greffons en 2 groupes (COe bas Vs COe élevé, limite fixée à 0,235 ppm), il y avait une tendance à de meilleures capacités d'échange gazeux ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) à 24h ($p=0,029$) pour ceux ayant un taux de COe bas. Il y avait également une tendance à des durées plus longues de réanimation (6 jours ($\pm 3,25$) Vs 15 jours ($\pm 3,83$), $p=0,06$) et de durée totale en unité de soins continus (réanimation + soins intensifs) (14,5 jours ($\pm 2,34$) vs 19 jours ($\pm 3,4$) ($p=0,07$)) pour les greffons avec un taux de COe élevé. Tous les poumons avec taux de COe élevé ont présenté un score de Dysfonction Primaire du Greffon à 3 dans les 72h.

Conclusion

Le taux de COe per PPEV pourrait être une aide supplémentaire et précoce dans l'évaluation des poumons. Il semble pouvoir également apporter une aide pronostique pour anticiper les soins de réanimation post opératoires.

Abstract

Monitoring of lung inflammation by endogenous exhaled carbon monoxide in a model of human lungs : Application in *Ex-Vivo* Lung Perfusion before lung transplant : BreathDiag-COe

Introduction

To compensate the lack of pulmonary grafts, *ex-vivo* lung perfusion techniques (EVLP) have been developed. The evaluation criteria are based on physiological parameters such as the quality of gas exchange, pulmonary vascular resistance, edema formation, and the general appearance of the lungs.

The endogenous production of carbon monoxide (CO) is influenced by inflammatory phenomena and is more particularly linked to the mechanisms of Ischemia-reperfusion.

The measurement of exhaled CO (eCO) is possible thanks to a laser spectrometer (ProCeas®). This device is precise (concentrations lower than parts per million (ppm)) and fast allowing cycle-to-cycle monitoring, in real time.

The aim of the study was to assess the eCO level of human lung grafts during the EVLP procedure and to compare it with the acceptance of the grafts, the other parameters tested and the short-term outcome of the recipients.

Material and method

Lung grafts have been optimized and evaluated in normothermic EVLP. The lungs were gradually warmed, perfused and ventilated. This was followed by an evaluation phase (including recruitment maneuvers) lasting two to four hours.

The ProCeas® was connected in bypass to the ventilation circuit. CO production was averaged over five minutes at the end of each recruitment procedure.

At the end of the EVLP procedure, the decision to transplant the lungs was taken according to the usual criteria of the surgical team without knowing the value of eCO.

Results and discussion

21 procedures took place at Foch Hospital in Suresnes (France) from December 2018 to July 2019, including 13 grafts with extended criteria (EC) and 8 from donors after cardiac arrest (Category III of Maastricht) (DDCA-M3).

The presence of blood in the airways distorted the eCO results, so three procedures were excluded.

There was no difference in eCO based on the EC or DDCA-M3 origin of the lungs.

Of the 18 grafts, two were definitively rejected for the transplant. There was a tendency for higher eCO for the recused lungs ($p=0.068$). This trend was present from the start of the procedures.

Regarding the physiological parameters tested during EVLP procedures, eCO was correlated with glucose consumption ($\rho=0.64$; $p=0.04$) and lactate production ($\rho=0.53$; $p=0.025$). There was a non-significant relationship with vascular resistance ($p=0.062$). There was no association between eCO neither with edema formation nor with the ratio PaO₂ / FiO₂ per PPEV.

Concerning the post-operative data, by separating the grafts into 2 groups (low eCO Vs high eCO, limit fixed at 0,235 ppm), there was a tendency to better capacities of gas exchanges (PaO₂/FiO₂) at 24h ($p=0.029$) for those with a low eCO level. There was also a tendency for longer durations of resuscitation (6 days (± 3.25) vs 15 days (± 3.83), $p=0.06$) and total duration in the continuing care unit (resuscitation + intensive care) (14.5 days (± 2.34) vs 19 days (± 3.4) ($p=0.07$)) for grafts with a high COe level. All lungs with high eCO levels presented a PGD score of 3 within 72 hours.

Conclusion

The eCO level per EVLP could be an additional and early aid in the evaluation of the lungs. It also seems to be able to provide prognostic help to anticipate post-operative resuscitation care.

Mots clés

Français

Greffe pulmonaire, Perfusion Pulmonaire *Ex-Vivo*, Inflammation pulmonaire, Ischémie-reperfusion, Monoxyde de Carbone, Spectroscopie, OF-CEAS, Gazotransmetteur

Anglais

Lung transplant, *Ex-Vivo* Lung Perfusion, Lung Inflammation, Ischemia-reperfusion, Carbon Monoxide, Spectroscopy, OF-CEAS, Gazotransmitters

Liste des abréviations

ABM : Agence de biomédecine

ANOVA : Analyse de variance

BPCO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive

CE : Critères élargis

CEC : Circulation extracorporelle

cm H₂O : Centimètres d'eau

CO : Monoxyde de carbone

CO_e : Monoxyde de carbone endogène exhalé

DDAC-M3 : Donneur décédé à cœur arrêté de catégorie Maastricht 3

DPG : Dysfonction Primaire du greffon

ECMO : ExtraCorporeal Membrane Oxygenation (oxygénation par membrane extracorporelle)

FiO₂ : Fraction inspirée en Oxygène

FR : Fréquence respiratoire

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

IL : Interleukine

ISHLT : International Society for Heart and Lung Transplantation

LiPhy : Laboratoire interdisciplinaire de Physique

mm Hg : Millimètre de mercure

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

Pa CO₂ : Pression partielle de dioxyde de carbone

Pa O₂ : Pression partielle artérielle en oxygène

PEP : Pression expiratoire positive

PPEV : Perfusion pulmonaire *Ex-Vivo*

ppb : Parts per billion

ppm : Parts per million

PRETA : Physiologie cardio-Respiratoire Expérimentale Théorique et Appliquée

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aigue

RAGE : Receptor for advanced glycation end products

RVP : Résistances vasculaires pulmonaires

TIMC-IMAG : Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité - Informatique, Mathématiques et Applications

TNF : Tumoral Necrosis Factor

Introduction

1- La greffe pulmonaire

A- Description, indications et intérêts pour les receveurs

L'amélioration des techniques de transplantation pulmonaire et de la gestion péri-opératoires des patients greffés incite les équipes médicales à proposer une greffe pulmonaire de manière plus précoce et à un nombre croissant de patients souffrant d'insuffisance respiratoire chronique^[1]. Les principales indications de greffe pulmonaires sont représentées par la bronchopneumopathie chronique obstructive, la mucoviscidose et les fibroses pulmonaires^[2].

La greffe pulmonaire permet d'une part d'augmenter l'espérance de vie mais aussi et surtout la qualité de vie de ces patients. Elle permet également une réduction, à long terme, des coûts de santé pour la prise en charge des patients^{[2],[3]}.

Cependant, malgré l'augmentation significative du nombre de greffes pulmonaires réalisées chaque année en France (378 transplantations en 2017, Rapport annuel Agence de Biomédecine (ABM)), le nombre de patients sur liste d'attente ne diminue pas. Ceci est en parti dû à l'élargissement des indications de greffe pulmonaire^[4].

Le nombre d'organes disponibles est encore insuffisant et près de 5% des patients décèdent sur liste d'attente avant d'avoir pu bénéficier d'une greffe.

Contrairement aux organes comme le cœur ou les reins, les poumons sont prélevés chez seulement 20% des donneurs en mort encéphalique (rapport annuel ABM), car ils ne remplissent souvent pas les critères d'acceptabilité et de prélèvement des recommandations internationales.

Les critères d'évaluation et d'acceptation des greffons pulmonaires sont rigoureux et stricts, les poumons étant des organes extrêmement fragiles. Toute dysfonction du greffon chez le receveur, entraîne le nécessité de soins de support souvent très lourds ainsi qu'un risque de mortalité élevé^{[5],[6],[7]}.

B- Lésions d'ischémie-reperfusion et répercussions chez les receveurs

Le patient greffé est exposé à un certain nombre de complications. Parmi les complications graves, la dysfonction primaire du greffon (DPG) est l'une des principales et arrive pour les transplantations classiques dans environ 10% à 15% des cas^[8]. Elle est notamment la conséquence de lésions d'ischémie-reperfusion, due à la privation temporaire de sang et d'oxygène pour le poumon après son prélèvement, suivi de sa reperfusion entraînant le développement de mécanismes inflammatoires en cascades, conduisant à des lésions tissulaires^{6,[9],[10],[11],[12]}.

Les principaux mécanismes au niveau microscopique sont influencés par la production de protéines inflammatoire (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α)^{[13],[14],[15]}, le recrutement de leucocytes et de neutrophiles^[16], l'activation des macrophages^{[15],[17]} et l'activation du complément^{[18],[19]}. La formation de micro thrombi^[20] participe également aux mécanismes physiopathologiques induits par les lésions d'ischémie-reperfusion.

Enfin, les lésions secondaires aux mécanismes d'ischémie-reperfusion entraînent l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires^[21] et des défauts de réabsorption du liquide alvéolaire par les canaux sodiques^[22].

Ces lésions se traduisent principalement par des lésions de la barrière alvéolo-capillaire et de l'épithélium alvéolaire qui n'est plus capable d'assurer sa fonction de réabsorption liquidienne alvéolaire active^{[23],[24]}.

Au total l'ischémie-reperfusion entraine une atteinte endothéliale qui provoque une augmentation de la filtration de liquide et de protéines vers l'interstitium, une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires et une diminution des capacités de réabsorption de liquide alvéolaire par les cellules épithéliales alvéolaires^[13].

L'ensemble de ces lésions induisent un œdème pulmonaire principalement exsudatif secondaire à l'inflammation donc riche en protéines inflammatoires avec infiltration leucocytaire^[23].

L'œdème pulmonaire entraîne in-fine une altération des échanges gazeux alvéolaires. Les conséquences de ces lésions d'ischémie-reperfusion chez les greffons vont se répercuter chez le receveur^{[25],[26]}.

Elles peuvent se manifester par des minimes œdèmes pulmonaires de revascularisation allant jusqu'au tableau de syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). La société internationale de greffe et de transplantation pulmonaire (ISHLT ; International Society for Heart and Lung Transplantation) a proposé une classification en 2005^[27] et révisée en 2016^[8]. Cette classification est basée sur la présence d'œdème pulmonaire visible sur la radiographie thoracique et sur le rapport PaO_2/FiO_2 , présentée dans le Tableau 1. Cette classification est évaluée toutes les 24h, les 72 premières heures post greffe (T0, T24, T48, T72). Notons que le recours à l'ECMO (oxygénation par membrane extracorporelle) associé à la présence d'œdème pulmonaire à la radiographie classe le patient en grade 3.

Tableau 1: Catégorisation des stades de dysfonction primaire du greffon selon l'ISHLT

Grade DPG	Œdème pulmonaire (radiographie thoracique)	PaO_2/FiO_2 (mmHg)
0	Non	indifférent
1	Oui	>300
2	Oui	200-300
3	Oui	<200 ou ECMO

PaO_2/FiO_2 , mesurée, chez les patients ventilés à une FiO_2 de 1et à une PEP de 5 CmH₂O, si les patients ne sont pas ventilés il est tout de même possible d'utiliser le rapport PaO_2/FiO_2 ,

Grade 0 : Pas d'Œdème pulmonaire sur la radiographie de thorax

Grade 1 : Œdème pulmonaire présent sans altération G du rapport PaO_2/FiO_2 (mmHg) >300

Grade 2 : Œdème pulmonaire et altération du rapport PaO_2/FiO_2 (mmHg) entre 200 et 300

Grade 3 : Œdème pulmonaire et altération du rapport PaO_2/FiO_2 (mmHg) <200

ou utilisation d'une ECMO

De telles complications de dysfonction primaire du greffon vont nécessiter des soins lourds dont une ventilation mécanique prolongée, l'utilisation de monoxyde d'azote, et parfois le recours à l'ECMO entraînant des séjours prolongés en réanimation. Dans les formes les plus sévères, la mortalité précoce atteint 20 à 40%^{[8],[28],[29]}. De plus, la sévérité de la dysfonction primaire du greffon est corrélée à un plus fort taux de dysfonction tardive du poumon greffé (bronchiolite oblitérante)^{[11],[29],[30]}.

C- Sélection des donneurs

Face aux risques sévères de complications chez les receveurs, des critères de sélections stricts et relativement restrictifs ont été proposés pour limiter les risques de dysfonction des greffons [4], [31],[32],[33]. Les greffons peuvent provenir de deux types de donneurs pour les procédures de perfusion pulmonaire *Ex-Vivo*.

Donneurs en état de mort encéphalique à « critères élargis » (CE)

Il s'agit des donneurs pour lesquels un état de mort encéphalique est déclaré mais dont l'ensemble des caractéristiques d'acceptabilités pour les poumons, ne sont pas entièrement remplies. Si ces poumons ne sont pas acceptés pour des procédures de greffe standard, ils peuvent être acceptés en procédure de PPEV.

Parmi les critères de sélection, on trouve les antécédents du donneur comprenant l'âge inférieur à 55 ans, une intoxication tabagique inférieure à 20 paquets.années et l'absence d'antécédent de chirurgie cardio-pulmonaire.

Le rapport PaO_2/FiO_2 (Pression artérielle en oxygène/Fraction inspirée d'Oxygène), avec une pression positive de fin d'expiration (PEP) de 5 cm H₂O, est un des plus important car non subjectif. Il est mesuré chez le donneur juste avant d'envisager le prélèvement. Un greffon est acceptable lorsque le rapport PaO_2/FiO_2 est supérieur à 400 mm Hg et dit "limite" ou à « critère élargi » s'il est compris entre 200 et 400 mmHg (la valeur normale pour un sujet sain étant de l'ordre de 500 mmHg), en dessous de 200 mmHg, les poumons ne sont pas prélevés.

Enfin, d'autres critères sont plus subjectifs dont l'analyse de la radiographie pulmonaire, la notion de traumatisme thoracique ou une suspicion d'inhalation pulmonaire, de pneumopathie ou de sepsis. Une classification a été proposée par l'agence de biomédecine (Tableau 2).

Tableau 2 : Critères de sélection des greffons d'après l'ABM

Donneur optimal	Donneur à critères élargi	Donneur contre indiqué
Age <56 ans	Age : 56-69 ans	Age > 70 ans
$PaO_2/FiO_2 > 400$	$PaO_2/FiO_2 : 200-400$	$PaO_2/FiO_2 < 200$
Non fumeur	Radio pulmonaire anormale	
Radio pulmonaire normale	Inhalation	
Aucune inhalation		

Greffon provenant d'un donneur décédé après arrêt circulatoire de la catégorie 3 de la classification de Maastricht (DDAC-M3).

Il s'agit de « personnes pour lesquelles une décision de limitation ou d'arrêt programmé des thérapeutiques est prise en raison du pronostic des pathologies ayant amené la prise en charge en réanimation (catégorie III de Maastricht) ». Ces patients ne sont pas en état de mort encéphalique au moment de la décision de l'arrêt des soins. Le prélèvement et la mise en hypothermie des greffons a lieu peu de temps après l'arrêt cardio-circulatoire. Le prélèvement pulmonaire est autorisé depuis le 1er août 2014 en France chez ces patients (Agence de Biomédecine). Le tableau 3 reprend la classification de Maastricht 1995, révisée en 2013 (source ABM).

Tableau 3 : Classification internationale dite de Maastricht

Catégorie I	Arrêt circulatoire en dehors de tout contexte de prise en charge médicalisée, déclaration de décès à la prise en charge
Catégorie II	Arrêt circulatoire avec mise en œuvre d'un massage cardiaque et d'une ventilation mécanique efficaces mais sans récupération d'une activité circulatoire
Catégorie III	Décision de limitation ou d'arrêt programmé des thérapeutiques prise en raison du pronostic des pathologies ayant amené la prise en charge en réanimation
Catégorie IV	Personnes en mort encéphalique qui font un arrêt circulatoire irréversible au cours de la prise en charge en réanimation

Les greffons provenant de la catégorie III sont ceux pouvant entrer en procédure de PPEV

D- Développement de la Perfusion pulmonaire *Ex-Vivo* (PPEV)

La pénurie d'organes par rapport aux besoins de transplantation a conduit les équipes de transplantation à s'intéresser d'une part à l'utilisation de greffons dits à « critères élargis », c'est à dire initialement récusés pour une greffe, parce qu'ils ne remplissent pas entièrement les critères classiques d'acceptabilité, et d'autre part aux greffons provenant de donneurs décédés suite à l'arrêt des soins dans un établissement de santé (catégorie III de Maastricht (DDAC-M3)).

Quelques équipes internationales se sont lancées dans la transplantation de tels greffons depuis une quinzaine d'année, grâce aux techniques de perfusion pulmonaire ex vivo (PPEV) décrites plus

loin [35],[36],[37]. Les résultats cliniques de transplantations de greffons pulmonaires « limites » réhabilités sont très encourageants avec des résultats similaires à la transplantation de greffons remplissant tous les critères d'acceptabilité d'emblée (n'entrant pas dans le circuit d'optimisation)[38],[39],[40],[41],[42],[43].

Cependant, l'état fonctionnel de ces greffons pulmonaires "limites" doit être très précisément évalué avant de décider de les transplanter à des patients.

La possibilité de transplanter des greffons pulmonaires à « critères élargis » ou DDAC-M3, permet d'augmenter le nombre de greffons disponibles, accroître le nombre de bénéficiaires de la transplantation pulmonaire et donc de diminuer la mortalité sur liste d'attente.

L'apport des procédures de PPEV est également logistique, avec une réimplantation quasi programmée, certaines transplantations pulmonaires étant encore récusées pour des problèmes organisationnels. Les procédures de perfusion pulmonaires ex vivo de ces organes permettent d'envisager d'une part une nouvelle évaluation du greffon, et dans certaines circonstances la possibilité de conserver « ex vivo » l'organe isolé quelques heures, avant transplantation.

Les résultats sont bons notamment en termes de mortalité mais certains patients greffés présentent des complications graves et un des enjeux de la greffe pulmonaire et plus particulièrement des procédures de PPEV est de pouvoir anticiper au mieux ces complications.

Pouvoir réhabiliter et évaluer le greffon au mieux avant transplantation représente un enjeu crucial dans cette problématique de transplantation pulmonaire et d'augmentation des besoins du nombre de greffons.

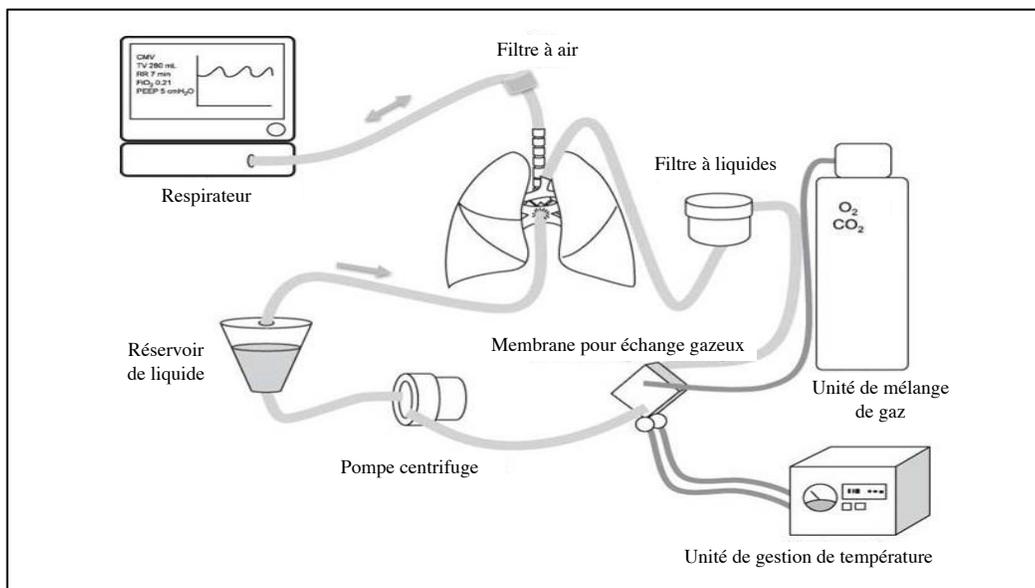
E- Description des procédures de PPEV

Parmi les techniques de « Perfusion pulmonaire ex vivo » (PPEV) utilisées, la technique décrite par l'équipe suédoise de Stieg Steen de l'université de Lund est celle ayant inspiré majoritairement l'équipe de l'hôpital Foch de Suresnes.

Après le prélèvement d'organes, les poumons subissent une première phase d'ischémie froide entre le prélèvement et le début de la reperfusion des greffons (correspondant au temps de transport entre le lieu de prélèvement et le lieu de PPEV). Globalement, les poumons sont perfusés, progressivement réchauffés puis reventilés et testés. Après cette phase de reperfusion, les poumons subissent une deuxième phase d'ischémie froide jusqu'à la transplantation chirurgicale.

Le principe général consiste à perfuser une solution dans les artères pulmonaires et ventiler les greffons pulmonaires en dehors de l'organisme, dans une enceinte permettant de maintenir la température, l'humidité et la stérilité de la préparation pulmonaire. L'appareil utilisé pour la PPEV est l'XPS™ (XVIVO Perfusion AB) constitué d'un respirateur d'anesthésie et un système équivalent à une machine de circulation extra corporelle (pompe et membrane de mélange de gaz). L'ensemble de ces éléments sont schématisés dans la Figure 1.

Figure 1 : Schéma des différents éléments d'un dispositif de perfusion pulmonaire ex vivo



Tous ces éléments sont incorporés à l'intérieur de l'XPS™

De façon plus détaillée, lorsqu'un greffon pulmonaire est classé dans la catégorie des greffons éligibles à la technique d'optimisation par PPEV, il est transporté dans des conditions similaires aux poumons initialement acceptés, à basse température (première ischémie froide) vers le centre transplantateur.

Le greffon va être préparé par l'équipe chirurgicale. Deux manchettes vont être suturées au greffon permettant le raccord au système de perfusion. Une manchette est suturée sur l'artère pulmonaire, la deuxième au niveau de l'oreillette gauche. Le poumon va également être intubé grâce à une sonde d'intubation intra-trachéale.

Le greffon va ensuite être perfusé et progressivement réchauffé durant environ 45 minutes. Durant cette période, la perfusion du poumon commence à faibles débits qui sont progressivement augmentés (grâce à une pompe centrifuge) jusqu'à un débit cible de 40% de celui du donneur. Il est à noter que le circuit de perfusion étant clos, l'équipe chirurgicale peut faire varier la pression présente au niveau de l'oreillette gauche grâce à la hauteur variable du réservoir du liquide de perfusion. Le liquide de perfusion est oxygéné grâce à une membrane permettant d'apporter l'oxygène nécessaire au greffon. Du dioxyde de carbone (CO₂) est également ajouté à la solution afin de respecter des conditions physiologiques de PaCO₂ et de pH.

Le liquide de perfusion utilisé est le liquide de SteenTM acellulaire qui contient de l'albumine, du dextran et une solution pauvre en potassium (XVIVO Perfusion AB, Box 53015 SE-400 14 Göteborg, Suède).

Lorsque la température atteint 32°C, les greffons sont reventilés à l'aide du respirateur inclus dans le dispositif XPSTM, apportant l'oxygène nécessaire au greffon par voie aérienne via la canule d'intubation. L'apport d'oxygène (O₂) dans le liquide de perfusion est coupé, l'apport de CO₂ est inchangé.

Une toilette bronchique est également réalisée lors d'une bronchoscopie.

Lors du début de la ventilation, le poumon est ventilé sans pression positive de fin d'expiration (PEP) qui est progressivement augmentée jusqu'à 5 cm H₂O. Une augmentation brève de la PEP à 10 cm H₂O est réalisée quelques minutes après le début de la ventilation permettant une « ouverture » des poumons puis la PEP est redescendue à 5 cm H₂O. La FiO₂ est réglée à 21% tout

au long de cette première phase de ventilation. La fréquence respiratoire est réglée entre 7 et 10 cycles par minute et est maintenue tout au long de la procédure de PPEV.

Au bout d'environ 30 minutes, la FiO_2 est augmentée à 100% et la PEP est réglée à 10 cm H_2O . Au bout de 10 minutes la PEP est redescendue à 5 cm H_2O alors que la FiO_2 est maintenue encore environ 20 minutes à 100%. Cette phase de 30 minutes est appelée phase de « recrutement » en rapport avec l'ouverture alvéolaire (due à l'augmentation de la PEP).

Au décours de cette phase de recrutement, s'ensuit une phase d'environ 30 minutes. La FiO_2 est redescendue à 21% pour l'ensemble de cette phase (la PEP maintenue à 5 cm H_2O).

Au terme de cette première phase « inter-recrutement », une deuxième phase de « recrutement » a lieu, identique à la première, d'environ 30 minutes et ainsi de suite jusqu'à la fin de la procédure.

Les poumons peuvent être optimisés en PPEV entre 2 et 8 heures.

Les poumons sont évalués tout au long de la procédure et de façon plus précise toutes les heures en fin de phase de recrutement avant d'envisager leur transplantation. Plus spécifiquement lors de l'évaluation du greffon en PPEV, la décision d'acceptation du poumon en vue d'une greffe est actuellement basée sur quelques critères simples.

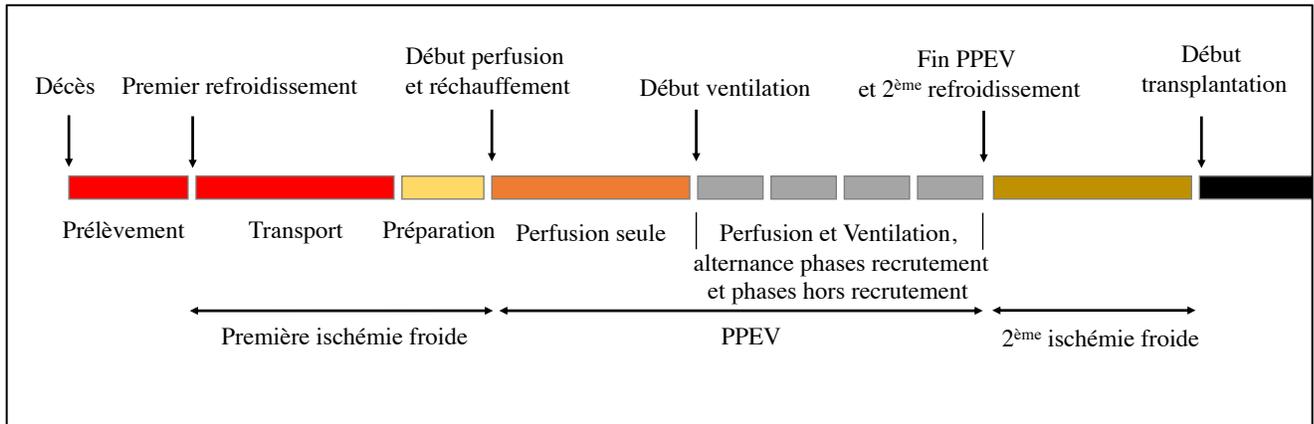
L'un des principaux critères d'acceptation est la bonne capacité d'échanges gazeux du greffon^{[35],[46],[47],[48]} représentée par le rapport PO_2/FiO_2 évalué lors des gaz du sang en fin de phase de recrutement. Les autres critères évalués sont les résistances vasculaires pulmonaires, les pressions de pointe des voies aériennes, les pressions de plateau des voies aériennes, la fuite de liquide de perfusion (le liquide n'étant plus dans le circuit de perfusion se retrouve dans les poumons, correspondant à de l'œdème pulmonaire)^[49], l'aspect macroscopique des poumons ainsi que l'aspect en bronchoscopie. Certains utilisent également des radiographies du greffon.

Ces critères sont relativement variables d'une équipe à l'autre^{[44][45]}. Le tableau 4 résume les critères d'évaluation habituels.

Le choix d'acceptation du greffon revient à l'équipe de transplantation pulmonaire.

S'il répond aux critères de transplantation, le greffon peut être conservé perfusé et ventilé puis être à nouveau refroidi en attendant l'opération chirurgicale (seconde ischémie froide). La Figure 2 reprend le déroulement général d'une procédure d'optimisation du prélèvement d'organe à la transplantation. Les Figures 3 et 4 sont des photographies illustrant différentes phases des procédures de PPEV.

Figure 2 : Déroulement général d'une procédure d'optimisation



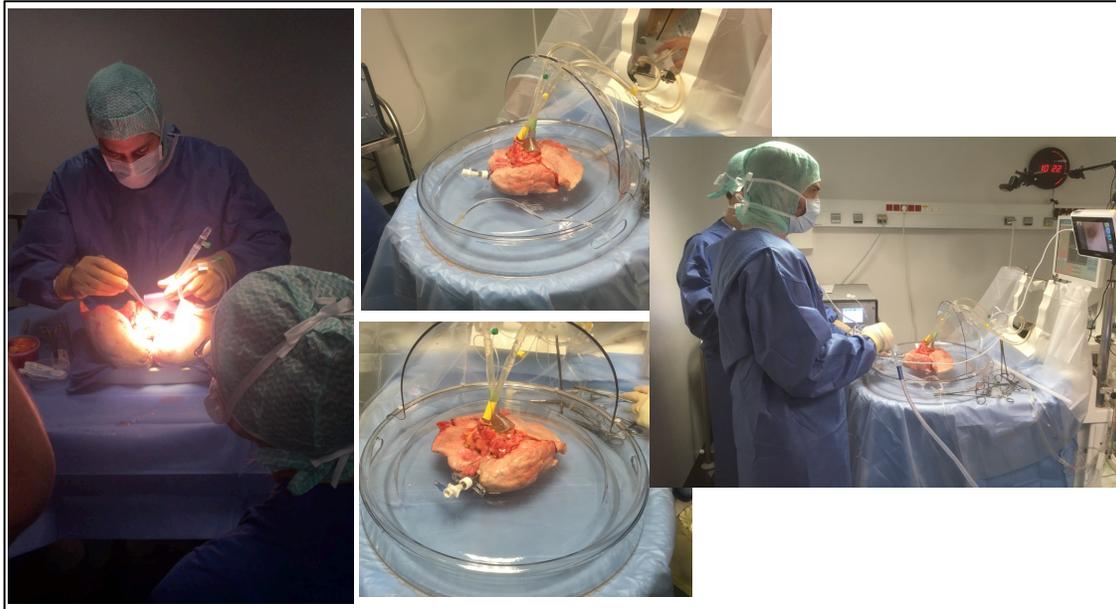
Après le prélèvement, les poumons subissent une première phase d'ischémie froide correspondant au transport et à la préparation des greffons. Lors des procédures de PPEV les poumons sont d'abord uniquement perfusés puis la ventilation commence avec une alternance de phases de recrutements et de phases inter-recrutements. Après la procédure de PPEV les poumons subissent une deuxième phase d'ischémie froide en attendant la transplantation.

Tableau 4 : Principaux critères de jugements utilisés en routine par les équipes transplantation

Critères d'acceptation
PaO ₂ /FiO ₂ ≥ 400 mmHg en fin de procédure
Résistances vasculaires stables ou décroissantes
Pressions pulmonaires stables ou décroissantes
Amélioration ou stabilité des compliances pulmonaires
Critères d'exclusion
PaO ₂ /FiO ₂ < 400 mmHg en fin de procédure
Augmentation >15% des résistances vasculaires
Augmentation >15% des pressions pulmonaires
Détérioration >15% des compliances pulmonaires
Autres paramètres fréquemment utilisés
Fuite de liquide de perfusion
Radiographies thoraciques
Aspect macroscopique et en bronchoscopie

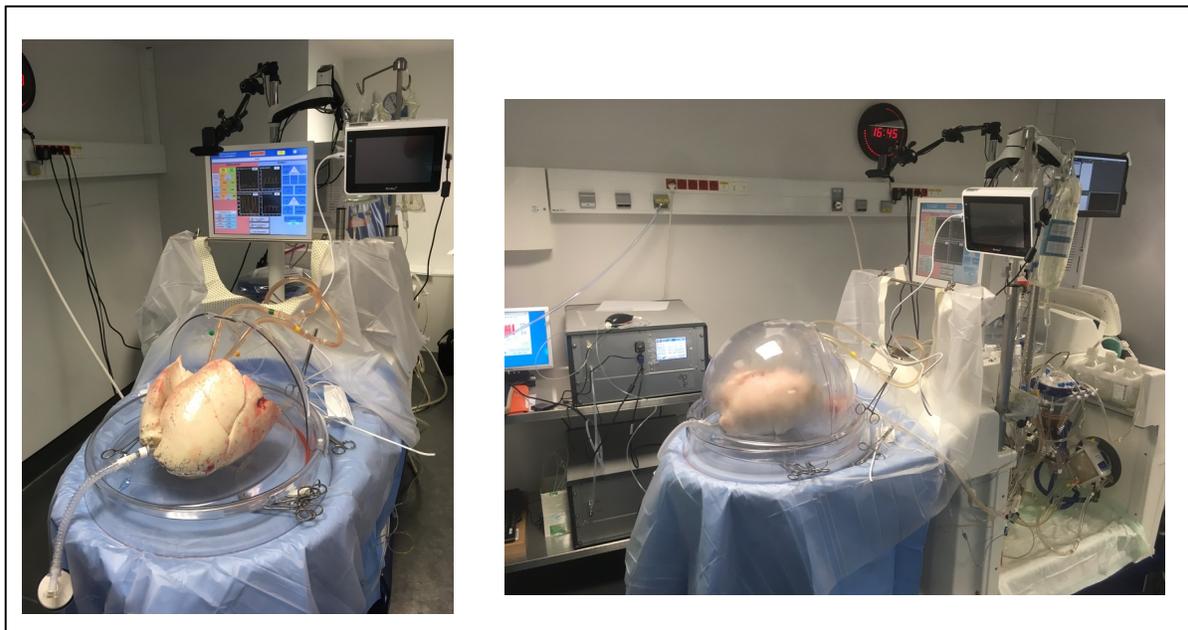
Tableau réalisé d'après la publication de Van Raemdonck et al.^[45]
Ces critères varient légèrement d'une équipe à l'autre.

Figure 3 : Photographies au début d'une procédure de PPEV



Poumons en cours de préparation (canulations) à gauche, poumons en cours de réchauffement perfusés mais non ventilés au centre, toilette bronchique par bronchoscopie à droite

Figure 4 : Photographies de poumons en cours de ventilation lors d'une procédure de PPEV



*Cloche temporairement enlevée à gauche, les poumons sont ventilés, ici en fin d'inspiration.
Visualisation de l'ensemble de la machine de PPEV XPS[™] à droite, ProCEAS[®] en cours de mesure en arrière-plan*

Recherche de marqueurs prédictifs non invasifs spécifiques de l'état fonctionnel des poumons et de l'évolution des poumons post greffe

Un des enjeux majeurs de la PPEV est de permettre d'envisager une évaluation *ex-vivo* (visuelle, physiologique et biologique) précise et objective de l'état fonctionnel des greffons avant de prendre la décision de les transplanter aux patients receveurs.

Les pistes de recherche s'attachent actuellement à trouver d'autres marqueurs de l'état fonctionnel du greffon pulmonaire et plus spécifiquement de la sévérité de lésions d'ischémie-reperfusion.

Dans ce contexte, la recherche et l'identification de marqueurs non invasifs prédictifs de l'état fonctionnel du poumon et du devenir du patient transplanté sont essentielles.

La description de nouveaux facteurs prédictifs de risque de complications pour des greffons acceptés pour la transplantation permettrait de proposer une surveillance accrue à certains patients, voire de leur proposer des thérapeutiques ciblées.

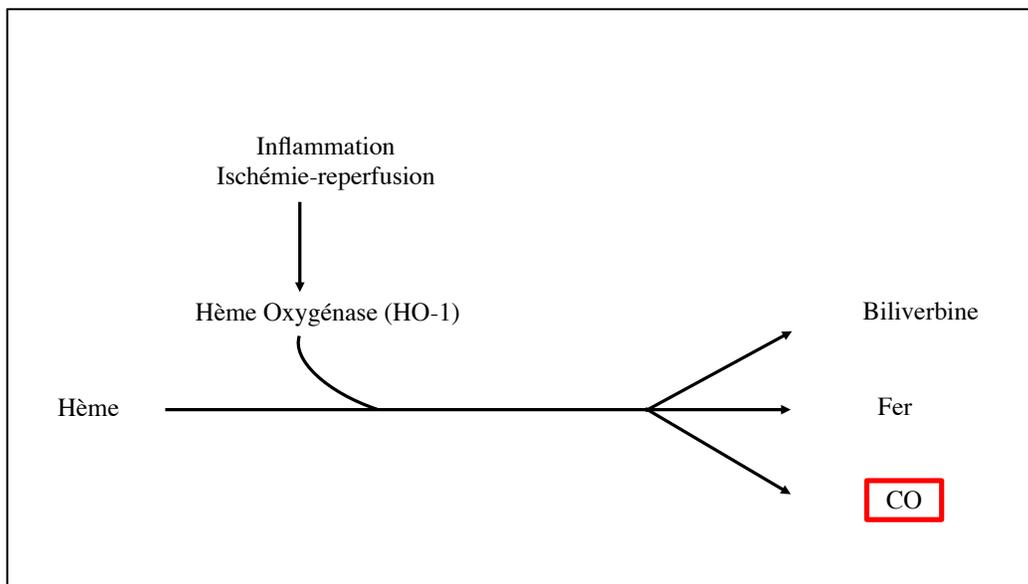
2 - Le monoxyde de carbone expiré comme marqueur physiologique de l'inflammation pulmonaire

Le taux de monoxyde de carbone (CO) contenu dans l'organisme, n'est pas uniquement dépendant de la quantité contenue dans les gaz inhalés provenant notamment de combustions incomplètes.

Le CO est également produit par l'organisme en faible quantité (de l'ordre du "parties par million" (ppm)). Sa production endogène provient de la dégradation de l'hème en biliverbine, fer et CO. Cette réaction est catalysée par les enzymes de la famille des hème-oxygénases (HO).

Deux formes d'hème oxygénase existent, une forme dont la concentration varie peu (HO-2) et une forme dont l'expression et la concentration varient selon différents facteurs (HO-1). L'expression génétique de la forme inducible d'hème-oxygénase-1 (HO-1) est augmentée dans certaines circonstances comme l'hypoxie, les états inflammatoires^{[50],[51],[52]} et plus spécifiquement dans les contextes d'ischémie-reperfusion^[53] (Figure 5). Cette augmentation de transcription au niveau génétique entraîne une augmentation de la concentration tissulaire de la protéine HO-1.

Figure 5 : Dégradation de l'hème par l'hème-oxygénase et production de CO



*Le monoxyde de Carbone est produit suite à la dégradation de l'Hème
La réaction est catalysée par l'Hème-oxygénase dont la concentration dépend des conditions
d'inflammations tissulaires*

L'hème est une protéine présente dans la quasi-totalité des tissus de l'organisme. Elle est principalement retrouvée au niveau de la rate, des testicules, et en plus faible concentration dans le foie, les poumons et les reins^[54].

Au niveau pulmonaire, la production de l'hème oxygénase se situe au niveau des cellules endothéliales et épithéliales^{[55],[56]}. En situation de stress, les macrophages présents au niveau pulmonaires produisent également en grande quantité HO-1^[57]

Sous l'influence de protéines inflammatoires la transcription de l'hème oxygénase augmente augmentant donc sa concentration tissulaire. Il en résulte une augmentation de la dégradation de l'hème conduisant in fine à une augmentation de production de monoxyde de carbone^[50].

Le CO produit active alors différentes chaînes de signalisation dont celles des MAPKinases et du GMP cyclique, entraînant une vasodilatation, des effets anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et anti-prolifératifs^{[58],[59],[60]}. Le CO fait partie de la famille des gazotransmetteurs^[61].

Le CO joue un rôle important dans le contexte particulier des lésions pulmonaires d'ischémie-reperfusion. L'inhibition expérimentale de l'activité de l'hème-oxygénase et de la production de CO augmente les lésions capillaires et alvéolaires ainsi que la quantité d'œdème pulmonaire^[62].

A l'inverse, l'inhalation de CO exogène (ou encore la stimulation de production de CO endogène) réduit l'apoptose et la production de médiateurs de l'inflammation^{[64],[63]}.

Ses propriétés anti-inflammatoires en font par ailleurs un agent thérapeutique potentiel pour limiter les lésions d'ischémie-reperfusion pulmonaire^{[50],[64]}. L'apport de CO exogène pourrait ainsi réduire l'œdème pulmonaire post ischémie-reperfusion^[65].

Ces données sous-tendent la logique que le CO n'est pas qu'un marqueur de l'inflammation mais qu'il a probablement également un rôle anti-inflammatoire (notamment en interagissant avec la voie des MAP kinases)^{[66],[67]}.

Dans le cadre diagnostique, le CO endogène, mesuré dans l'air exhalé a également été étudié comme un marqueur de l'inflammation et des lésions d'ischémie-reperfusion^[58].

Chez l'homme, le CO exhalé mesuré après transplantation pulmonaire, montre une corrélation avec la concentration en neutrophiles dans le lavage broncho-alvéolaire. Le CO exhalé est également élevé chez les sujets présentant des signes de bronchiolite oblitérante et pourrait donc avoir un intérêt dans la surveillance post-greffe^[69].

La présence ubiquitaire de l'hème-oxygénase dans l'organisme explique que la production de CO et son excrétion au niveau pulmonaire peuvent être augmentées dans de multiples situations peu spécifiques à l'inflammation pulmonaire^{[50],[70],[71]}, le CO n'étant éliminé que par voie exhalée. En revanche, dans un modèle de poumons isolés, les variations du CO exhalé ne sont pas influencées par d'autres organes permettant donc une évaluation fine de la production de CO par le poumon.

La préparation pulmonaire en PPEV est adaptée à cette approche analytique.

Ainsi le monitoring continu du COe pourrait aider à l'évaluation *ex-vivo* de l'état inflammatoire du poumon et notamment des lésions d'ischémie-reperfusion.

Cependant, pour être pertinentes et utilisables, de telles mesures de CO doivent être précises, facilement réalisables, fiables et mesurables en temps réel. Elles doivent pouvoir être réalisées de façon non invasive pour ne pas altérer le greffon pulmonaire que l'on envisage de transplanter à un patient.

Des études préliminaires ont été réalisées sur modèle porcin en PPEV.

Un analyseur de CO utilisant la technologie OF-CEAS a été utilisé, branché en dérivation sur le respirateur.

Une première étude a permis de montrer que le tissu pulmonaire était bien la source du CO mesuré^[72].

Une autre étude a permis de montrer une corrélation entre les valeurs de CO exhalées mesurées et la sévérité des lésions d'ischémie-reperfusion infligées à des poumons^[73]. Succinctement, pour un même donneur porcin, les deux poumons étaient prélevés sous anesthésie générale. Le premier poumon était reperfusé le même jour par méthode de PPEV après une heure d'ischémie froide. Le

poumon controlatéral (prélevé au même moment) était conservé à 4°C jusqu'au lendemain. La procédure d'évaluation en PPEV était alors réalisée après 24h d'ischémie froide.

L'impact des deux durées d'ischémie froide (après 1h ou après 24h) était comparé pour un ensemble de paramètres inflammatoires, chaque animal étant son propre témoin (paires de poumons appariées).

Les résultats ont permis de conclure que les poumons ayant subi 24h d'ischémie froide présentaient plus de lésions inflammatoires et exhalaient significativement plus de CO au cours de la procédure de PPEV que leurs homologues exposés uniquement à 1h d'ischémie.

3 - Technique OF-CEAS (Optical Feedback - Cavity Enhanced Absorption Spectroscopy) pour la mesure du monoxyde de carbone exhalé

A- Description du mode de fonctionnement

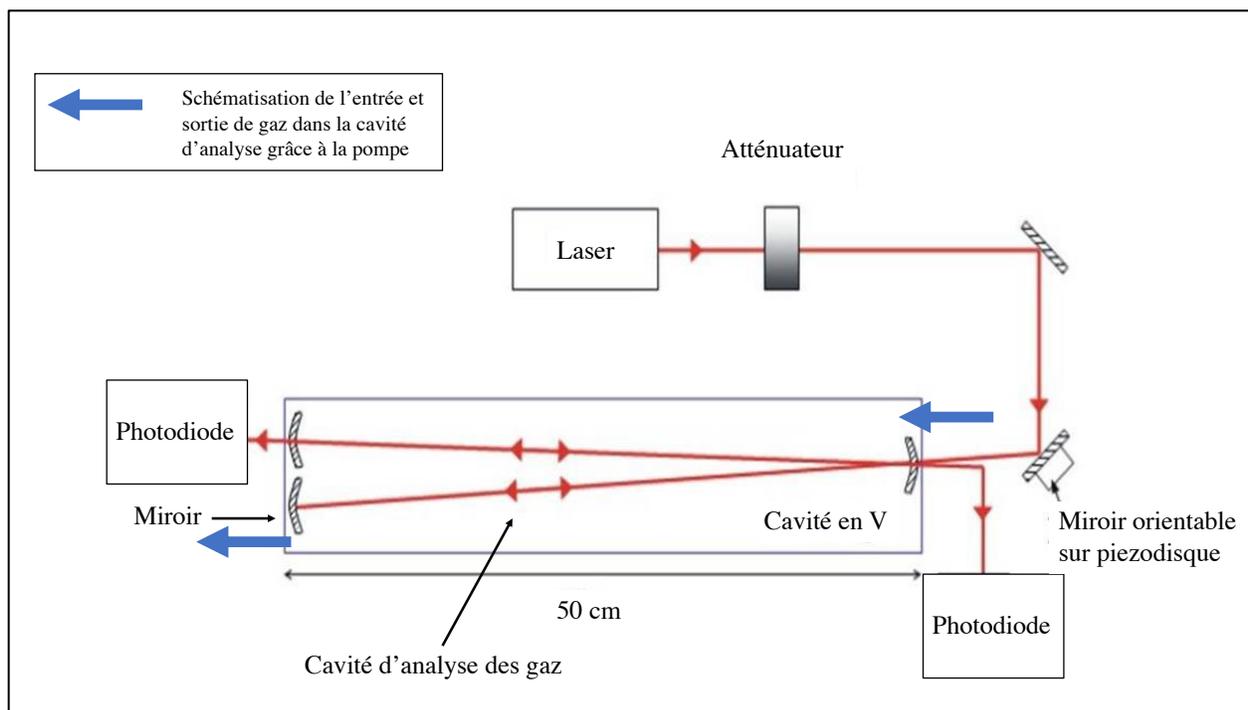
L' Optical Feedback - Cavity Enhanced Absorption Spectroscopy (OF-CEAS) est une technique de spectroscopie laser mise au point par le laboratoire de spectrométrie physique de l'université Grenoble-Alpes^[74] (*LIPhy UMR CNRS 5588, D. Romanini ; I. Ventrillard*). Comme les autres méthodes de spectroscopie, l'OF-CEAS est basée sur la mesure d'absorption d'un laser par un gaz dans une cavité optique. La quantification précise de très petites concentrations de gaz, (moins de 1 ppm de CO dans l'air expiré) requiert une très grande longueur d'absorption. L'OF-CEAS est constitué d'une "cavité optique résonnante", faite de miroirs extrêmement réfléchissants (99,99% de lumière réfléchi) installés face à face et qui emprisonnent la lumière dans la cavité optique. Grâce aux réflexions multiples du faisceau laser, la longueur d'absorption peut atteindre plusieurs kilomètres pour une cavité de seulement 1 mètre de long. Pour une longueur réelle L de la cavité optique, la longueur d'absorption potentielle, due aux systèmes de miroirs, est augmentée d'un facteur $2F/\pi$ où F est la finesse de la cavité définie par : $F = \pi \sqrt{R}/(1-R)$ pour une cavité à deux miroirs; R étant le coefficient de réflectivité des miroirs (plus les miroirs sont réfléchissants, meilleure est la finesse de la cavité optique et plus longue est la longueur d'absorption totale autorisée par le système).

Pour l'OF-CEAS, avec une longueur de la cavité optique $L = 1$ m et une finesse de la cavité optique $F = 30000$, la longueur d'absorption autorisée est donc d'environ 19 km.

L'originalité de la technique repose sur l'utilisation d'une disposition particulière des miroirs. La configuration en V fait qu'une partie de la lumière réfléchi par la cavité est renvoyée vers la source du laser pour modifier l'émission spectrale de celui-ci et ainsi optimiser la détection de l'intensité transmise par la cavité optique (Figure 6).

La mesure de la durée de vie des photons dans la cavité (ring-down) permet une auto-calibration de l'instrument (effectué à chaque mesure, toutes les 200 ms). Cette technique OF-CEAS a été utilisée pour développer le ProCEAS®.

Figure 6 : Schéma du fonctionnement du spectromètre laser OF-CEAS



Le gaz à analyser entre dans la cavité en « V » via un système de pompe assurant un débit continu (schématisé par la flèche bleue)

Les valeurs de CO sont données en ppm (parties par million). $x_i = \frac{N_i}{N_{Tot}}$ en ppm, ppb (partie par milliard), etc.

Il s'agit de la fraction molaire d'un gaz qui est le rapport du nombre de molécules par unité de volume d'un composé (N_i) sur le nombre total de molécules par unité de volume (N_t). Elle est donc indépendante du volume considéré. L'intérêt principal de cette unité étant que le ppm ne dépend ni de la pression du gaz, ni de sa masse molaire.

B- Avantages de l'OF-CEAS

La technique OF-CEAS présente plusieurs avantages :

- L'analyseur ProCEAS[®] est simple d'utilisation. Son fonctionnement est facilement assimilable.
- Les mesures peuvent être **réalisées sur place** sans nécessité de transfert d'échantillon en laboratoire ce qui permet de réduire les risques de perte d'information et les délais d'analyse contrairement à d'autres appareils de mesure de gaz basés sur la spectrométrie de masse ou la chromatographie.
- Elle fournit des mesures de concentration de gaz, non pas relatives, mais absolues, directes et quasi **en temps réel**^[75] (environ **5 mesures par seconde**), ce qui permet d'avoir plusieurs mesures lors de chaque cycle respiratoire.
- Les valeurs de mesure données par l'appareil sont directement exploitables sans nécessité de retraitement de données en laboratoire.
- L'OF-CEAS délivre des mesures auto-calibrées avec une correction autonome des éventuelles dérives (liées par exemple à une dégradation des miroirs) grâce à la mesure du ring-down. **Aucun étalonnage** avec des gaz certifiés n'est requis.
- Cette technique permet des mesures de CO de l'ordre du Ppb (partie par billion) soit environ mille fois plus petites que l'ordre de grandeur de production endogène de CO, et est parmi les mesures de gaz **les plus précises au monde**. Pour exemple, la mesure est plus de mille fois plus précise qu'avec des appareils électrochimiques de dépistage médical du tabagisme.
- L'analyseur ProCeas[®] nécessite un débit d'aspiration d'environ 160 mL/min pour l'analyse du CO. Ce débit suffisant et nécessaire a été calculé dans le but de ne pas perturber la ventilation du greffon pulmonaire. Ce débit est comparable au niveau de fuites d'un respirateur.

Objectifs

Nous avons voulu premièrement valider **la faisabilité de monitorer le CO endogène dans l'air exhalé** (COe) des greffons pulmonaires humains au cours d'optimisations par perfusion pulmonaire ex vivo avant transplantation, avec l'analyseur ProCeas® Médical.

L'objectif principal était **d'évaluer l'intérêt du monitoring du COe** pour l'évaluation des greffons per PPEV.

Le critère de jugement principal était l'acceptation des greffons en fonction de leur taux de COe.

Nous avons également recherché un lien entre **le taux moyen de COe** et l'état fonctionnel et inflammatoire des poumons. Nous nous sommes basés en premier lieu sur les données disponibles provenant des **donneurs**. Nous avons ensuite comparé le taux de COe aux autres **paramètres habituellement testés** en routine sur des périodes de 5 minutes lors de certaines phases clés des procédures de PPEV. Nous avons évalué **la variation** du COe dans le temps au cours des différentes étapes des procédures.

Nous avons également comparé le taux moyen de COe à des **marqueurs d'inflammation biologiques** mesurés dans du liquide de perfusion prélevé lors des procédures d'optimisation.

Enfin nous avons comparé les taux de COe durant la procédure de PPEV à **l'évolution des patients greffés au bloc opératoire puis en post opératoire immédiat**.

Méthode

1- Phase de travail préparatoire en amont des mesures sur greffons

A- Développement du ProCEAS[®] Médical

Pour cette étude, nous avons travaillé avec l'industriel AP2E (Aix en Provence). Nous avons mis au point un prototype d'analyseur à partir de l'analyseur ProCeas[®] de détection de CO (commercial), compatible avec une utilisation clinique : le ProCeas[®] Médical. Les modifications apportées au prototype d'analyseur ProCeas[®] Médical avaient pour but de rendre possible et sûre son utilisation dans un environnement de bloc opératoire. Nous avons simplifié au maximum l'aspect extérieur du ProCeas[®] afin d'assurer la sécurité de l'utilisateur, de faciliter les procédures de désinfection externe de l'analyseur, d'assurer son étanchéité (Photographie en Figure 7) et de rendre son utilisation fonctionnelle au sein d'un environnement de bloc opératoire. Notre équipe a interagit à de nombreuses reprises avec AP2E et nous nous sommes formés à son utilisation.

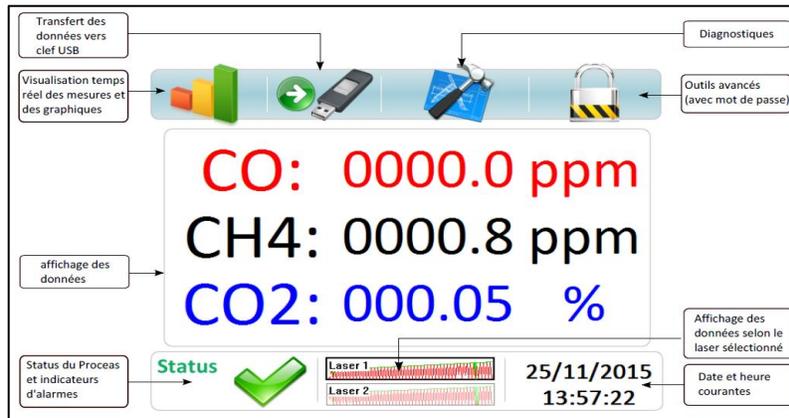
Figure 7 : ProCeas[®] Médical sur son chariot roulant



*En haut, le module de mesure,
En bas le module de pompe pour faire rentrer l'air à analyser dans le module de mesure.*

Comme les autres ProCEAS[®], le ProCEAS[®] Médical réalise des mesures de manière automatique et autonome dans les conditions normales de fonctionnement. Les mesures sont affichées en temps réel sur l'appareil (Figure 8) et stockées sur une mémoire interne permettant une analyse ultérieure.

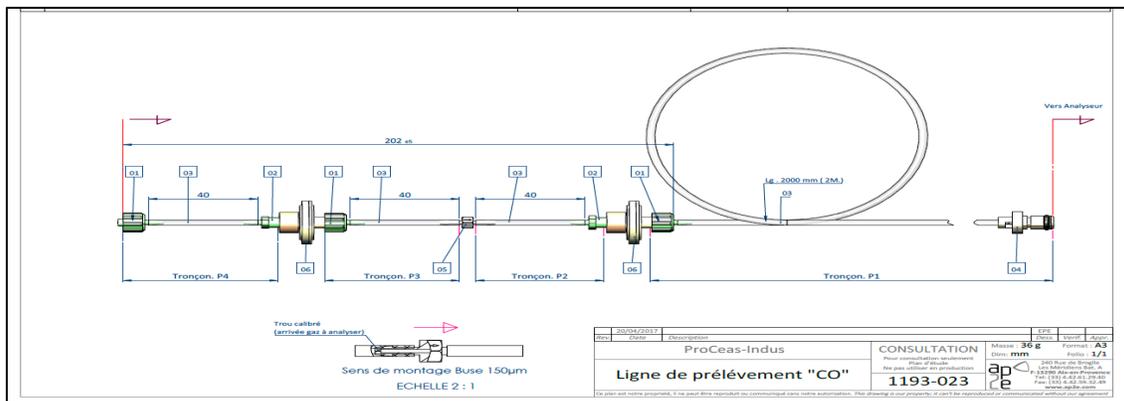
Figure 8 : Description de l'Écran principal du ProCEAS[®] Médical



*Les variations de COe sont lisibles en temps réel sur l'écran du ProCEAS[®]
Toutes ces données étaient cachées au chirurgien au cours de l'étude.*

En partenariat avec AP2E, nous avons également conçu une ligne de prélèvement des gaz qui soit stérile et facilement changeable. Les raccords, filtres, connecteurs, tubulures étaient marqués CE et à usage unique, les buses soniques n'étaient pas à usage unique et étaient remplacées en cas de souillure (Figure 9).

Figure 9 : Ligne de prélèvement reliant l'analyseur ProCEAS[®] Médical au système de perfusion XPSTM



Toutes les lignes de prélèvement étaient préparées en avance et stockées à proximité du ProCEAS[®].

B- Analyse de Risque du ProCEAS[®] médical

Le ProCEAS[®] Médical n'étant pas marqué « CE médical », nous avons dû réaliser une analyse de risque. Nous nous sommes fait accompagner par le CIC-IT de Grenoble.

Cette analyse de risque a été déléguée à la société SQI (Surgiqua Institute ; <http://www.surgiqua-institute.com/> ; Meylan, France), spécialisée dans la réalisation de dossiers réglementaires en vue de marquage « CE médical ».

Après plusieurs modifications apportées au dispositif, les conclusions ont été favorables pour l'utilisation du ProCEAS[®] Médical en bloc opératoire (Cf. Annexe 2).

C- Validation de l'utilisation du ProCEAS[®] sur volontaires sains en bloc opératoire

Pour valider l'utilisation du ProCEAS[®] Médical, nous avons réalisé une première étude sur volontaires sains.

L'objectif principal était d'évaluer la réponse du ProCEAS[®] et valider l'analyse du souffle expiratoire.

Nous avons mesuré les concentrations de monoxyde de carbone expiré, répétées chez un même individu et testé l'influence de la quantité d'oxygène inspirée sur le taux de CO expiré. Cette partie du travail avait également pour but d'évaluer le ProCEAS[®] en milieu de bloc opératoire en présence d'un respirateur d'anesthésie.

Cette étude a été menée dans le cadre de la plateforme « volontaires sains » de l'équipe PRETA du laboratoire TIMC-IMAG (Grenoble). Un protocole générique nommé « ValApPhI » (Validation of Study in Respiratory Physiology and its Interactions) autorisé par le Comité de Protection des Personnes Sud Est, a été déposé dans Clinical Trial sous le n° NCT 01881945.

Les sujets respiraient librement dans le circuit d'une station d'anesthésie via un masque étanche, réglée en mode "ventilation spontanée" sans PEP dans un bloc opératoire du CHU de Grenoble. La ligne de prélèvement connectée à l'appareil ProCEAS[®] permettait également de prélever des échantillons de gaz pour réaliser des mesures discontinues avec un appareil classique par technique électrochimique (Micro CO[®]).

Les sujets respiraient d'abord l'air ambiant puis un mélange d'air et d'O₂ médicaux dont la FiO₂ était progressivement augmentée de 21% à 100% avant de revenir à la FiO₂ initiale de 21%.

Nous avons comparé les valeurs obtenues avec l'appareil classique de mesure de CO (électrochimique).

Nous avons réalisé cent quarante-huit mesures chez trente volontaires (dont onze fumeurs) avec les deux appareils de mesure. Les mesures ont pu être réalisées et analysées.

Tous patients confondus, la concentration de CO expiré était de 4.98 ± 1.06 ppm quand le sujet respirait en air ambiant ; 5.20 ± 1.08 ppm avec un mélange de gaz médicaux à 21% de FiO_2 . La teneur en CO exhalé montait à $20.51 \pm 4,08$ ppm sous 100% de FiO_2 puis redescendait à $5.50 \pm 1,14$ ppm lors du retour à 21% de FiO_2 .

Chez un même sujet, la teneur en CO exhalé sous basse FiO_2 (air ambiant ou 21% d'air médical) était multipliée en moyenne par 4 sous 100% de FiO_2 . Cette augmentation relative (intra-individuelle) de CO expiré variait dans les mêmes proportions chez tous les sujets indépendamment de leur statut de fumeur ou de non-fumeur.

La mesure du CO expiré par spectrométrie laser OF CEAS, a montré une meilleure reproductibilité et une plus grande fiabilité en comparaison à la mesure du COe avec l'appareil classique par électrochimie.

L'augmentation du taux de COe était plus élevée que celle retrouvée dans d'autres études.

Nous avons conclu que ce plus grand taux de COe était peut-être dû au caractère « volontaires sains » et non malade des sujets et par une meilleure mesure du COe par le ProCEAS®.

Cette partie du travail nous a également permis des ajustements et une familiarisation avec l'appareil.

Pour plus d'information sur cette partie préliminaire du travail, se reporter à l'article publié en Aout 2019 dans Scientific Report (SIGAPS B) en annexe 1.

2- Étude sur greffons pulmonaires humains

A- Financement du développement du ProCEAS[®] médical : ANR BreathDiag

L'étude BreathDiag s'inscrit dans le cadre du projet ANR BreathDiag (2015- 2019, ANR-15-CE18-0006-01), consortium de 4 partenaires :

- Le laboratoire TIMC-IMAG (Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité - Informatique, Mathématiques et Applications, Grenoble) équipe PRETA (Physiologie cardio-Respiratoire Expérimentale Théorique et Appliquée) de Grenoble, spécialisé dans la physiologie respiratoire.
- Le laboratoire LIPhy (Laboratoire Interdisciplinaire de Physique) de Grenoble spécialisé notamment dans le domaine de la spectroscopie haute résolution et haute sensibilité.
- Le CIC-IT (Centre d'Investigation Clinique – Innovation Technologique) de Grenoble spécialisé dans l'accompagnement et le développement d'innovations technologiques en rapport avec le domaine médical.
- L'industriel AP2E basé à Aix en Provence spécialisé dans le développement d'appareil de spectroscopie, commercialisant notamment le ProCEAS[®].

Ce projet innovant de recherche translationnelle visait d'une part à développer dans le contexte de la transplantation pulmonaire, un appareil d'analyse de l'air expiré, basé sur une technique de spectroscopie laser de pointe, utilisable dans un contexte médical, et prévoyait d'autre part sa première utilisation en milieu médical.

B- Rapprochement avec l'équipe chirurgicale de l'hôpital Foch de Suresnes

La greffe pulmonaire s'étant temporairement, mais pour une durée indéterminée, arrêtée sur Grenoble au cours de l'année 2018, nous nous sommes rapprochés de l'équipe chirurgicale du Pr Sage de l'hôpital Foch à Suresnes en région parisienne.

L'hôpital Foch est un des centres français ayant le plus d'expérience dans le domaine des greffes pulmonaires. La technique de requalification en PPEV y est maîtrisée et appliquée en clinique depuis 2011, cette technique est maintenant utilisée en routine.

C- Aspects éthiques

Concernant la catégorisation de l'étude, nous avons sollicité l'ANSM sur la typologie de l'étude. Notre étude a été qualifiée d'étude « hors recherche impliquant la personne humaine ». Après l'analyse de risque du ProCEAS[®] nous n'avons donc pas eu besoin de faire appel à un comité d'éthique.

Par ailleurs, les patients en attente de greffe à l'hôpital Foch, après information et signature d'un consentement écrit, sont inclus dans un protocole de recherche générique permettant le recueil et l'utilisation de données médicales, de prélèvements biologiques et génétiques. Nous avons donc pu analyser a posteriori les données classiquement recueillies en post opératoire immédiat des patients transplantés.

Nous avons écrit un protocole complet descriptif de l'étude, un mode opératoire pour l'utilisation du ProCEAS[®], ainsi qu'un cahier d'observation pour le recueil des données lors des procédures de requalification.

Pour l'écriture et la validation de ces documents, nous avons été accompagnés par le CIC-IT de Grenoble.

Ce protocole a été validé par la DRCI du CHU Grenoble-Alpes et approuvé par la DRCI de l'hôpital Foch.

D- Type d'étude

Il s'agissait d'une étude de faisabilité, prospective observationnelle monocentrique.

E- Critères d'inclusion

Pour cette étude de faisabilité nous avons inclus tous les greffons pulmonaires acceptés pour une procédure de requalification en PPEV par l'équipe chirurgicale de l'hôpital Foch, que le greffon pulmonaire soit transplanté ou non sur toute la durée de l'étude.

3- Méthodologie de l'étude

Réalisation des mesures

A- Installation et mesures préparatoires au bloc opératoire

Le ProCEAS[®] médical, a été installé dans la salle dédiée aux procédures de PPEV, dans le bloc opératoire de l'hôpital Foch.

Nous avons vérifié l'absence de CO dans les gaz médicaux utilisés lors des procédures d'optimisation.

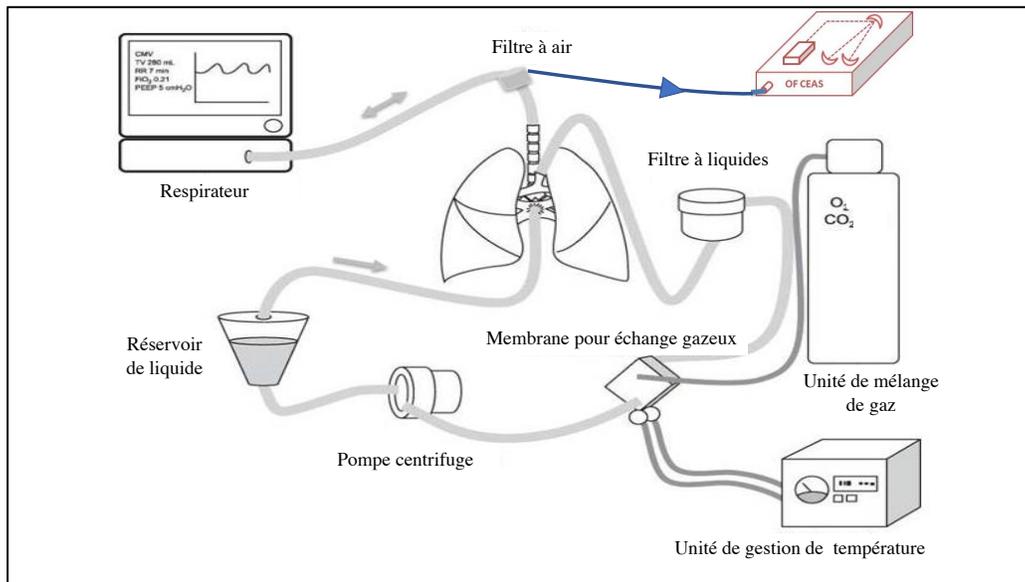
Nous avons également vérifié que les variations des mesures de CO étaient bien mesurées en temps réel en testant le temps de réponse du ProCEAS[®] en faisant varier les gaz analysés.

B- Branchement du ProCEAS[®]

Le ProCEAS[®] était branché en dérivation sur le système ventilatoire de l'XPS[™]. Le branchement se faisait au niveau du filtre du respirateur juste en amont de la canule d'intubation trachéale du côté du respirateur (Figure 10 et 11).

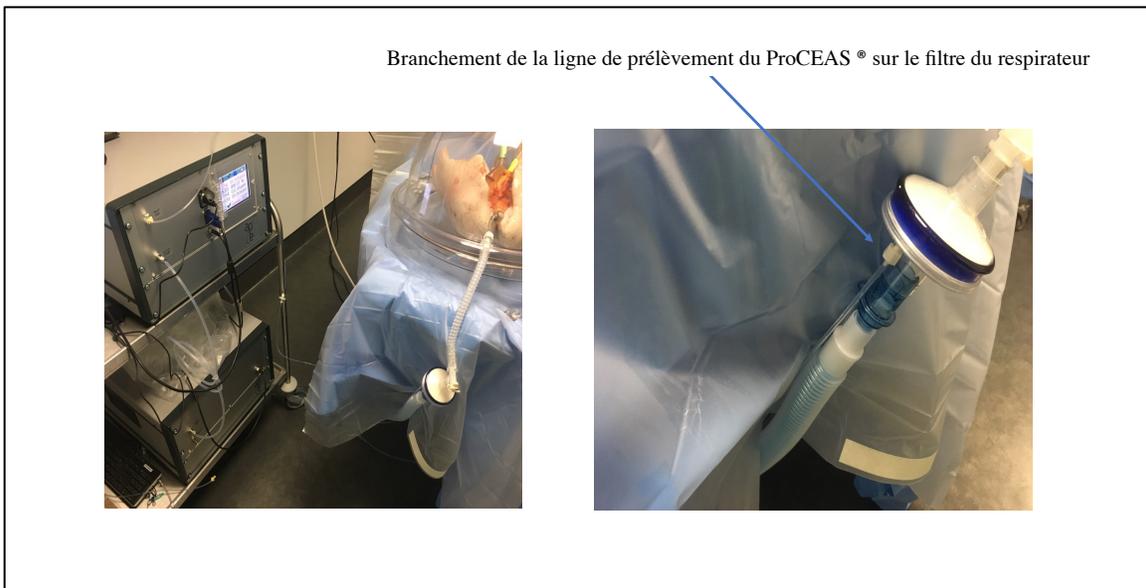
Le sens unique du flux de gaz était assuré par la pompe du ProCEAS[®] Médical qui assurait un débit d'aspiration continu propre au fonctionnement de la machine. Ainsi à partir du moment où les gaz analysés commençaient à pénétrer dans la ligne de prélèvement, ils ne pouvaient pas retourner dans le circuit ventilatoire de l'XPS[™].

Figure 10 : Branchement du ProCEAS® au niveau du filtre du respirateur de l'XPS™



Le ProCEAS® était branché au niveau du filtre via un tuyau souple suffisamment long pour qu'il puisse être à distance de l'XPS™. Le flux en sens unique des gaz analysés était assuré par la pompe du ProCEAS®.

Figure 11 : Photographies du branchement de la ligne de prélèvement du ProCEAS®



*À gauche les deux modules du ProCEAS® visibles à proximité du greffon ventilé.
A droite la ligne de prélèvement branchée sur le filtre du respirateur (coté respirateur).*

4- Recueil et traitement des données

A- Mesure du CO exhalé

Le ProCEAS[®] médical mesurait le COe de façon continue tout au long de la procédure de PPEV. Les valeurs de COe n'étaient pas transmises aux chirurgiens de sorte à ne pas influencer leurs décisions sur l'acceptation des greffons pour la transplantation.

Ces mesures de COe **ne modifiaient pas l'intégrité ni la qualité des organes**. Il n'y avait aucun contact entre le ProCEAS[®] et les greffons.

Il n'y avait aucune interférence ni dans le déroulement de la procédure de PPEV ni dans la prise de décision des cliniciens lors de l'étude.

B- Traitement des données du ProCEAS[®] médical

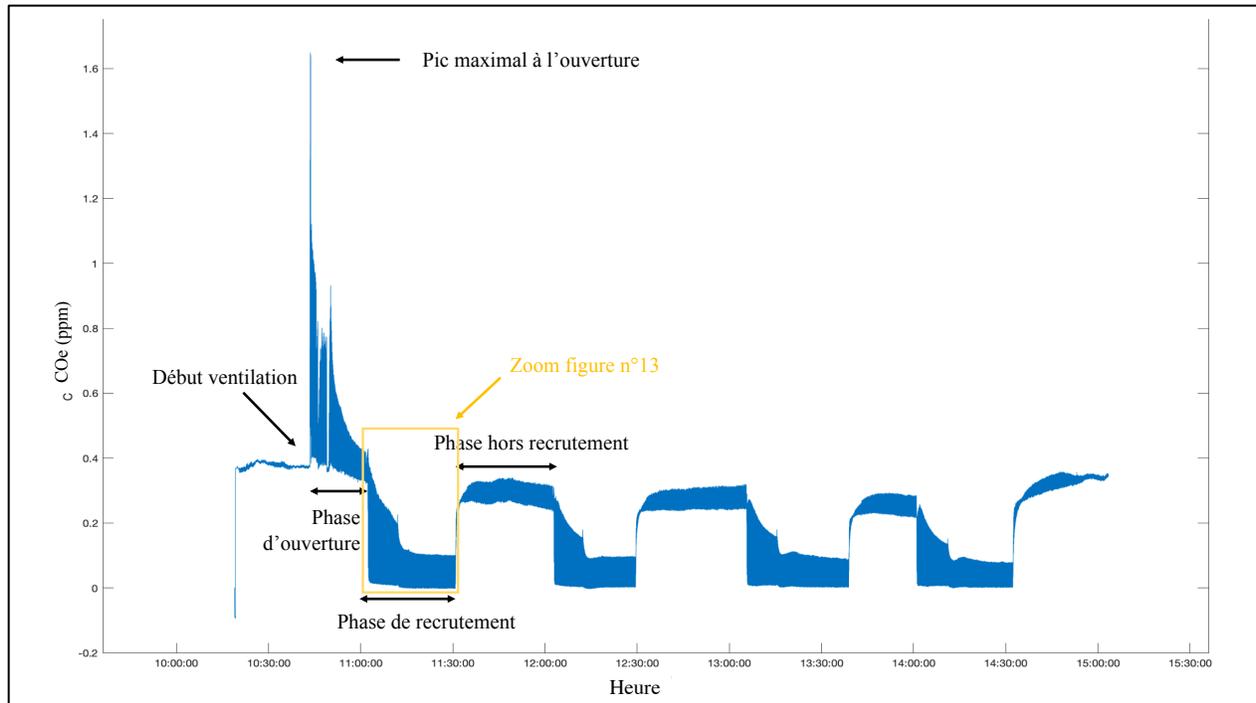
Le traitement des données du ProCEAS[®] ayant été particulièrement fastidieux lors de l'étude de faisabilité sur volontaires sains nous avons voulu faciliter cette étape. Au sein de notre laboratoire de recherche TIMC-IMAG, (équipe PRETA) nous avons mis au point un logiciel sur MATLAB permettant de traiter les données brutes du ProCEAS[®].

Après extraction des données, le logiciel permettait de tracer de façon quasi-automatique les courbes de COe mesurées par le ProCEAS[®] au cours du temps, de sélectionner certaines zones d'intérêt et d'avoir les moyennes de production de COe (max-min) ainsi que les écarts-types durant ces périodes (Figures 12 à 14).

C- Description générale des courbes de monitoring de COe

La Figure 12 est un exemple de courbe de CO expiré tout au long d'une procédure d'optimisation en PPEV.

Figure 12 : Exemple de courbe de COe



Procédure n°2 de PPEV complète

Le COe est en ordonnée (ppm), le temps en abscisse (horaire).

Pour cet exemple il y a eu quatre phases de recrutement.

On peut noter avant le début de la ventilation le taux de CO présent dans l'air ambiant (environ 0,37 ppm)

Pour cet exemple relatif à la procédure n° 2, la ventilation a débuté à 10h43 et a fini à 14h56.

Il y a eu 4 phases de recrutement.

Chaque trait épais bleu correspond en réalité à un enchaînement de cycles respiratoires.

Les cycles respiratoires étant courts (environ 6 secondes) par rapport à l'échelle de la durée totale de l'optimisation (4h10 pour cet exemple), ils paraissent se toucher et donnent donc l'impression d'un trait épais plein. Le haut du trait correspond aux valeurs maximales expiratoires, le bas du

trait aux valeurs minimales, en fin d'inspiration. Les courbes de production de COe étaient relativement semblables d'une procédure à l'autre en revanche les valeurs de COe étaient différentes.

Avant le début de la ventilation des poumons, le ProCEAS[®] mesurait le CO contenu dans le circuit du respirateur de l'XPS[™], alors ouvert, reflétant ainsi la concentration de CO dans l'air ambiant du bloc opératoire (environ 0,37 ppm pour cet exemple).

Comme décrit précédemment, le ProCEAS[®] était branché en dérivation sur le circuit respiratoire, sur le filtre à proximité du poumon. Dès le début de la ventilation, l'air inspiratoire et l'air expiratoire passaient par ce filtre lors de chaque cycle respiratoire. Pendant la phase inspiratoire, le ProCEAS[®] ne mesurait donc que le CO contenu dans le circuit du respirateur, insufflé vers les poumons passant via le filtre. Pendant la phase expiratoire, le ProCEAS[®] analysait l'air provenant des poumons contenant d'une part le CO endogène produit et exhalé par les poumons et d'autre part le CO exogène apporté par le respirateur lors des inspirations.

Une des difficultés de l'analyse des courbes tenait au fait que le respirateur de l'XPS[™] captait de l'air ambiant du bloc opératoire lors des phases de ventilation à 21% de FiO₂ (hors recrutement). L'air ambiant du bloc opératoire contenait du CO dont le taux était variable (de 0,3 à 0,9 ppm) provenant de la respiration du personnel et de la pollution atmosphérique. Nous avons vérifié que l'air du circuit du respirateur contenait du CO lorsque la FiO₂ était réglée à 21% en analysant l'air insufflé dans un ballon par le respirateur et en branchant le ProCEAS[®]

Lors des phases de ventilation à 21% de FiO₂, l'air insufflé aux poumons par le respirateur contenait donc du CO qui se retrouvait également dans les gaz exsufflés par les poumons.

Lors des phases de ventilation à 100% de FiO₂, l'XPS[™] insufflait uniquement de l'oxygène médical qui ne contient que des traces de CO. Nous avons également vérifié l'absence de CO dans ces gaz médicaux en branchant le ProCEAS[®] en dérivation sur un raccord de prise de gaz murale.

Les valeurs basses mesurées (COe minimal, lors des phases inspiratoires) correspondaient donc au CO provenant du circuit respiratoire de l'XPS[™]. Les valeurs hautes (COe maximal, télé-expiratoire) correspondaient à la somme de la production de COe par les poumons et au CO provenant du respirateur lors de l'inspiration.

Soustraire la valeur inspiratoire à la valeur mesurée en fin d'expiration permettait de neutraliser le CO exogène et donc d'obtenir la valeur de COe produite par les poumons avec précision.

Au total, la production de CO par les poumons (COe) était donc donnée par la différence entre la valeur mesurée en fin d'expiration (valeur maximale) et la valeur en fin d'inspiration (valeur minimale).

Début de la ventilation, phase d'ouverture des poumons et phases hors recrutement pulmonaire

Au début de la ventilation, lors de la phase d'ouverture des poumons (FiO₂ 21%, PEP 5 cm H₂O), il y avait un premier pic de COe correspondant au relargage du CO stocké dans les poumons non ventilés durant la première phase d'ischémie froide.

Il y avait un deuxième pic de COe moins intense, dû à une nouvelle ouverture alvéolaire lors d'un court recrutement lors d'une augmentation transitoire de la PEP à 10 cm H₂O, de quelques secondes, puis redescendue à 5 cm H₂O.

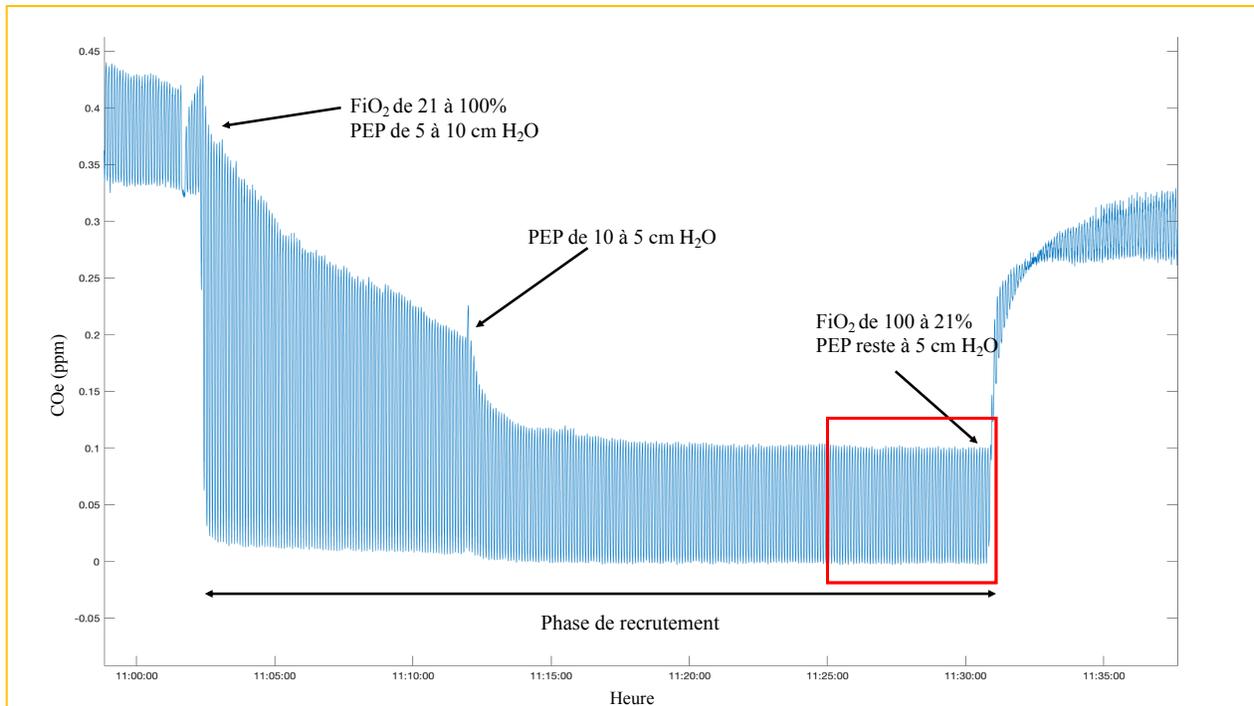
Lors de cette phase, la FiO₂ étant réglée à 21%, comme décrit précédemment, les valeurs inspiratoires étaient le reflet de la concentration de CO contenue dans l'air ambiant et n'était pas à zéro mais plutôt autour de 0,5 ppm (0,3 ppm dans l'exemple Figure 12)

Phase de recrutement

Au début des phases de recrutement la FiO₂ était augmentée de 21% à 100%.

A FiO₂ 100 %, le respirateur captait son air uniquement dans la prise murale d'apport d'oxygène médical dépourvue de CO. Lors de ces phases, il n'y avait donc plus de CO dans le circuit et la concentration mesurée chute à des valeurs proches de zéro en fin « d'inspiration », où seul de l'oxygène pur était amené aux poumons. La Figure 13 représente la première phase de recrutement de la procédure n°2 en Figure 12

Figure 13 : Courbe de production de COe : Zoom sur la première phase de recrutement (carré orange de la Figure 12)



Cet exemple de phase de recrutement est un zoom de la première phase de recrutement de la procédure n°2 et correspond au carré orange de la Figure 12. En rouge les 5 dernières minutes de cette phase de recrutement visibles en gros plan sur la Figure suivante. On note une augmentation de COe lors du début de la phase de recrutement et une baisse brutale lors de la baisse de la PEP de 10 à 5 cm H₂O. Les valeurs de COe se stabilisent en fin de phase de recrutement.

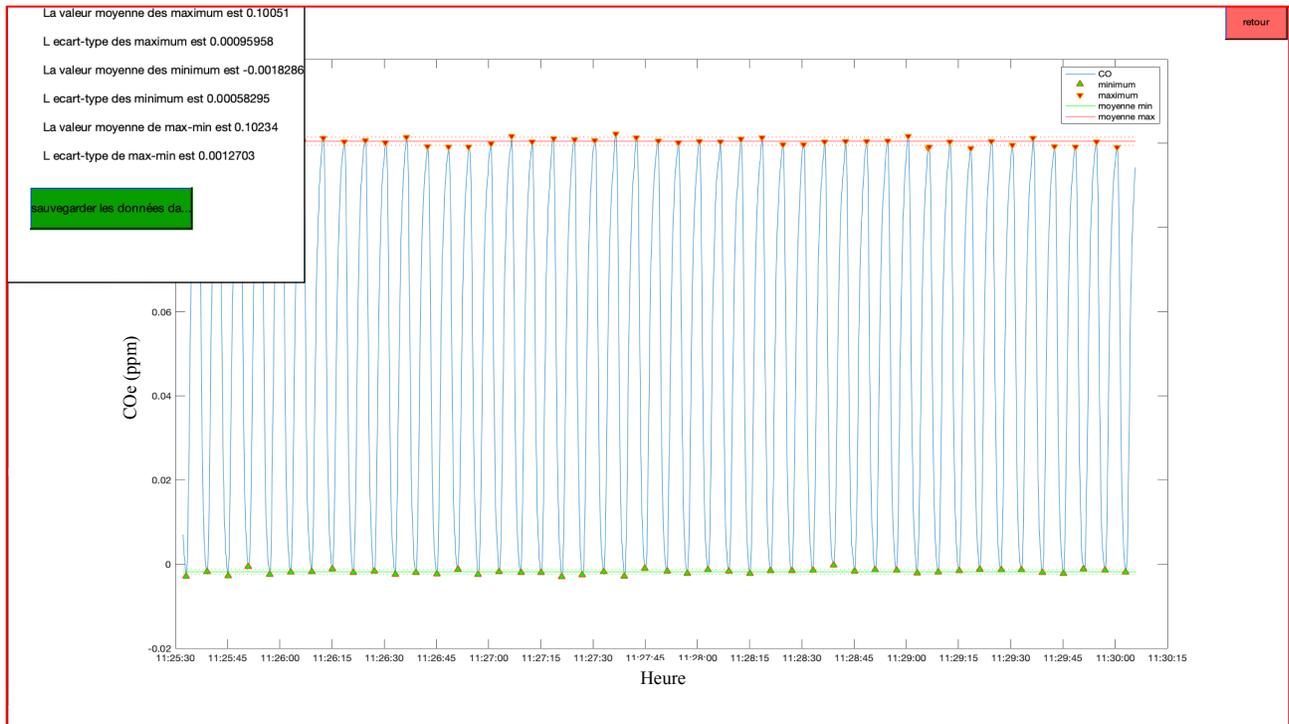
Au début des phases de recrutement, la PEP était également modifiée et augmentée de 5 à 10 cm H₂O entraînant un meilleur recrutement alvéolaire.

La quantité de CO expirée (max-min) augmentait brutalement au début des phases de recrutement. Au bout de 10 minutes la PEP était abaissée de 10 à 5 cm H₂O, la quantité de COe diminuait progressivement et se stabilisait probablement à un taux de production de base, reflétant la production pulmonaire de CO en temps réel.

Comme décrit précédemment, à la fin des phases de recrutement la FiO₂ était redescendue à 21%. Lorsque la FiO₂ était abaissée, l'XPSTM recaptait de l'air ambiant et la valeur de fin d'inspiration était à nouveau le reflet de taux de CO contenu dans l'air ambiant.

La Figure 14 illustre les différents cycles respiratoires durant 5 minutes à la fin d'une phase de recrutement (carré rouge de la figure précédente), une des phases clés d'évaluation des poumons.

Figure 14 : Exemple de courbe de production de COe : Zoom sur les 5 dernières minutes de la première phase de recrutement



Carré rouge de la figure précédente, (Procédure n°2)

En haut à gauche les valeurs moyennes de COe (des valeur maximum, minimum et Max-Min) et les écart-types pour la plage de données sélectionnée.

Pour cet exemple, la moyenne des max-min de COe sur 5 minutes est de 0,102 ppm, l'écart type est de 0,001 ppm.

Chaque cycle respiratoire est bien différenciable, ils sont visuellement superposables lors de cette phase stable, en fin de premier recrutement. Pour rappel le ProCEAS® donne 5 valeurs de CO par seconde (5 Hz).

D- Choix de l'analyse du COe en fin de recrutement

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au COe **sur 5 minutes lors de la fin des phases de recrutement** car il s'agit des phases d'évaluations principales des greffons avec notamment réalisation des gaz du sang. Ce sont des phases clés pour la décision de la poursuite ou de l'arrêt des procédures de PPEV et pour l'acceptation ou non des greffons pour la transplantation. Les cinq dernières minutes des phases de recrutement sont des phases de stabilité pour les greffons et dans la majorité des cas le taux de COe s'est stabilisé. Les paramètres de l'XPS™ sont reproductibles lors de chaque procédure et inchangés (FiO₂ 100%, PEP 5 cm H₂O).

Nous avons également réalisé des analyses secondaires pour lesquelles des informations sur les donneurs, des données concernant les procédures de PPEV (dont des échantillons de liquide de perfusion) et sur les receveurs étaient nécessaires.

E- Données provenant des donneurs décédés : fiches cristaux

Pour le recueil des données concernant les donneurs, avant le prélèvement d'organes, nous avons utilisé les fiches cristaux anonymes. Ceci nous a permis d'obtenir plusieurs données dont l'anamnèse récente et les critères d'évaluation pulmonaire ayant conduit aux procédures d'optimisation par PPEV.

Nous avons pu analyser les scanners, les résultats de biologie (dont les gaz du sang) et les fibroscopies avant prélèvement. Ceci nous a également permis d'avoir des informations sur les temps de premières ischémies froides subis par les greffons.

F- Données des greffons pulmonaires lors des procédures de PPEV

Nous avons recueilli de nombreuses données lors des procédures de PPEV. Ces données étaient anonymisées et rentrées dans un tableur.

Les données d'horodatage étaient relevées manuellement et contrôlées informatiquement.

Les gaz du sang veineux et artériels lors de chaque phase d'évaluations étaient photographiés et reportés manuellement.

Pour évaluer la fuite de liquide de perfusion nous avons mesuré la perte de liquide grâce à l'entonnoir gradué présent sur le réservoir de liquide de perfusion de l'XPS™.

Le circuit de perfusion étant clos, le liquide n'étant plus dans le réservoir de l'XPS™ se retrouvait forcément dans les poumons. La baisse de quantité de liquide dans le réservoir du circuit de perfusion correspondait donc à une fuite de liquide vers les poumons, étant donc un reflet de la formation d'œdème pulmonaire des greffons.

Pour toutes les données enregistrées par l'XPS™, nous avons extrait les fichiers enregistrés par la machine et les avons traitées informatiquement grâce à un tableur permettant d'avoir des données fiables puis moyennées sur les périodes d'intérêt. Ceci nous a permis d'obtenir notamment les résistances vasculaires ainsi que les pressions ventilatoires. Ceci nous a également permis de vérifier que les temps des différentes phases étaient bien synchrones entre les données de l'XPS™ et celles du ProCEAS®.

G- Analyses des protéines inflammatoires

Pour l'analyse des protéines inflammatoires nous avons recueilli des échantillons de liquides de Perfusion (quelques mL), soit lors des changements de liquide, soit en fin de procédure. Les liquides prélevés correspondaient à une partie des liquides jetés de sorte que les prélèvements n'avaient pas d'influence sur le déroulement des procédures de PPEV. Ces prélèvements ont été conservés congelés, puis ont été centrifugés avant d'être analysés au laboratoire de biochimie du CHU de Grenoble. Nous avons analysé les interleukines 1, 6, 8, 10, 1 β , le TNF-alfa, ainsi que le marqueur RAGE.

H- Recueil des données chez les receveurs

Nous avons recueilli certaines informations concernant l'opération chirurgicale de transplantation à partir des comptes rendus opératoires dont la durée d'opération, la survenue de complications graves, l'utilisation de monoxyde d'azote inhalé, l'utilisation d'une ECMO et les gaz du sang du receveur en fin d'opération.

Nous avons également recueilli des informations sur les receveurs durant leur hospitalisation post-opératoire à partir de leur dossier médical. Nous avons recueilli la durée d'hospitalisation en réanimation, en soins intensifs et la durée d'hospitalisation en service conventionnel. Nous avons recueilli la durée d'intubation orotrachéale, la durée de ventilation non invasive. Nous avons recherché la survenue de dysfonction primaire du greffon d'une part en recherchant cette notion dans les dossiers, en analysant les radiographies thoraciques et en colligeant les gaz du sang lors de l'accueil en réanimation, à 24, 48 et à 72 heures.

I- Analyses statistiques

L'étude était une étude de faisabilité sans hypothèse préalable permettant de calculer un nombre de patients à inclure.

Notre but était d'inclure une vingtaine de procédures consécutives pour cette première étude.

Les comparaisons entre groupes sont présentées en médianes et interquartiles et figurées sous forme de diagrammes en boîtes affichant la médiane, le premier et le troisième quartile à chaque extrémité du rectangle puis les premiers et neuvièmes déciles aux extrémités des segments, et les valeurs extrêmes sous forme de points.

Du fait d'un nombre relativement faible d'expérimentations incluses, nous avons vérifié que la répartition des données ne différait pas significativement d'une répartition gaussienne par un test de Kolmogorov-Smirnov. De la même façon, nous avons vérifié l'homogénéité des variances par test de Barlett.

La corrélation entre différents paramètres était effectuée par régression linéaire simple et testée statistiquement par analyse de variance (ANOVA).

La comparaison des données entre groupes était faite par test non paramétrique (Test U de Mann Withney). Pour l'analyse de répartition entre groupes nous avons utilisé un test de Fischer exact.

Nous avons également réalisé une courbe ROC pour la détermination d'un seuil de COe.

Un risque de première espèce (risque α) était considéré comme significatif si $p < 0,05$.

Ces analyses ont été réalisées grâce au logiciel Statview sauf pour la réalisation de la courbe ROC réalisée avec le logiciel « R ».

Résultats

1- Procédures de PPEV incluses, caractéristiques des donneurs et des receveurs

L'étude s'est déroulée sur une période de 8 mois de Décembre 2018 à Juillet 2019 à l'hôpital Foch de Suresnes.

Nous avons inclus vingt et une procédures successives. Les caractéristiques des donneurs sont détaillées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Caractéristiques des donneurs

N°	Age	Taille (cm)	Sexe	Raison entrée en PPEV	Résumé anamnèse	ACR	Durée Réa (j)	Durée IOT (j)	Images radiologiques	Bronchoscopie	PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)
1	66	175	M	CE	Hémorragie cérébrale post traumatique	Non	7	6	Epanchements et Atélectasies bilatéraux	Sécrétions purulentes	310
2	57	165	F	CE	AVC hémorragique	Non	6	6	Atélectasies bilatérales, Inhalation	Sécrétions purulentes	327
3	48	171	M	DDAC-M3	AVC hémorragique	Non	40	40	Atélectasies et Condensations bilatérales	Sécrétions purulentes	522
4	61	164	M	DDAC-M3	SCA puis ACR	Oui	5	5	Epanchements liquidiens et Atélectasies bilatérales, Inhalation		346
5	47	183	M	DDAC-M3	ACR hypoxique	Oui	5	5	Contusions et Pneumothorax G		360
6	66	170	M	CE	AVC hémorragique	Non	4	4	Atélectasies et Condensations bilatérales		318
7	59	200	M	DDAC-M3	AVC hémorragique	Non	7	7	Condensations G et Inhalation		418
8		166		CE	ACR	Oui	2	2	Atélectasies bilatérales, Epanchement Dt	Sécrétions purulentes	322
9	52	170	M	CE	AVC hémorragique puis ACR	Oui	2	2	Contusions bilatérales et Inhalation	Sécrétions hématiques	300
10	53	165	F	CE	Hémorragie cérébrale post traumatique	Non	1	1	Condensations G	Sécrétions purulentes	388
11	41	180	M	CE	AVC hémorragique	Non	1	1	Inhalation	Sécrétions hématiques	330
12	34	168	F	DDAC-M3	AVC hémorragique	Non	5	5	Atélectasies bilatérales		480
13	34	183	M	CE	AVC hémorragique	Non	4	4	Epanchement bilatéraux	Sécrétions purulentes	266
14	31	187	M	CE	Pendaison	Oui	1	1	Condensations bilatérales	Sécrétions hématiques	404
15	64	158	F	DDAC-M3	AVC hémorragique	Oui	1	1	RAS		528
16	15	185	M	CE	ACR	Oui	14	14	Contusions et Inhalation bilatérales	Sécrétions purulentes	353
17	21	178	M	CE	Hémorragie cérébrale post traumatique	Oui	4	4	Atélectasies et Inhalation G, PNO Dt	Sécrétions purulentes	375
18	28	182	M	CE	Hémorragie cérébrale post traumatique	Oui	4	4	Contusions et Inhalation bilatérales		401
19	53	167	F	CE	AVC hémorragique	Oui	1	1	Inhalation Dt	Sécrétions purulentes	277
20	66	146	F	DDAC-M3	ACR	Oui	10	10	Epanchements bilatéraux et Atélectasie Dt	Sécrétions purulentes	362
21	61	162	F	DDAC-M3	Noyade ACR	Oui	7	7	Epanchements et Atélectasies bilatéraux		297

CE : Critères élargis, AVC : Accident vasculaire cérébral ;ACR : arrêt cardio-respiratoire (indiqué oui si le donneur a présenté au moins un ACR durant sa prise en charge en réanimation, Durée Réa et IOT :durée de réanimation et durée d'intubation oro-trachéale avant prélèvement, dernier rapport PaO₂/FiO₂ avant prélèvement. En orange les deux greffons non acceptés pour la transplantation après PPEV

Huit greffons sont entrés en procédure de PPEV suite au caractère DDAC-M3 du donneur.

Concernant les treize greffons à « critères élargis », ils ont été inclus soit pour des images d'atélectasie ou de contusion (5/13), soit pour des pneumopathies d'inhalation (6/13), soit pour des raisons d'hématose aux gaz du sang, certains avaient plusieurs raisons de passage en PPEV.

La médiane des âges des donneurs était de 37,5 ans ($\pm 15,8$). Treize donneurs étaient des hommes.

Sur les vingt et un donneurs, treize sont décédés dans les suites d'un accident vasculaire cérébral hémorragique, les 9 autres sont décédés dans les suites d'arrêt cardio-respiratoires récupérés à la phase initiale de la prise en charge, dont un, suite à une noyade et un suite à une pendaison.

La médiane des durées de réanimation avant le prélèvement d'organe était de 4 jours ($\pm 8,8$ j).

Concernant les greffons, toutes les procédures correspondaient à des greffes bipulmonaires (aucune greffe monopulmonaire).

La médiane des durées des premières ischémies froides était de 3h33 ($\pm 1h34$).

La médiane des durées des procédures de PPEV était de 4h03 (± 55 min).

Seuls 2 greffons n'ont pas été transplantés au terme de la requalification, un provenait d'une procédure « DDAC-M3 » et un d'une procédure de poumons à « critère élargis » (procédure 6 et 7, en orange sur le Tableau 5).

Le tableau 6 récapitule certaines données des patients receveurs

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des indications de greffe et des suites post opératoires des receveurs

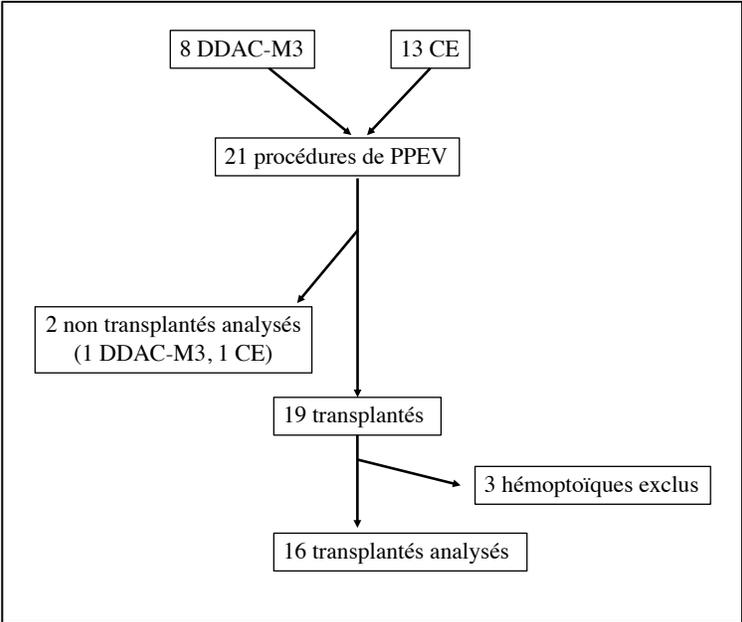
N°	Indication	Age	Durée réa	Durée Hospit Tot	PaO ₂ /FiO ₂ H0	DPG H0	PaO ₂ /FiO ₂ 24 h	DPG 24h	PaO ₂ /FiO ₂ 48h	DPG 48h	PaO ₂ /FiO ₂ 72 h	DPG 72h	DPG 3 dans les 72h
1	Deficit A1	55	4	24	206	2	440	1	413	1	380	1	0
2	Mucoviscidose	35	4	25	314	1	328	1	360	1	314	1	0
3	Mucoviscidose	20	4	17	476	1	366	1	541	1	490	1	0
4	BPCO	53	12	40	114	3	166	3	204	2	171	3	1
5	Mucoviscidose	48	5	35	194	3	519	1	419	1	350	1	1
8	Mucoviscidose	36	7	24	89	3	359	1	329	1	428	1	1
9	Emphyseme	52	12	33	ECMO	3	ECMO	3	ECMO	3	283	2	1
10	Mucoviscidose	37	8	23	97	3	466	1	271	2	366	1	1
11	Mucoviscidose	27	4	26	432	1	368	1	308	1	324	1	0
12	Mucoviscidose	21	6	23	283	2	346	1	391	1	289	2	0
13	Mucoviscidose	39	7	22	392	1	388	1	444	1	304	1	0
14	Mucoviscidose	31	3	28	304	1	223	2	319	1	280	2	0
15	Mucoviscidose	20	2	23	437	1	437	1	357	1	440	1	0
16	Mucoviscidose	48	3	29	182	3	248	2	412	1	370	1	1
17	DDB	59	6	42	90	3	337	1	382	1	353	1	1
18	BPCO	64	10	31	181	3	418	1	370	1	436	1	1
19	Fibrose	42	9	26	ECMO	3	ECMO	3	ECMO	3	ECMO	3	1
20	Proteinose alveolaire	22	12	37	ECMO	3	ECMO	3	ECMO	3	ECMO	3	1
21	Pneumopathie kystique	43	4	22	309	1	345	1	310	1	309	1	0

Les durées sont exprimées en jours ; les rapports PaO₂/FiO₂ en mmHg ; Durée réa : durée d'hospitalisation en réanimation ; Durée Hospit tot : durée totale d'hospitalisation ; ECMO : patient sous ECMO

Diagramme de flux

Au total, le diagramme suivant récapitule les procédures incluses et analysées après exclusion des greffons « hémoptoïques » (Cf. partie 3-A).

Diagramme des procédures incluses et analysées



2- Faisabilité du monitoring de CO_e, analyse des courbes et fiabilité des mesures

A- Faisabilité

L'utilisation du ProCEAS[®] s'est avérée facile concernant son branchement en dérivation sur le circuit ventilatoire grâce à sa ligne de prélèvement dédiée. De même, l'extraction et le traitement des données de CO_e ont pu être réalisés sans difficulté.

Le fonctionnement du ProCEAS[®] et sa présence au bloc opératoire n'ont jamais eu de retentissement sur le bon déroulement des procédures de PPEV que ce soit au niveau mécanique de l'XPS[™] ou sur le travail des chirurgiens.

Pour toutes les procédures incluses sur la durée de l'étude, **l'enregistrement du CO_e a bien pu avoir lieu de façon continue** tout au long des procédures de PPEV.

Aucun événement indésirable n'a été relevé suite à l'étude.

B- Données générales, moyennes (max-min) sur 5 minutes lors des phases d'intérêt

La moyenne de CO_e a été calculée pour plusieurs phases de 5 minutes qui sont représentées sur la Figure 15. Nous avons évalué le CO_e lors de « l'ouverture » des poumons, juste avant la première phase de recrutement puis à la fin de chaque phase de recrutement et au début et à la fin de chaque phase entre les recrutements.

Le tableau 7 présente les moyennes des valeurs de CO_e en fin de chaque phase et les écarts types des valeurs sur 5 minutes.

Les procédures 6 et 7 correspondent aux poumons non transplantés.

Les lignes 9,11,14,18 correspondent aux poumons présentant des taux de COe en fin de première phase de recrutement plus élevés que les deux greffons non transplantés.

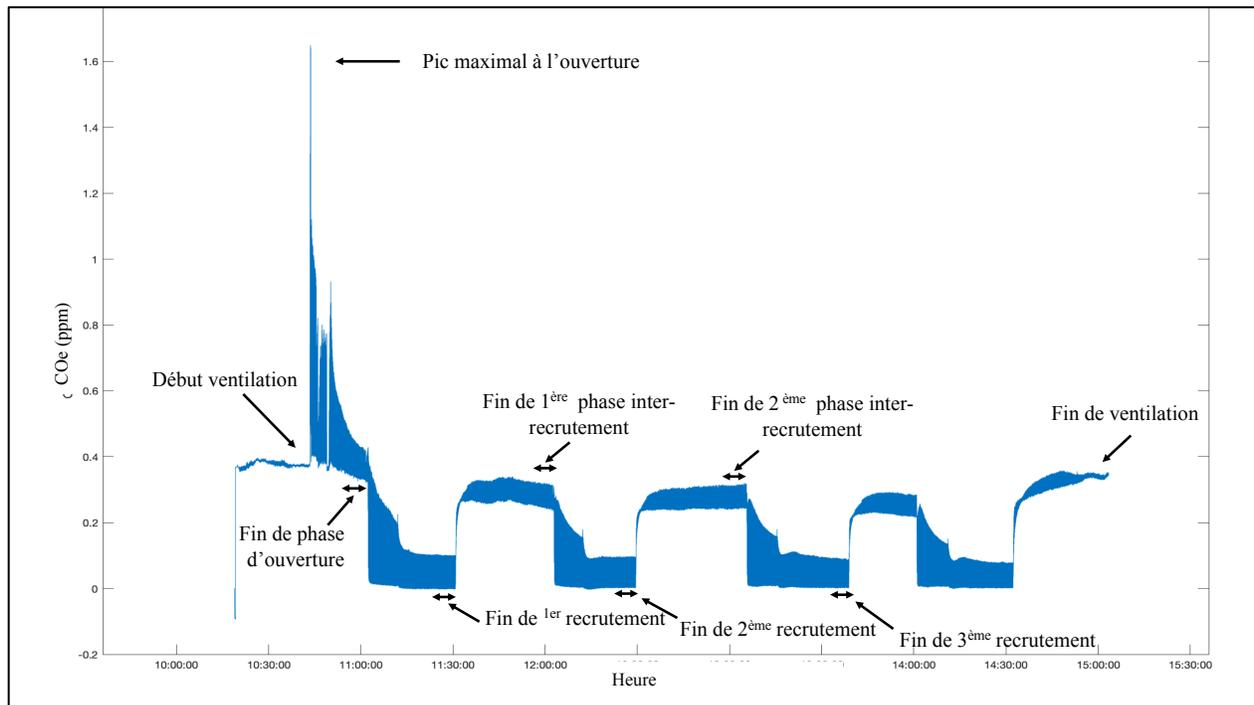
Globalement, les écarts types des taux de COe « max-min » sur 5 minutes étaient très bas. Certains écarts types étaient à 0,001 ppm, le maximum était à 0,157 ppm (procédure n°9).

La moyenne globale des écarts types était de 0,011 ppm.

Certains écarts types de valeurs de COe « max-min » sur 5 minutes étaient un peu plus élevés.

Lors des phases de recrutement la quantité de CO expirée (max-min) augmentait (due à l'augmentation du recrutement alvéolaire). Les alvéoles étaient progressivement « lavées » de leur CO. La PEP était abaissée de 10 à 5 cm H₂O au bout de 10 minutes et la quantité de COe diminuait progressivement probablement jusqu'à un taux de production de base alvéolaire. Cette diminution était plus lente pour certains poumons dont le taux de COe était plus élevé. Le temps pour « laver » le poumon et retrouver le taux de base était donc plus long. L'écart type des «max-min » était alors logiquement plus haut que pour les poumons pour lesquels le COe était déjà redescendu et les valeurs s'étaient stabilisées.

Figure 15 : Les différentes zones d'intérêt



Sur cet exemple, après la phase d'ouverture ont eu lieu successivement 4 phases de recrutement et 4 phases inter-recrutement. Chaque période de 5 minutes des différentes phases ont été analysées et les valeurs moyennées, les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Comme décrit précédemment, à 100 % de FiO_2 le respirateur de l'XPSTM n'apportait pas de CO alors qu'il en apportait lors des phases de ventilation à 21 % (provenant de l'air ambiant).

Ces variations de CO amené depuis l'extérieur dans le circuit ventilatoire entraînent des variations des valeurs basales de CO (valeur minimale télé-inspiratoire) lors des changements de FiO_2 et l'aspect en « créneau » des courbes de COe sur l'ensemble des procédures.

Au total, chaque marche d'escalier correspondait au changement de phase de ventilation et de variation de FiO_2 (phase de recrutement ou hors recrutement).

Les variations de CO exogène apporté par le respirateur expliquent l'aspect en « marches d'escaliers » des courbes de CO.

Tableau 7 : Moyennes et écarts types des valeurs de COe des max-min sur 5 minutes lors de la fin de chaque phase de recrutement et hors recrutement

N°	Pic Max O	COe O	COe F1R	COe F2P	COe F2R	COe F3P	COe F3R	COe F4P	COeF4R
1	1,1	0,112 <i>0,004</i>	0,139 <i>0,004</i>	0,091 <i>0,003</i>	0,115 <i>0,002</i>	0,07 <i>0,02</i>	0,101 <i>0,002</i>		
2	1,6	0,1 <i>0,001</i>	0,102 <i>0,001</i>	0,073 <i>0,002</i>	0,094 <i>0,001</i>	0,07 <i>0,003</i>	0,089 <i>0,002</i>	0,066 <i>0,002</i>	0,078 <i>0,001</i>
3	2	0,047 <i>0,004</i>	0,047 <i>0,005</i>	0,032 <i>0,003</i>	0,065 <i>0,001</i>	0,039 <i>0,003</i>	0,062 <i>0,001</i>		
4	3,1	0,15 <i>0,008</i>	0,114 <i>0,003</i>	0,082 <i>0,004</i>	0,104 <i>0,002</i>				
5	3	0,28 <i>0,02</i>	0,278 <i>0,005</i>	0,214 <i>0,003</i>	0,256 <i>0,006</i>	0,183 <i>0,003</i>			
6	2,3	0,143 <i>0,057</i>	0,306 <i>0,017</i>	0,096 <i>0,021</i>	0,411 <i>0,037</i>				
7	1,8	0,424 <i>0,015</i>	0,409 <i>0,014</i>	0,192 <i>0,073</i>	0,19 <i>0,007</i>				
8	Erreur de branchement		0,218 <i>0,003</i>	0,168 <i>0,002</i>	0,229 <i>0,002</i>	0,148 <i>0,003</i>	0,165 <i>0,02</i>		
9	6	2,6 <i>0,021</i>	5,134 <i>0,157</i>	1,304 <i>0,011</i>	3,231 <i>93</i>	0,796	2,84	0,627 <i>0,009</i>	1,86 <i>0,089</i>
10	1,6	0,082 <i>0,005</i>	0,081 <i>0,004</i>	0,051 <i>0,004</i>	0,102 <i>0,003</i>	0,049 <i>0,003</i>	0,101 <i>0,003</i>	0,058 <i>0,003</i>	0,091 <i>0,002</i>
11	5	1,923 <i>0,06</i>	2,886 <i>0,116</i>	1,455 <i>0,014</i>	2,041 <i>0,046</i>	1,138 <i>0,014</i>	1,676 <i>0,018</i>		
12	2,3	0,04 <i>0,003</i>	0,041 <i>0,002</i>	0,028 <i>0,001</i>	0,046 <i>0,001</i>	0,031 <i>0,001</i>	0,041 <i>0,001</i>	0,025 <i>0,002</i>	0,04 <i>0,002</i>
13	1,3	0,117 <i>0,005</i>	0,125 <i>0,002</i>	0,086 <i>0,013</i>	0,116 <i>0,003</i>	0,078 <i>0,005</i>	0,117 <i>0,002</i>		
14	1,9	0,624 <i>0,007</i>	1,003 <i>0,052</i>	0,378 <i>0,005</i>	0,72 <i>0,015</i>	0,03 <i>0,004</i>	0,03 <i>0,004</i>		
15	2,5	0,15 <i>0,003</i>	0,235 <i>0,004</i>	0,123 <i>0,002</i>	0,2 <i>0,009</i>	0,114 <i>0,002</i>	0,167 <i>0,005</i>		
16	1,3	0,079 <i>0,005</i>	0,163 <i>0,007</i>	0,099 <i>0,007</i>	0,194 <i>0,01</i>	0,086 <i>0,012</i>	0,164 <i>0,007</i>		
17	2,1	0,128 <i>0,006</i>	0,159 <i>0,008</i>	0,104 <i>0,003</i>	0,143 <i>0,005</i>	0,084 <i>0,004</i>	0,105 <i>0,002</i>	0,063 <i>0,004</i>	0,091 <i>0,001</i>
18	3	0,988 <i>0,095</i>	1,338 <i>0,015</i>	0,69 <i>0,007</i>	1,084 <i>0,01</i>	0,542 <i>0,007</i>	0,94 <i>0,013</i>	0,429 <i>0,004</i>	
19	1,2	0,294 <i>0,008</i>	0,363 <i>0,04</i>	0,09 <i>0,004</i>	0,313 <i>0,002</i>	0,141 <i>0,007</i>	0,305 <i>0,004</i>		
20	1,4	0,109 <i>0,004</i>	0,27 <i>0,003</i>	0,115 <i>0,005</i>	0,294 <i>0,01</i>	0,106 <i>0,004</i>	0,105 <i>0,002</i>	0,105 <i>0,005</i>	0,242 <i>0,006</i>
21	1,8	0,238 <i>0,02</i>	0,163 <i>0,002</i>	0,114 <i>0,004</i>	0,13 <i>0,001</i>	0,084 <i>0,004</i>	0,112 <i>0,001</i>	0,081 <i>0,002</i>	0,096 <i>0,002</i>

Valeurs en ppm. Pic Max O = COe maximal lors de l'ouverture, COe O = COe fin de phase d'ouverture, COe 1P = COe fin de première phase hors recrutement, COe 1R = COe fin de première phase de recrutement Etc.

En Orange les deux greffons non transplantés (procédure 6 et 7). En rouge les procédures exclues secondairement (procédure 9, 11 et 14). En italique les écarts-type.

Pour chaque procédure il y avait entre deux et quatre manœuvres de recrutement.

Nb : Pour plus de lisibilité, le tableau 8 reprend les moyennes de COe sans écarts types et sans les procédures exclues.

C- Fiabilité : Aspect des courbes de COe, stabilité des mesures de COe sur 5 minutes

Lors de phases « stables » où les paramètres ventilatoires et les paramètres de perfusion sont inchangés, la reproductibilité visuelle du signal (calqué sur les cycles respiratoires) et la stabilité des valeurs de COe permettent d'affirmer la fiabilité des mesures.

Les très faibles écart-types des valeurs de COe mesurées (COe (Max-Min)) sur 5 minutes lors des phases stables d'évaluation des greffons sont également en faveur de la reproductibilité et donc de la fiabilité des mesures qui ne varient que très peu lors de phases stables (exemple en Figure 14).

L'aspect visuel des courbes de COe reproductibles d'un cycle à l'autre ainsi que les écart-types nous permettent d'affirmer que les valeurs de **COe mesurées étaient bien fiables, représentatives de la production pulmonaire et interprétables.**

3- Monitoring du COe pour l'évaluation des greffons per PPEV

A- Caractéristiques anamnestiques des donneurs, caractéristiques physiologiques des poumons avant prélèvement et liens avec le COe

Nous avons analysé les caractéristiques anamnestiques des donneurs ainsi que les caractéristiques physiologiques des poumons grâce aux fiches cristaux anonymes.

Nous avons cherché une explication au fait que certaines paires de poumons avaient des taux de COe très élevés (Figure 16).

15 paires de poumons avaient des sécrétions sales lors de la fibroscopie ou lors d'aspirations, douze paires étaient suspectes de pneumopathie ou d'inhalation, sept avaient des infiltrats en imagerie.

11 présentaient un épanchement, treize une atélectasie,

4 paires de poumons avaient subi un traumatisme récent.

14 patients avaient une anamnèse de passage en réanimation relative à une origine neuro-vasculaire (dont quatre post traumatique).

Onze patients avaient subi au moins un arrêt cardio-circulatoire lors de leur prise en charge.

Toutes ces données anamnestiques n'étaient pas liées au taux de COe.

La durée de réanimation, la durée de ventilation mécanique avant le prélèvement pulmonaire n'étaient pas non plus liées au taux de COe.

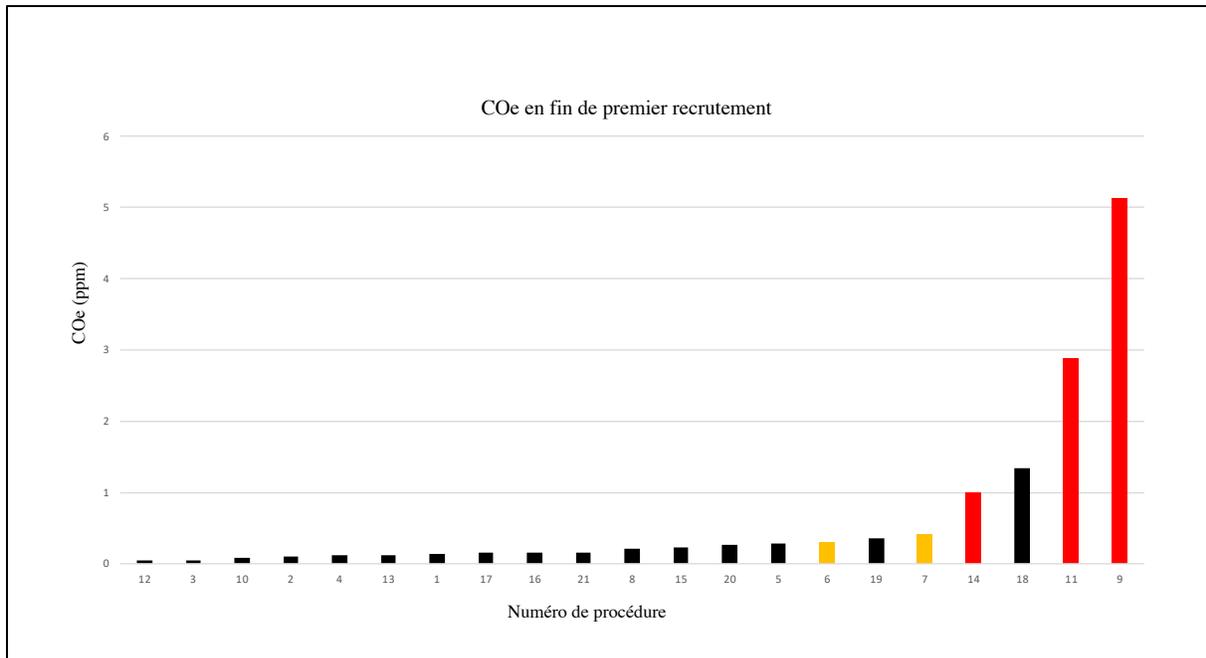
Nous avons également analysé les fibroscopies chez les donneurs avant prélèvement.

Le diagramme suivant représente les moyennes de COe en fin de premier recrutement et sont classés en ordre croissant. En abscisse est indiqué le numéro de la procédure.

Les trois paires de poumons **ayant du sang retrouvé à la fibroscopie** avant le prélèvement d'organe **avait des taux de COe extrêmement élevés** par rapport aux autres poumons (Figure 16).

Ces poumons sont représentés en rouge sur le diagramme suivant (procédure n°9, 11 et 14). Les poumons non transplantés au terme de la requalification sont en orange (procédure n°6 et 7).

Figure 16 : Classement des 21 poumons en fonction de leur production de CO en fin de premier recrutement



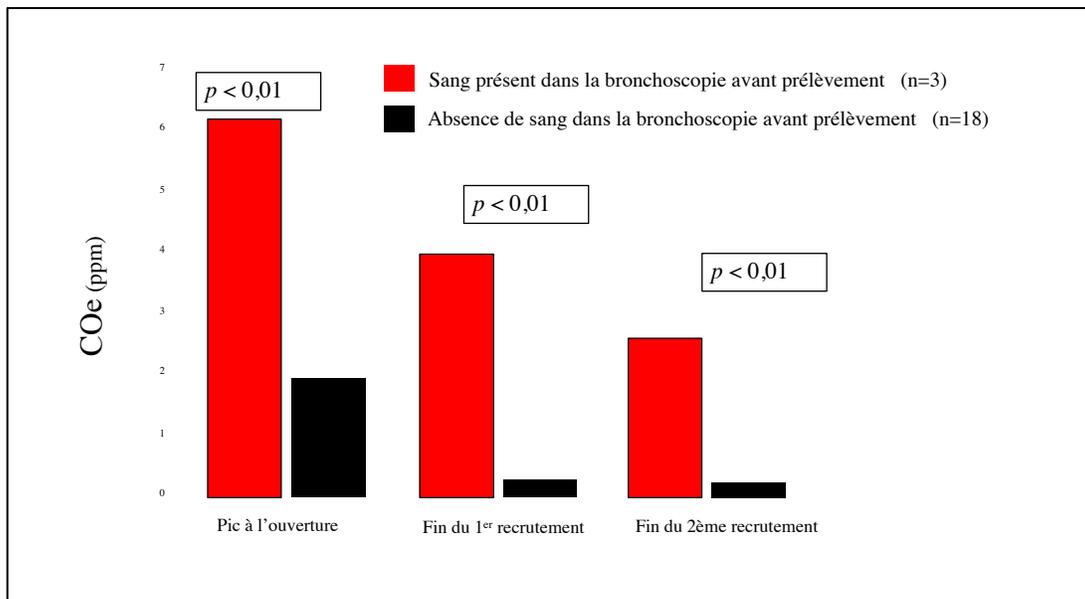
En rouge les poumons ayant du sang visualisé à la bronchoscopie (14,11,9),

En orange les poumons récusés pour la transplantation (6,7),

Les poumons « hémoptoïques » ont des taux de COe jusqu'à 20 fois supérieurs aux autres poumons.

La présence de sang à la bronchoscopie était significativement associée à un taux de COe élevé ($p < 0,01$). Cette différence de production de CO se retrouvait tout au long de la procédure de PPEV (Figure 17).

Figure 17 : CO expiré en fonction de la présence de sang ou non à la fibroscopie lors de « l'ouverture » des poumons, au premier et au deuxième recrutement



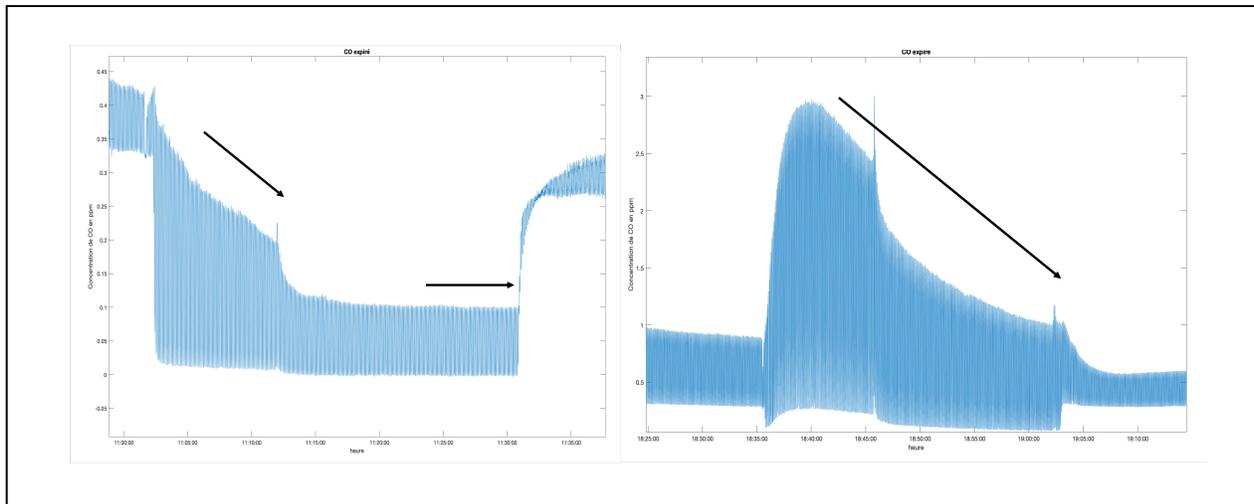
Le COe est plus élevé pour les poumons « hémoptoïques » par rapport aux « non hémoptoïques ». La différence est statistiquement significative ($p < 0,01$) à l'ouverture et lors des deux premiers recrutements.

Les globules rouges contiennent une grande quantité d'hémoglobine, riche en hème. La dégradation de l'hème est à l'origine de la production de CO.

Ceci explique probablement que les poumons ayant du sang à la fibroscopie aient un taux de COe très élevé. La production de CO suite à la dégradation des globules rouges est bien décrite et connue depuis longtemps (Cf. partie discussion).

Ces poumons en plus d'avoir des taux de COe beaucoup plus élevés que les autres, nécessitaient un temps plus grand pour la stabilisation de leur taux de COe (Figure 18). Ceci s'exprime notamment par l'absence de phase stable en plateau en fin de phase de recrutement (et donc des écarts types plus élevés des valeurs Max-Min en fin de recrutement).

Figure 18 : Aspect de la décroissance du COe pour un greffon « non hémoptoïque » et un greffon « hémoptoïque » lors de phase de recrutement



A gauche un greffon « non hémoptoïque », la décroissance du taux de COe est rapide et le taux de COe se stabilise,

A droite un greffon « hémoptoïque », le taux de COe est plus élevé et ne s'est toujours pas stabilisé en fin de phase de recrutement.

Ces trois greffons hémoptoïques ont été transplantés, aucune complication particulière n'est survenue ni pendant la transplantation ni en post-opératoire immédiat. Nous avons testé ces trois greffons « hémoptoïques » par rapport aux autres greffons. Aucune autre différence significative n'a été retrouvée pour les paramètres testés (durée d'ischémie, PaO_2/FiO_2 (au premier et au deuxième recrutement), taux de lactates, taux de glucose, résistances vasculaires pulmonaires, absorption de liquide de perfusion, PaO_2/FiO_2 en postopératoire immédiat et à 24 heures, durée d'intubation orotrachéale, durée de séjour en réanimation). La présence de sang dans les poumons est probablement un facteur confondant de la quantité de CO exhalé. En présence de sang le taux de COe mesuré est probablement un reflet de la dégradation de l'hème contenue dans les globules rouges présents dans les voies aériennes plutôt que le reflet de la production endogène par le tissu pulmonaire. **Le taux de COe ne reflétait probablement pas l'état inflammatoire de ces poumons présentant du sang à la fibroscopie avant prélèvement.**

Nous avons exclu ces 3 paires de poumons « hémoptoïques » de l'analyse pour la suite de l'étude.

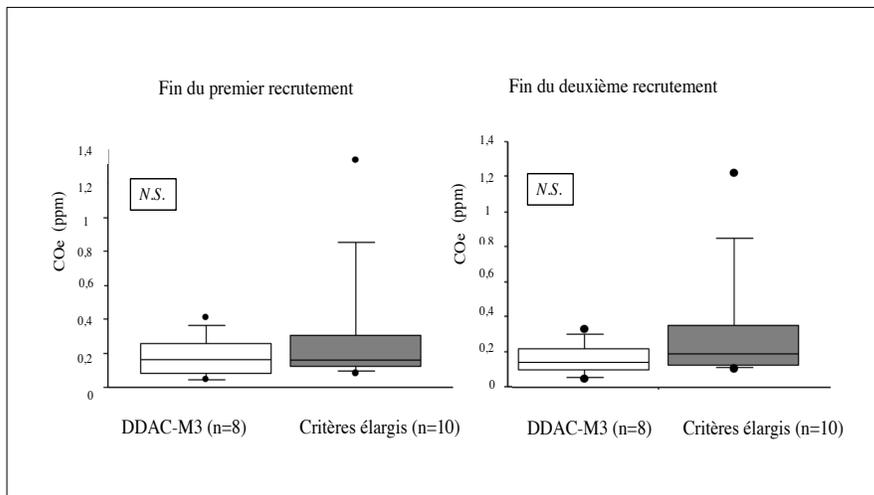
B- Raison d'entrée en procédure de PPEV et taux de COe

Les greffons de type DDAC-M3 entrent en procédure de PPEV sur des arguments plutôt d'ordre réglementaire et législatif contrairement aux poumons à « critères élargis » qui présentent de fait des arguments de « mauvaise » qualité les amenant à entrer en procédure d'optimisation. Nous avons comparé le taux de COe en fin de premier et de deuxième recrutement en fonction de l'origine des greffons dits à « critères élargis » ou DDAC-M3. Les taux de COe sont repris dans la Figure 19.

Il n'y avait pas de différence significative pour les taux de COe en fonction de leur raison d'entrée en procédure de PPEV.

Nous en avons conclu que les poumons pouvaient être inclus et comparés pour leurs taux de COe indépendamment de leur raison d'entrée en PPEV sur des « critères élargis » ou « DDAC-M3 ».

Figure 19 : Taux de COe en fonction de la raison d'entrée en procédure de PPEV



Les taux de COe en fonction de la raison d'entrée en PPEV, à gauche en fin de premier recrutement, à droite en fin de deuxième recrutement, Pas de différence statistiquement significative retrouvée.

Par ailleurs, il est à noter que **ces transplantations de greffons pulmonaires DDAC-M3 étaient parmi les toutes premières de France** et que le devenir des patients transplantés était similaire aux patients ayant reçu des greffons à « critères élargis ».

C- Taux moyen de COe en fin de recrutement

Le Tableau 8 présente les taux de COe lors des 5 dernières minutes des phases de recrutement des 18 procédures incluses.

Les lignes oranges correspondent aux 2 paires de poumons non acceptées par l'équipe de transplantation au terme de la requalification (procédure n° 6 et 7), indépendamment du taux de COe, qui ne leur était pas communiqué.

Tableau 8: Moyennes de COe lors des 5 dernières minutes des phases de recrutement pour les 18 procédures incluses

N° procédure	COe Fin 1er R	COe Fin 2e R	COe Fin 3e R	COe Fin 4e R
1	0,139	0,115	0,101	
2	0,102	0,094	0,089	0,078
3	0,047	0,065	0,062	
4	0,114	0,104		
5	0,278	0,256		
6	0,306	0,411		
7	0,409	0,19		
8	0,218	0,229	0,165	
10	0,081	0,102	0,101	0,091
12	0,041	0,046	0,041	0,04
13	0,125	0,116	0,117	
15	0,235	0,2	0,167	
16	0,163	0,194	0,164	
17	0,159	0,143	0,105	0,091
18	1,338	1,084	0,94	
19	0,363	0,313	0,305	
20	0,27	0,294	0,105	0,242
21	0,163	0,13	0,112	0,096

Valeurs en ppm.

Les poumons « hémoptoïques » ne sont pas représentés.

En orange les greffons non acceptés pour la transplantation ayant des taux de COe globalement élevés, seul le greffon 18 a des taux de COe largement plus élevé

D- Acceptation des greffons pour la transplantation et taux de COe

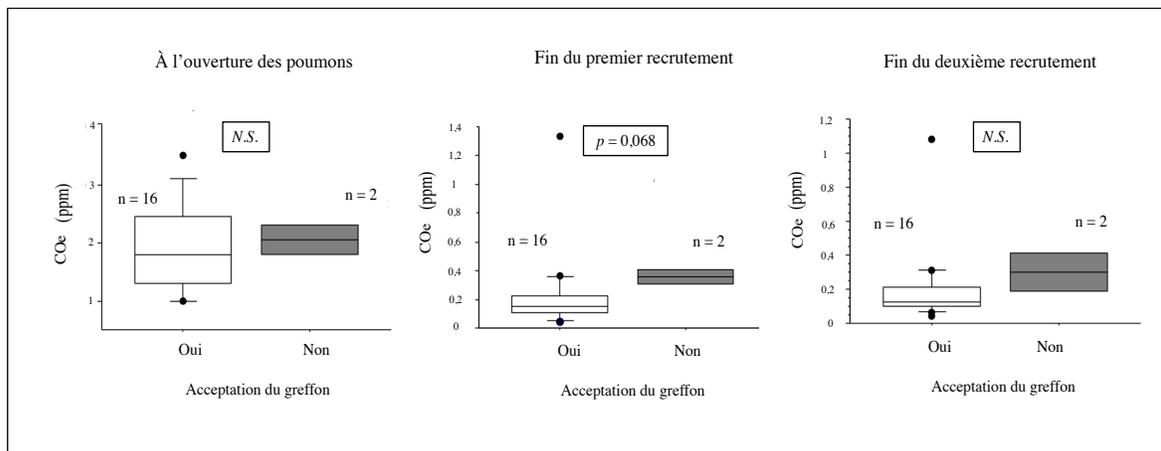
L'objectif principal était d'évaluer l'intérêt du monitoring du COe per PPEV pour l'évaluation et l'acceptation des greffons. Partant de l'hypothèse physiologique que le COe est le reflet de l'état inflammatoire des greffons, le taux de COe serait inversement proportionnel à la qualité des greffons. Les greffons acceptés auraient donc des taux de COe inférieurs aux greffons récusés.

Au début de la ventilation, il n'y avait pas de différence sur le taux de COe en fonction de l'acceptation ou non des poumons, ni visuellement ni après test statistique (Figure 20).

En fin de premier recrutement en revanche, il y avait une tendance visuelle à un **plus haut taux de COe pour les poumons ayant été récusés**. Cette différence n'était pas statistiquement significative ($p=0,068$). **En fin de deuxième recrutement**, il persistait une **tendance visuelle sur le taux de COe plus élevé pour les poumons récusés** mais moins importante qu'en fin de premier recrutement et toujours non significative.

Au total malgré le faible effectif de poumons récusés à la transplantation pulmonaire ($n=2$), **il semble qu'un taux de COe élevé soit associé à la décision de non-transplantation et ce, de façon précoce, dès la fin du premier recrutement.**

Figure 20 : Taux de COe en fonction de leur acceptation pour la transplantation ou non



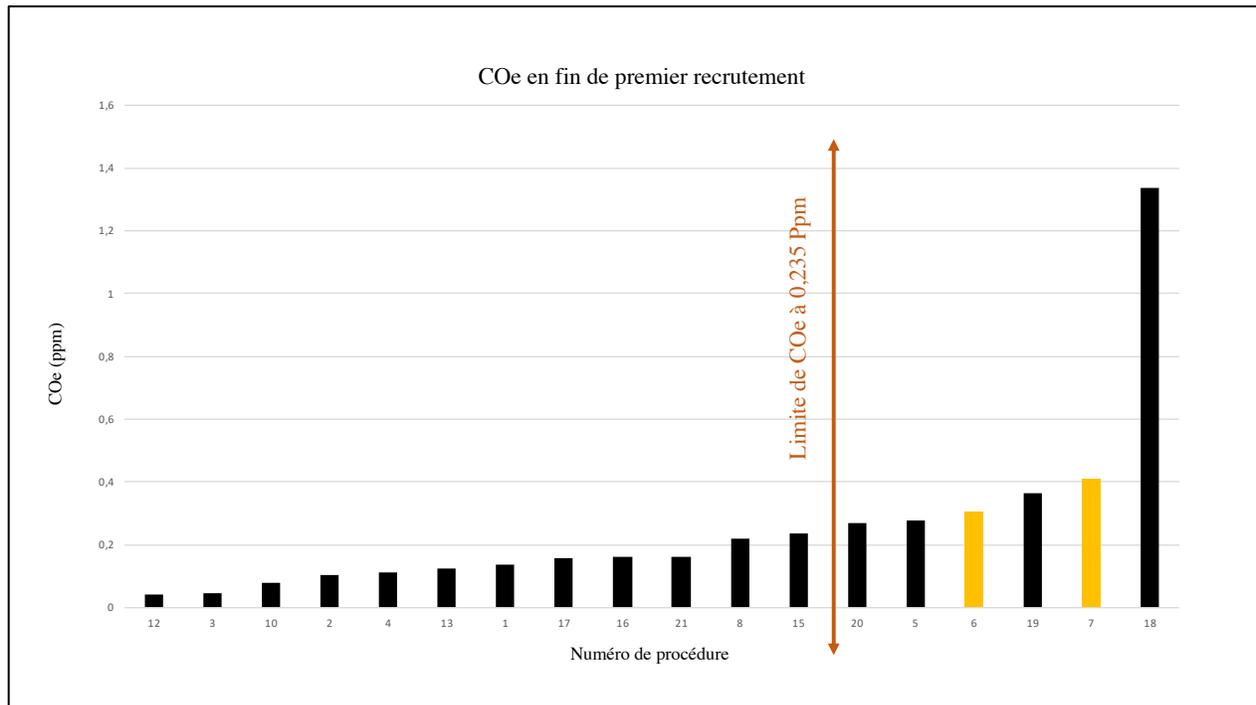
Les taux de COe représentés par des diagrammes, à l'ouverture des poumons à gauche, à la fin du premier recrutement au centre et à la fin du deuxième recrutement. Il n'y a aucune différence de COe à l'ouverture des poumons. On note une tendance non statistiquement significative à un taux de COe plus élevé pour les poumons qui n'ont pas été acceptés pour la transplantation.

E- Détermination d'un seuil de COe élevé

Sur la Figure 21, les taux de COe en fin de premier recrutement sont classés par ordre croissant. Les procédures n° 6 et 7, en Orange, correspondent aux deux paires de poumons n'ayant pas été transplantés.

Aucun poumon avec des valeurs de COe basse ni inférieur à la médiane de 0,163 (\pm 0,290) des COe en fin de premier recrutement n'a été rejeté.

Figure 21 : Taux de COe par ordre croissant à la fin du 1er recrutement



Taux de COe après exclusion des 3 greffons ayant du sang lors de la bronchoscopie, en orange les deux greffons non transplantés.

Nous avons fixé un seuil de COe à 0,235 ppm pour définir les poumons ayant un taux de COe élevé.

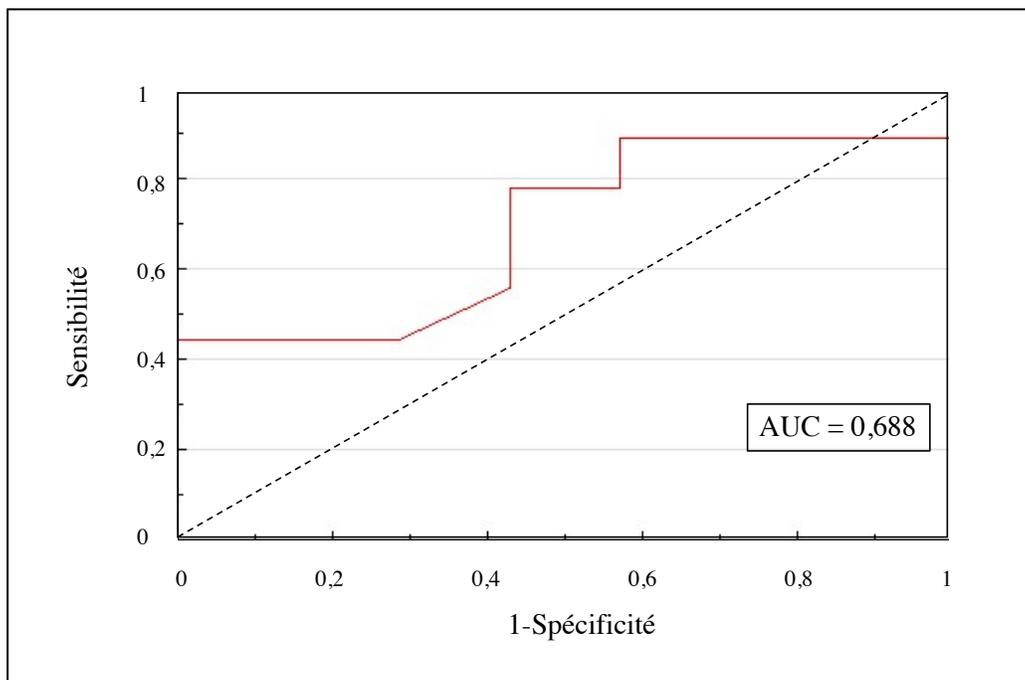
Il y avait six greffons au-dessus de ce seuil dont les deux non transplantés

Nous avons tenté de déterminer un seuil de COe en fin de premier recrutement pour classer les greffons en deux groupes : Greffons avec taux de COe bas ou élevé. Nous nous sommes basés sur le rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ à 24 heures en fonction du COe en fin de premier recrutement pour établir

une courbe ROC (Figure 22). Pour la réalisation de la courbe, nous avons classé les greffons comme sains si le rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ à 24 heures était supérieur à 300 mmHg.

L'aire sous la courbe était de 0,688. Un taux de COe de 0,235 ppm était la meilleure valeur pour classer les greffons (indice de Youden à 0,444).

Figure 22 : Courbe ROC pour la détermination d'un seuil de COe (élevé/bas) permettant de prédire la qualité du rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ à 24 heures post transplantation



L'air sous la courbe ROC était de 0,688

Le meilleur seuil de COe permettant de prédire un rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ à 24 heures > 300 mmHg était à 0,235 ppm avec un indice de Youden à 0,444

Pour la suite du travail les poumons ayant une valeur de COe supérieure à 0,235 ppm en fin de premier recrutement ont été définis comme « poumons avec des valeurs de COe hautes » (poumons n° 20, 5, 6, 19, 7, 18).

F- Variation de production du COe au cours des procédures pour chaque greffon

Une de nos hypothèses était que la cinétique de production de COe au cours du temps pourrait aider à l'évaluation des greffons.

Nous avons d'abord évalué l'évolution en valeur absolue des taux de COe entre les différentes phases de recrutement. Aucun lien entre l'évolution des valeurs de COe et le devenir des greffons n'est ressorti.

Nous avons également évalué l'augmentation relative du COe entre les deux phases de recrutement $((COe_{2R}-COe_{1R})/COe_{1R})$. Aucun lien ne s'est non plus dégagé. Par exemple l'évolution relative du COe de la procédure n°6 (poumons récusés) était de 0,34 ce qui était également bien supérieure à celle des autres poumons. Par contre, les poumons n°3 qui avaient des valeurs de COe très basses avaient une cinétique de production de CO croissante et présentaient une augmentation relative importante de 0,38, pour autant ils ont été transplantés sans complication per-opératoire ni en post-opératoire immédiat.

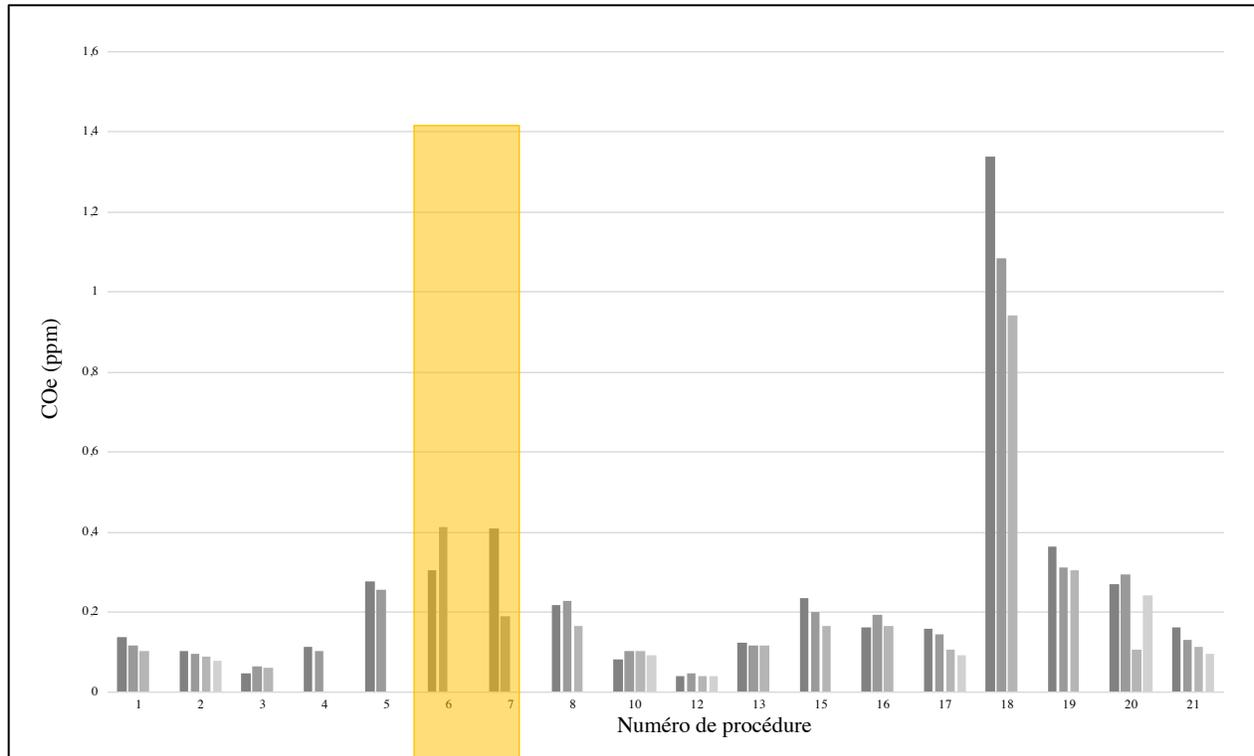
Concernant plus particulièrement les poumons récusés, seul un des deux greffons (poumons n°6) avait une augmentation claire de son taux de COe. Le deuxième greffon non accepté (poumons n°7) avait en revanche une cinétique décroissante de son taux de COe.

Tous les poumons avec des taux de « COe élevé » et acceptés ont eu une évolution décroissante de leur taux de COe. Par ailleurs, aucun poumons admis en requalification en « procédure DDAC-M3 » n'avait de cinétique croissante.

Au total, **nous n'avons pas mis en évidence de résultat permettant d'utiliser la cinétique de production de COe** dans le temps que ce soit en valeur absolue ou en valeur relative.

L'histogramme suivant (Figure 23) représente le taux moyen sur cinq minutes à la fin de chaque phase de recrutement pour les 18 procédures incluses.

Figure 23 : Taux de COe en fin de recrutement



2 à 4 valeurs par procédure variant en fonction du nombre de recrutements réalisés.
En Orange les poumons non greffés (6 et 7). Les greffons récusés n'ont eu que deux recrutements.
La cinétique de production du COe était globalement décroissante.

G- Taux de COe en fonction du temps de première ischémie froide

Nous avons testé si le temps de la première ischémie froide était corrélé au taux de COe (données présentées sur la Figure 24).

Il y avait une **corrélation statistiquement significative** ($\rho = 0,518, p=0,033$) **entre le temps de première ischémie froide et le pic maximal de COe lors de la phase d'ouverture.**

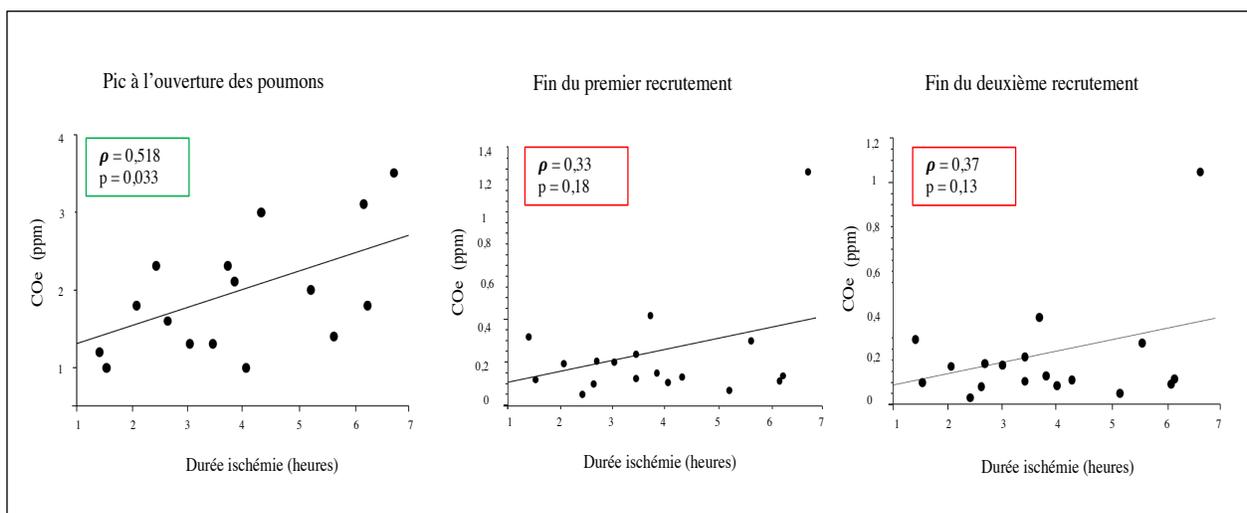
En revanche il n'y avait **plus de corrélation significative entre le temps de première ischémie froide et le COe en fin de premier recrutement ni en fin de deuxième recrutement.**

Il est probable que le taux de COe à l'ouverture reflète la production de COe multipliée par le temps de première ischémie froide, d'où une corrélation. En revanche au bout d'un certain temps les

poumons sont probablement « lavés » de leur COe produit durant la phase de première ischémie froide et le taux de COe est alors celui par le poumon de façon instantanée et donc qu'il soit un reflet de l'inflammation pulmonaire.

Les temps de première ischémie froide étaient relativement courts et n'induisaient peut-être pas de lésion d'ischémie-reperfusion suffisante pour endommager le poumon irrémédiablement et persister. Autrement ces lésions se traduiraient probablement par un taux de COe élevé tout au long de la procédure de PPEV pour les poumons ayant subi les ischémies les plus longues et non retrouvées uniquement pendant la « phase d'ouverture ».

Figure 24 : Taux de COe en fonction du temps de première ischémie froide



Il y avait une corrélation statistiquement significative entre le temps de première ischémie froide et le COe lors de l'ouverture. Cette corrélation n'était plus significative en fin de premier ni de deuxième recrutement

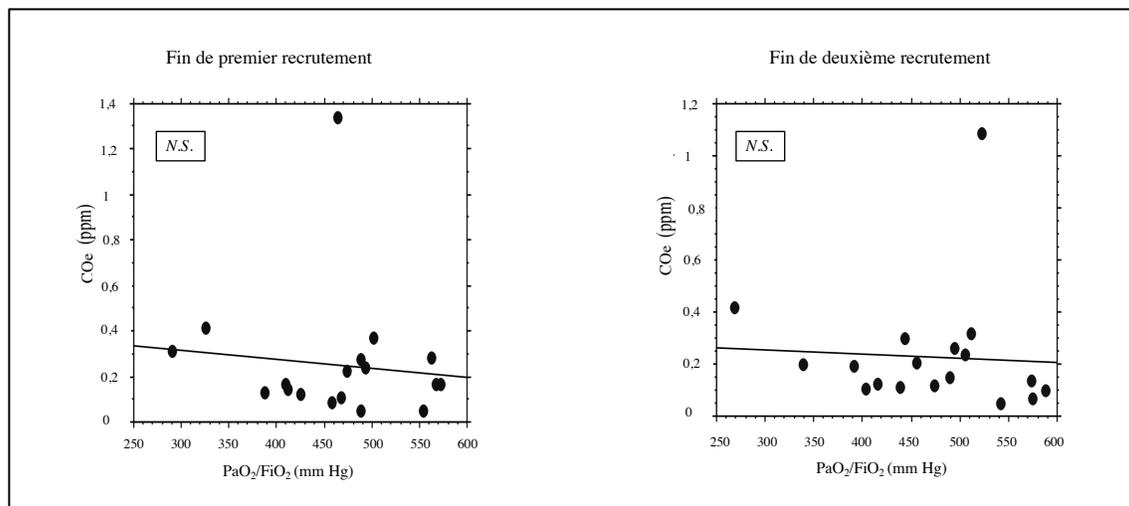
Au total, le taux de COe était corrélé à la durée de première ischémie froide, cette corrélation ne se retrouvait plus à distance de la phase d'ouverture.

H- Comparaison du COe aux autres marqueurs habituellement testés durant les procédures de PPEV pour l'évaluation des greffons

1- COe per PPEV et rapport PaO₂/FiO₂ per PPEV

Nous avons cherché une corrélation entre le rapport PaO₂/FiO₂ et le COe en fin de recrutement, représenté sur la Figure 25.

Figure 25 : Taux de COe en fin de premier et deuxième recrutement en fonction du rapport PaO₂/FiO₂



Il n'y avait pas de corrélation statistiquement significative entre les taux de COe et le rapport en fin de premier ni de deuxième recrutement (COe du premier recrutement comparé au rapport PaO₂/FiO₂ du premier recrutement, COe du deuxième recrutement comparé au COe du deuxième recrutement)

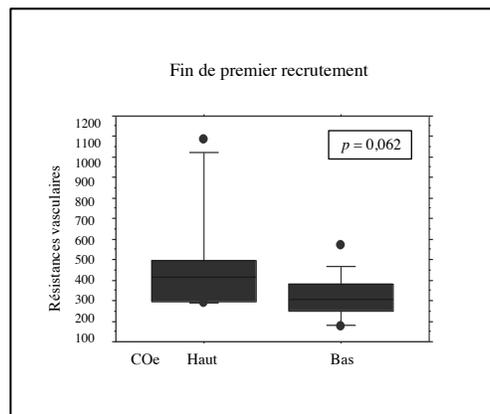
Les deux greffons ayant été récusés à la transplantation (procédures n° 6 et 7) étaient ceux ayant les rapport PaO₂/FiO₂ les plus bas lors des fins de recrutements. Cependant **aucune corrélation n'a été retrouvée entre le rapport PaO₂/FiO₂ et le COe** en fin de premier ni de deuxième recrutement.

2- COe et résistances vasculaires per PPEV

Nous avons recherché un lien entre les résistances vasculaires et le COe, représenté sur la Figure 26.

Les deux greffons récusés (procédure n° 6 et 7) sont ceux qui avaient les plus grandes résistances vasculaires. Il y a une tendance non statistiquement significative ($p = 0,062$) à des résistances vasculaires plus élevées lorsque le taux de COe en fin de premier recrutement était classé comme « haut ».

Figure 26 : résistances vasculaires en fonction du taux haut ou bas de COe en fin de premier recrutement



On note une tendance ($p=0,062$) à des résistances vasculaires plus élevées lorsque le COe était élevé en fin de premier recrutement

Au total, il y a une **tendance à des résistances vasculaires pulmonaires plus élevées pour les greffons ayant des taux de COe hauts.**

3- COe et compliance pulmonaire ventilatoire per PPEV

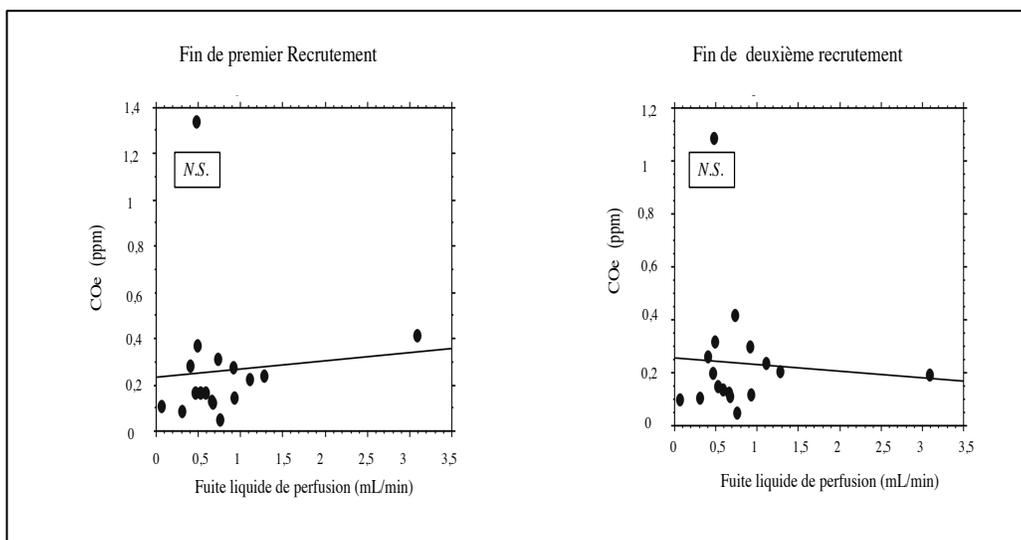
Nous n'avons retrouvé aucun lien entre le taux de COe et les compliances pulmonaires ventilatoires.

4- COe et fuite de liquide de perfusion

Nous avons cherché un lien entre la fuite de liquide de perfusion, reflet d'un œdème pulmonaire en cours de constitution et le taux de COe.

Nous avons rapporté la perte de volume total de liquide sur l'ensemble de la procédure de PPEV (en mL) à la durée de celle-ci (en minutes) de sorte à avoir un débit de fuite de liquide de perfusion (ml/min) (Figure 27).

Figure 27 : Taux de COe en fin de premier et de deuxième recrutement par rapport au débit de fuite de liquide de perfusion



Il n'y avait pas de corrélation entre la fuite de liquide perfusion et le taux de COe en fin de premier (à gauche) ni en fin de deuxième recrutement (à droite)

Le taux de COe en fin de premier ou en fin de deuxième recrutement n'était pas corrélé au débit d'absorption du liquide de perfusion.

Nous avons également testé deux groupes de greffons, ceux ayant une fuite de liquide supérieure à 50 mL/h et ceux en dessous (seuil habituellement décrit). Il n'y avait pas non plus de lien statistiquement significatif.

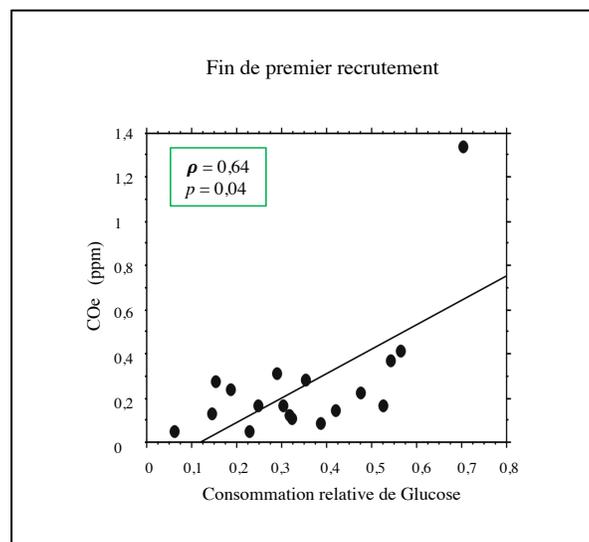
Le taux de COe en fin de premier recrutement n'était **pas corrélé statistiquement à la fuite de liquide de perfusion.**

5- COe et consommation de Glucose dans le liquide de perfusion

Nous avons cherché une corrélation entre la consommation de glucose par les greffons pulmonaires et le taux de COe (Figure 28).

Il y avait une **corrélation statistiquement significative** ($\rho=0,64$ $p= 0,04$) **entre le taux de COe et la consommation relative de glucose** entre les gaz du sang au premier et au deuxième recrutement

Figure 28 : Taux de COe en fin de premier recrutement par rapport à la consommation de glucose entre le premier et le deuxième recrutement



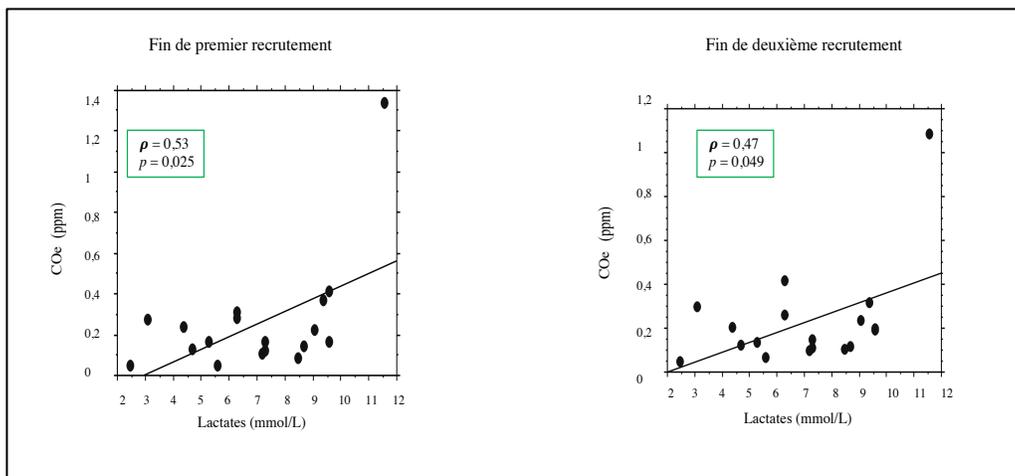
Le taux de COe était corrélé à la consommation de Glucose

6- COe et taux de Lactates

Nous avons cherché une corrélation entre le taux de COe et le taux de lactates dans les gaz du sang (Figure 29).

Il y avait une corrélation statistiquement significative entre le taux de lactates et le COe en fin de premier recrutement ($\rho=0,53$ $p= 0,025$) et le COe en fin de deuxième recrutement ($\rho=0,47$ $p= 0,049$).

Figure 29 : taux de COe en fin de premier et de deuxième recrutement et du taux de lactates au deuxième recrutement



La production de lactates était corrélée au taux de COe au premier et au deuxième recrutement

I- Évolution post opératoire des receveurs et taux de COe per PPEV

Données per-opératoires

Il n'y avait **pas de corrélation entre le taux de COe** et la durée de l'opération chirurgicale de transplantation ni sur la durée d'anesthésie. Il n'y avait pas non plus de corrélation entre le taux de COe et l'utilisation de monoxyde d'azote au bloc opératoire ni sur la décision de poser une ECMO durant la transplantation. Données post-opératoires

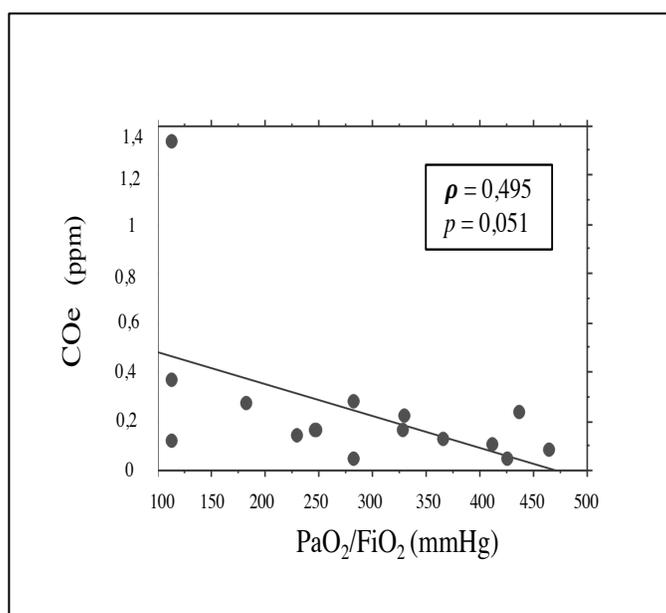
Données Post-opératoires

1- COe per PPEV et PaO₂/FiO₂ chez les receveurs

Nous avons évalué si le COe en fin de premier recrutement pouvait être prédictif de la capacité d'échange gazeux des greffons (rapport PaO₂/FiO₂) en post opératoire immédiat puis à 24, 48 et 72 h après la transplantation.

Pour l'analyse de la corrélation (Figure 30) pour les deux patients étant sous ECMO nous leur avons attribué la valeur la plus basse de PaO₂/FiO₂ de la cohorte soit 114 mmHg.

Figure 30 : Corrélation entre le COe en fin de premier recrutement et le rapport PaO₂/FiO₂ à 24 heures post transplantation

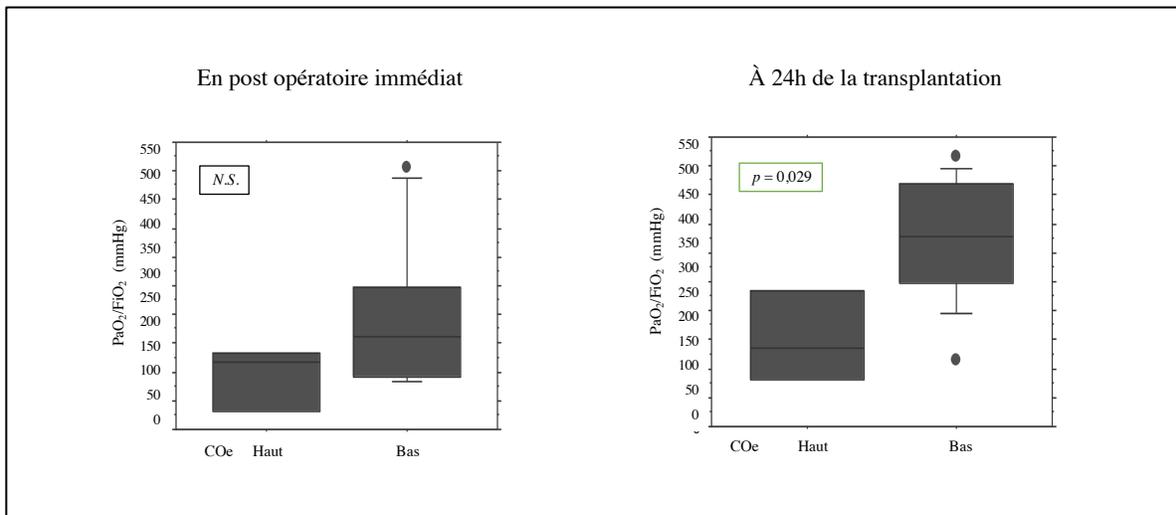


On note une corrélation ($\rho = 0,495$) à la limite de la significativité ($p=0,051$)

Nous avons également analysé les données en regroupant les greffons selon 2 groupes de COe élevé ou bas avec le seuil de COe en fin de premier recrutement à 0,235 ppm. Les greffons ayant un taux de **COe élevé** en fin de premier recrutement lors de la PPEV semblaient avoir un rapport de **PaO₂/FiO₂ plus faible en post-opératoire immédiat** mais cette différence n'était pas statistiquement significative. **A 24 h** de la greffe, un lien statistiquement significatif à un rapport

PaO₂/FiO₂ plus bas pour les patients ayant reçu un greffon avec un taux de COe élevé ($p = 0,029$) (Figure 31). Ce lien n'était plus significatif à 48 ni à 72 heures.

Figure 31 : Rapport PaO₂/FiO₂ en fonction du taux de COe haut ou bas en fin de premier recrutement



La répartition des greffons en 2 groupes (COe élevé ou bas) était associée de façon statistiquement significative au rapport PaO₂/FiO₂ à 24 h après la transplantation (à droite sur le schéma). Ce lien semblait également présent en post-opératoire immédiat mais était moins marqué (à Gauche sur le schéma).

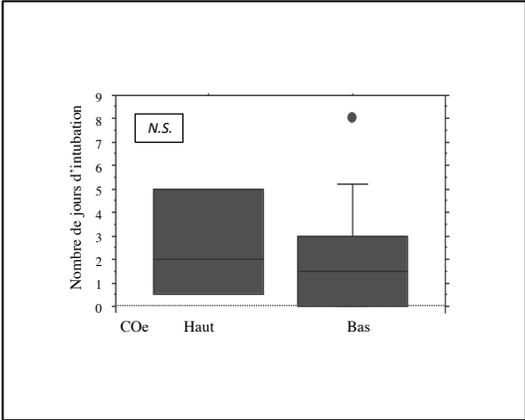
2- Support ventilatoire

Nous avons évalué si le taux de COe en PPEV était associé à la nécessité de support ventilatoire post opératoire (Figure 32).

Quatre receveurs sur douze ayant reçu un greffon ayant un taux de COe bas ont été extubés à J0 (30%). Un greffé sur quatre ayant reçu un greffon à taux de COe élevé a été extubé à J0 (25%).

Nous avons retrouvé une **très légère tendance (non significative) à une durée d'intubation orotrachéale plus longue si le greffon présentait un taux de COe élevé**. Il n'y avait pas non plus de différence significative si on additionnait le temps d'intubation et le temps de ventilation non invasive.

Figure 32 : Nombre de jours d'intubation orotrachéale en fonction du taux de COe haut ou bas en fin de premier recrutement



Il n'y avait pas de différence statistiquement significative sur la durée d'intubation en fonction du taux de COe (très légère tendance à une durée d'intubation plus longue pour les patients ayant reçu un greffon avec taux de COe élevé).

3- COe fin de premier recrutement et score de DPG

Le score DPG à 24h, 48h ou 72h ne montrait pas de lien statistiquement significatif avec la concentration de COe mesurée en fin de 1er recrutement.

Neuf receveurs sur seize ont eu un score DPG à 3 au moins une fois au cours des 72h post transplantation.

Néanmoins, tous les greffons qui exhalaient un taux de CO élevé au premier recrutement (> 0,235 ppm, n=4) avaient au moins une fois un score DPG à 3 dans les 72 premières heures.

Malheureusement du fait du faible nombre de sujets, nous n'avons pas réussi à valider cette constatation de façon statistiquement significative ($p=0,0884$).

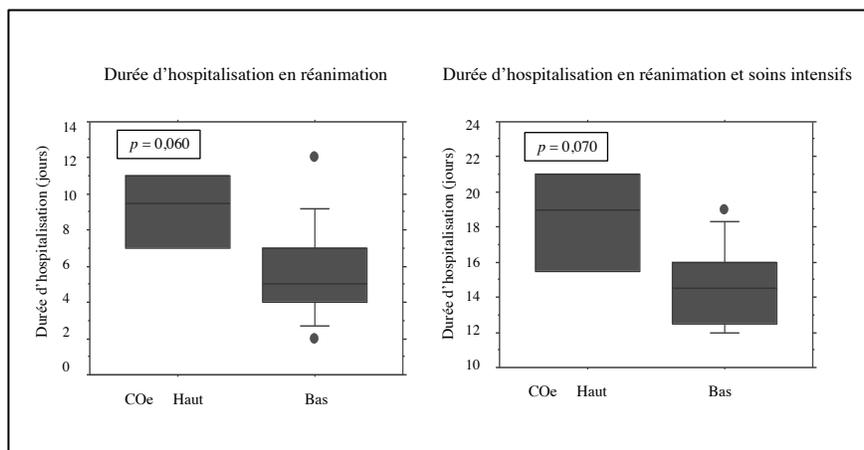
4- Durées de séjour en réanimation

Tous patients confondus, les médianes (écart type) des durées d'hospitalisation étaient de 6 jours ($\pm 3,25$) pour la réanimation, 15 jours ($\pm 3,83$) pour l'hospitalisation en réanimation et soins intensifs cumulés et de 25 jours (± 7) pour l'hospitalisation totale.

En séparant les receveurs en fonction du taux de COe per PPEV, les médianes des durées d'hospitalisation (COe haut vs COe bas) pour la réanimation était de 5 jours ($\pm 2,7$) vs 9,5 jours ($\pm 2,9$) ($p=0,06$), pour la durée en unité de soins continus (réanimation et soins intensifs cumulés) étaient de 14,5 jours ($\pm 2,34$) vs 19 jours ($\pm 3,4$) ($p=0,07$) et les médianes des durées totales d'hospitalisation étaient de 24 jours ($\pm 5,8$) vs 32,5 jours (± 10) ($p=0,39$) (Figure 33)

Il y avait donc une tendance à une durée d'hospitalisation en réanimation plus longue pour les patients chez qui des greffons ayant un taux de COe « haut » étaient transplantés. Cette tendance se maintenait pour la durée cumulée d'hospitalisation en réanimation et soins intensifs. Cette tendance se retrouvait également pour les durées d'hospitalisation totale mais était moins marquée.

Figure 33 : Durées d'hospitalisation post-transplantation en réanimation seule et en réanimation et soins intensifs cumulés en fonction du taux de COe en fin de premier recrutement



On note une tendance (non statistiquement significative) à avoir une durée d'hospitalisation en service de réanimation (à gauche) ou cumulée en réanimation et soins intensifs (à droite) plus longue pour les poumons ayant eu un taux de COe élevé en fin de premier recrutement.

4- Analyse des marqueurs biologiques inflammatoires (cytokines)

A- Comparaisons des cytokines à l'acceptation des greffons

Premièrement, nous avons analysé toutes les cytokines une à une en comparaison à l'acceptation des greffons. **Nous n'avons pas retrouvé de lien entre les taux de cytokines et l'acceptation du greffon pour la transplantation.**

Ensuite, nous avons analysés les cytokines séparément en comparaison aux taux de COe per PPEV puis à d'autres paramètres testés per PPEV.

Nous avons analysé les cytokines séparément en comparaison aux taux de COe per PPEV puis à d'autres paramètres testés per PPEV.

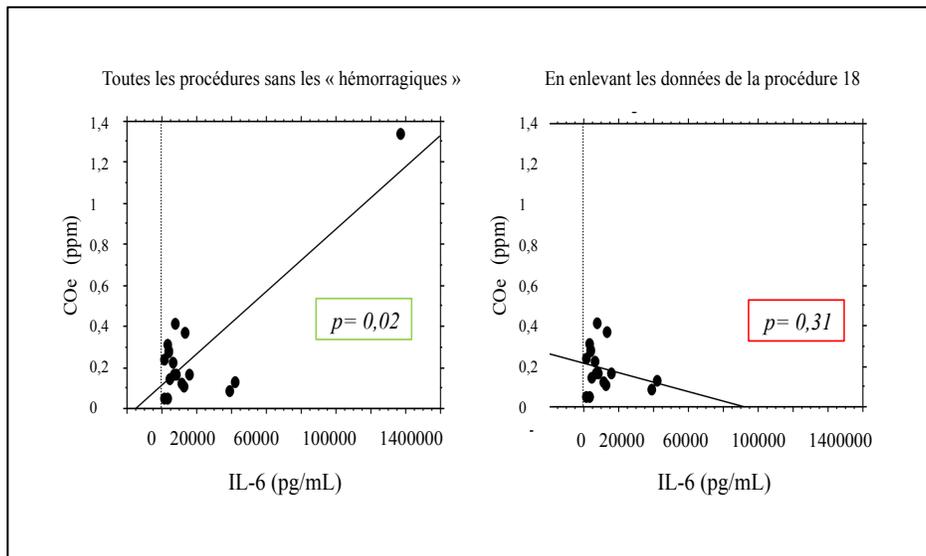
B- Comparaisons des cytokines aux taux de COe

1-Interleukine-6

Concernant l'Interleukine-6, on trouvait une corrélation statistiquement significative, entre le COe et la concentration de COe au premier recrutement (Figure 21 à Gauche). Cependant, en enlevant les données de la procédure 18 (ayant un taux de COe très élevé inexpliqué) la corrélation disparaissait totalement (Figure 1, à Droite).

Nb : Nous avons tout de même testé la corrélation en incluant les trois greffons « hémoptoïques » avec des taux de COe élevés, aucune corrélation n'était retrouvée non plus.

Figure 21 : Taux COe au premier recrutement par rapport au taux d'Interleukine-6



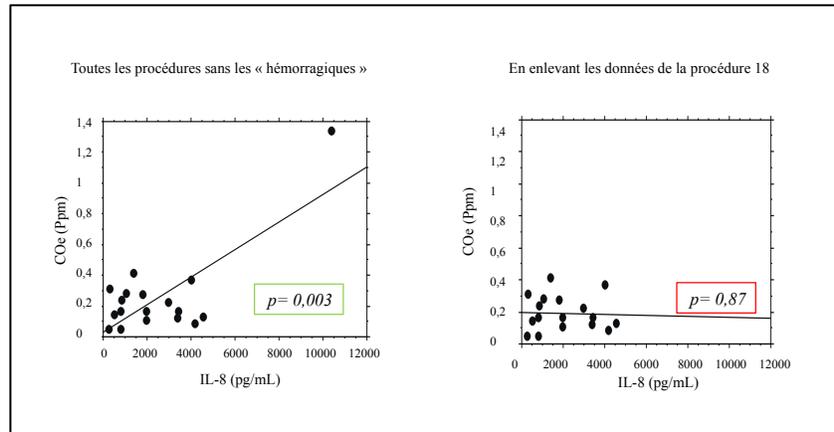
La corrélation entre IL-6 et COe au premier recrutement disparaissait totalement lorsqu'on enlève les données de la procédure 18 (à droite).

En testant cette corrélation par à un test de rang non paramétrique, on ne retrouvait pas non plus de corrélation significative entre l'IL6 et le COe, ni en classant les greffons en deux groupes COe « haut » vs. « bas ».

2- Interleukine-8

Concernant l'Interleukine-8, les observations étaient les mêmes que pour l'Interleukine-6. Il y avait une corrélation statistiquement significative entre le COe au premier recrutement et l'IL-8 qui disparaissait en enlevant les données de la procédure 18 (Figure 22). La vérification par l'utilisation du test de corrélation non paramétrique, de même que la comparaison du taux d'IL8 dans les groupes de greffons classé en COe « haut » vs « bas » confirmaient l'absence de lien statistique entre l'IL8 mesuré dans le perfusa et le taux de COe mesuré à la fin de la 1^{ère} manœuvre de recrutement.

Figure 22 : Taux COe au premier recrutement par rapport au taux d'Interleukine-8

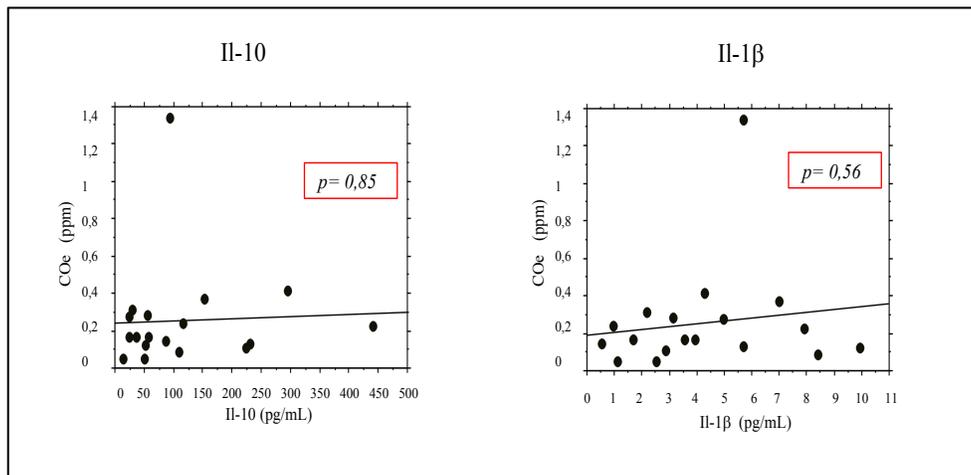


Comme pour *Il-6*, la corrélation COe au premier recrutement et *Il-8* disparaît totalement lorsqu'on enlève les données de la procédure 18 (à droite)

3- Interleukines-10 et Interleukine-1 β

Nous n'avons retrouvé aucune corrélation ni entre les taux d'interleukine-10, ni entre les taux d'Interleukines-1 β et les taux de COe en fin de premier recrutement (Figure 23).

Figure 23 : Taux COe au premier recrutement par rapport au taux d'IL-1 et IL 1 β



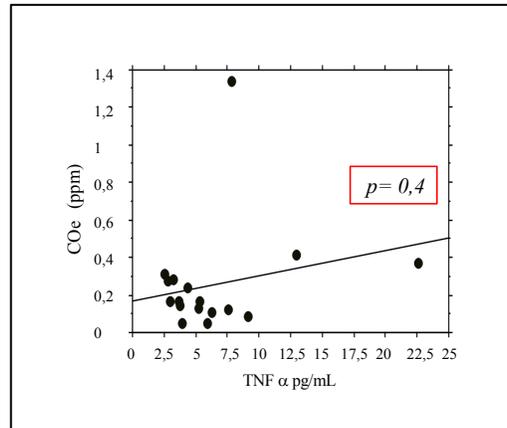
Il n'y avait pas de corrélation entre l'*IL-10* et le COe (à gauche), ni entre l'*IL-1 β* et le COe (à droite)

4-TNF- α et COe

On ne retrouvait pas de corrélation entre le TNF- α et le COe en fin de premier recrutement.

Il n'y avait pas non plus de lien si l'on séparait les greffons deux groupes haut et bas.

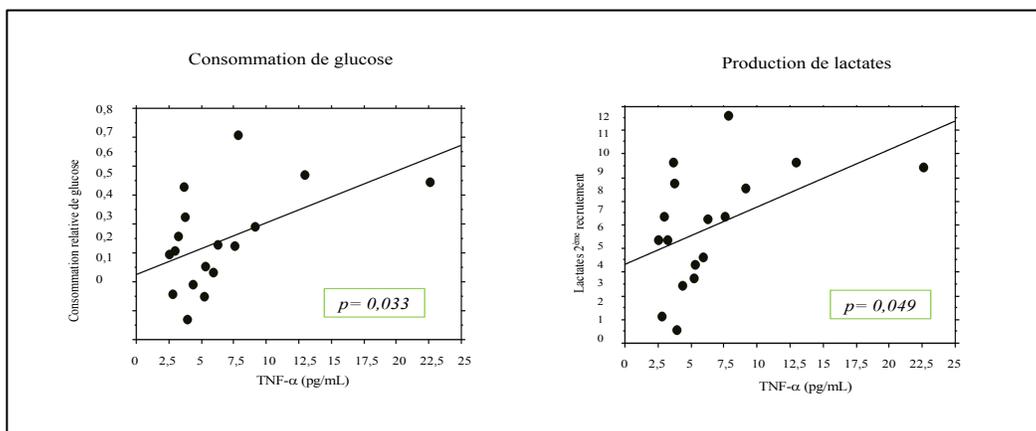
Figure 24 : Taux COe au premier recrutement par rapport au taux de TNF- α



C- Comparaison des cytokines à d'autres marqueurs testés lors des procédures de PPEV

Il y avait une corrélation statistiquement significative entre le taux de TNF- α et la consommation de glucose ($p=0,033$) et entre le taux de TNF- α et le taux de lactates au deuxième recrutement ($p=0,049$) (Figure 25).

Figure 25 : Taux de TNF- α et consommation de glucose et taux de lactates



Il y avait également une corrélation statistiquement significative entre IL-8 et la consommation de glucose ($p=0,025$) qui disparaissait si l'on enlevait les données "outlayer" de la procédure 18.

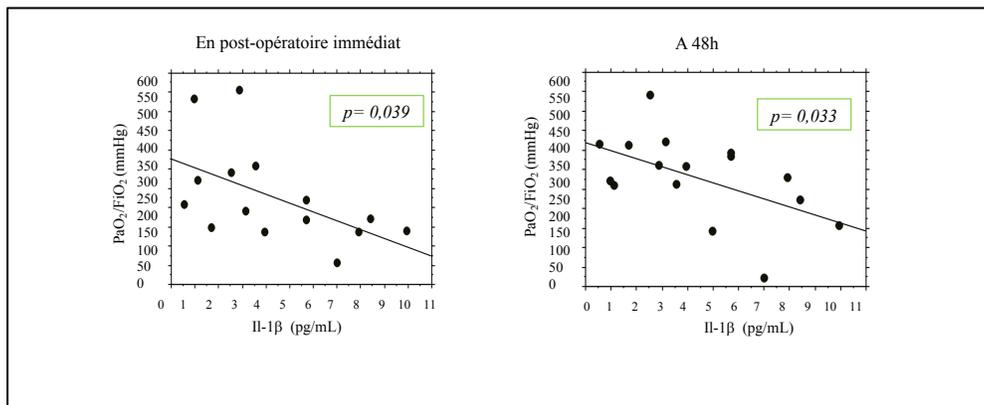
Nous avons également testé la corrélation entre **les cytokines et le rapport PaO₂/FiO₂ au premier et au deuxième recrutement, avec les résistances vasculaires pulmonaires. Aucune corrélation ne s'est avérée statistiquement significative.**

D- Analyse des protéines inflammatoires et données cliniques post-opératoires

Rapport PaO₂/FiO₂ post-opératoire

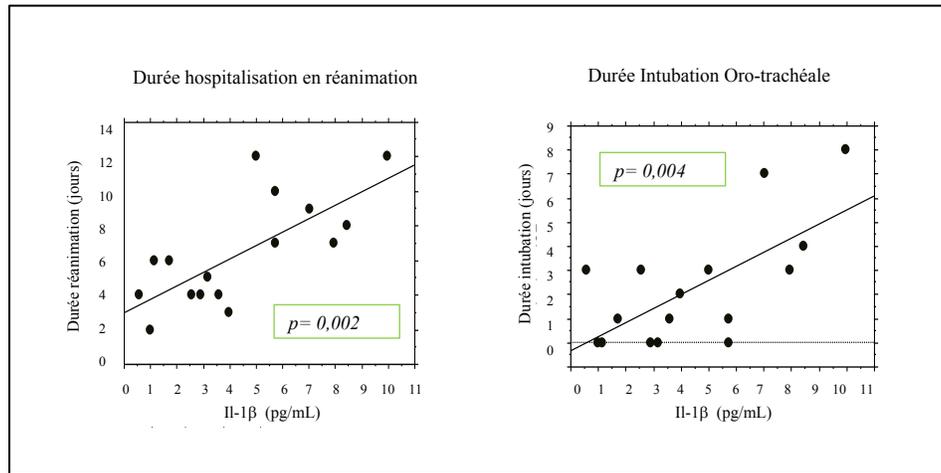
On retrouvait une corrélation entre l'Interleukine-1 β et le rapport PaO₂/FiO₂ en post opératoire immédiat ($p=0,04$) et à 48h post-opératoire ($p=0,03$) (Figure 26). Cette corrélation n'était en revanche pas significative à 24 heures ni à 72 heures.

Figure 26 : Taux d'Interleukine-1 β et le rapport PaO₂/FiO₂ en post opératoire immédiat et à 48h post opératoire



On retrouvait une corrélation statistiquement significative entre l'Interleukine-1 β et le nombre de jours de réanimations des patients receveurs ($p=0,002$). On retrouvait également une corrélation entre l'Interleukine-1 β et la durée d'hospitalisation en réanimation ainsi qu'avec la durée d'intubation oro-trachéale (Figure 27).

Figure 27 : Taux d'Interleukine-1 β et la durée d'hospitalisation en réanimation à Gauche et la durée d'intubation trachéale à Droite.



D'autre part, les greffons pulmonaires dont les receveurs avaient présenté en post-opératoire un score de DPG à 3 au moins une fois dans les 72 premières heures, étaient les poumons chez qui avaient été mesurés un taux d'Il-1 β significativement plus élevé pendant la PPEV ($p=0,015$).

En revanche, nous n'avons pas mis en évidence d'autres liens entre les cytokines testées et les données cliniques post-opératoires.

Discussion

1- Principaux résultats

L'étude BreathDiag nous a apporté plusieurs résultats.

Tout d'abord nous avons eu la confirmation de la **faisabilité** de monitorer le COe de façon fiable, continue et non invasive durant les procédures de PPEV humaines grâce au ProCEAS® médical.

Concernant les résultats à proprement parler :

Le taux de COe était corrélé à **la durée de la première ischémie froide** lors de l'ouverture des poumons et cette corrélation disparaissait à distance du début des procédures de PPEV. En revanche la raison d'entrée en PPEV (critères élargis ou catégorie III de Maastricht) ne semblait pas influencer le taux de COe et les greffons ont pu être évalués de façon similaire.

Sur la durée de l'étude, seulement deux greffons n'ont pas été acceptés, néanmoins le COe semblait être un **marqueur pronostique d'acceptation des greffons** et ce **de façon précoce**, dès la fin de premier recrutement. En effet, il s'est dégagé une tendance nette à un taux de COe plus élevé pour les greffons non acceptés (N.S., $p=0,068$).

Nous avons trouvé une **limite à l'interprétation du COe**. La présence de **sang dans les voies aériennes** biaise probablement l'interprétation du COe les taux de COe étant anormalement élevés dans ces conditions.

Nous avons pu mettre en évidence des liens entre le taux de COe et certains marqueurs de qualité des greffons habituellement testés (résistance vasculaire pulmonaires (N.S. $p=0,062$), consommation de glucose ($p=0,04$, taux de lactates $p=0,03$) ce qui conforte l'hypothèse que le **COe est un potentiel marqueur pronostique de la qualité des greffons**.

Nous avons proposé un **seuil diagnostique de COe à 0,235 ppm** pour classer les greffons ayant une production élevée ou basse de CO en fin de premier recrutement.

Enfin le **COe per PPEV est probablement un marqueur pronostique de l'évolution des patients receveurs à court terme**. Il y avait un lien statistiquement significatif entre le COe en fin de premier recrutement et les capacités d'échange gazeux à 24 heures chez le receveur ($p=0,029$).

Tous les patients ayant reçu un greffon présentant un taux de **COe élevé** en fin de premier recrutement ont tous présenté un **score DPG à 3 dans les 72 premières heures** (N.S. $p=0,088$).

De même les durées de séjour en réanimation semblaient plus longues pour les patients ayant reçu des poumons ayant un taux de COe élevé (N.S., $p=0,060$).

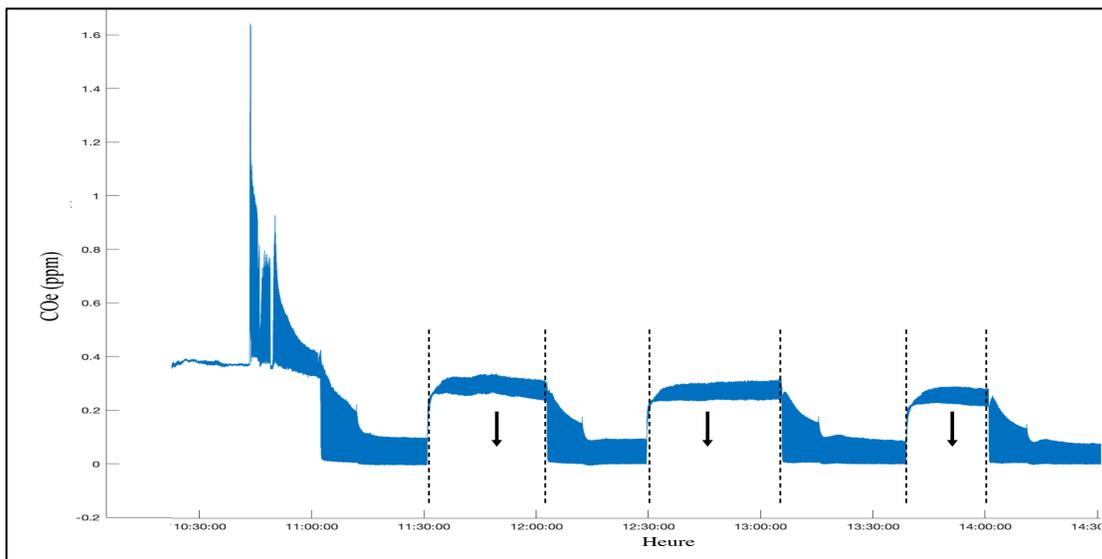
2- Description des mesures de COe

A- Interprétation des courbes de COe et influence des paramètres ventilatoires

Les changements des paramètres ventilatoires avaient un impact direct sur les taux de COe. La particularité des courbes de COe et leur aspect en « créneaux » a déjà été présentée dans la partie méthode (4.C.). Succinctement, les variations de CO apporté aux poumons lors des changements de phase et injecté dans le circuit ventilatoire (CO exogène provenant de l'air ambiant capté par l'XPS™ lors de phases inter-recrutement à 21% de FiO₂) sont responsables de l'aspect en « créneau » des courbes. Pour rappel le CO exogène était neutralisé par la soustraction des valeurs télé-inspiratoires aux valeurs télé-expiratoires permettant d'obtenir la valeur de COe exacte.

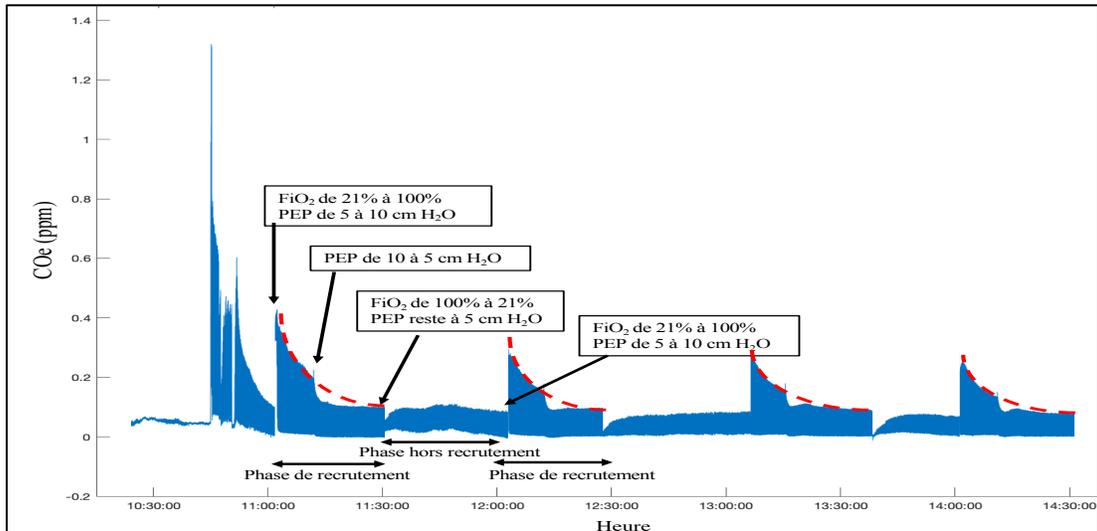
La Figure 34 représente un exemple de production de COe d'un greffon ayant un taux de COe moyen et accepté pour la transplantation. La Figures 35 correspond à la courbe de COe de cette même procédure après avoir artificiellement soustrait les valeurs basales de CO exogène lors des phases de ventilation à 21%, ramenant toutes les valeurs télé-inspiratoires à zéro, la Figure 36 est un autre exemple de « remise à zéro » pour une autre procédure.

Figure 34 : Exemple de courbe de COe d'un greffon ayant un taux de COe moyen et accepté à la transplantation avant « remise à zéro »



Courbe standard d'une procédure de PPEV d'un poumon « non hémoptoïque » et accepté (4 phases de recrutements)

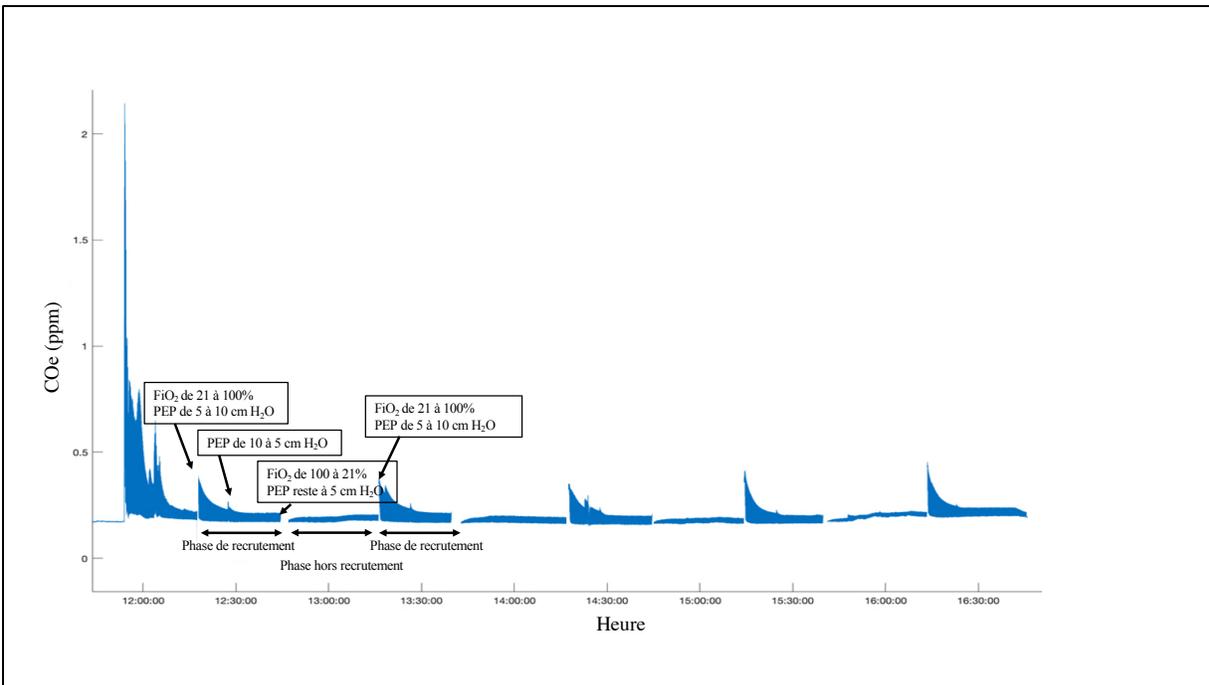
Figure 35 : Exemple 1 de courbe de COe « après remise à zéro » de la courbe présentée en Figure 34



Pour cet exemple de courbe, le CO « exogène » a été soustrait artificiellement permettant de redescendre les courbes pendant les phases hors recrutement.

On note des modifications de la courbe de COe à chaque modification des paramètres ventilatoires (FiO₂ et PEP). En rouge pointillés des courbes suivant la décroissance de COe engagée au début des phases de recrutement. Malgré la cassure de la décroissance de COe lors de la diminution de la PEP les valeurs de COe en fin de phase de recrutement correspondent à celles sous-tendues par la courbe de décroissance.

Figure 36 : Exemple 2 de courbe de COe après "remise à zéro", valeur de COe stable atteint avant changement de PEP



Pour plus de lisibilité la fin de la procédure a été coupée

Pour cet exemple, lors des phases de recrutement la décroissance exponentielle du COe est proche du plateau avant le changement de PEP et la baisse de la PEP de 10 à 5 cm H₂O a peu d'influence sur les taux de COe.

1- Influence des variations de la PEP sur le COe

Pendant les phases de recrutement, avant la modification de PEP le COe décroissait de manière exponentielle.

Pour les greffons qui n'avaient pas encore atteint leur plateau stable de COe, lors de la baisse de la PEP de 10 à 5 cm H₂O on retrouvait une cassure brutale de la décroissance de COe. En traçant des courbes de décroissance suivant la courbe de décroissance initiale, le COe suggéré par ces courbes correspondait au COe mesurés en fin de phase de recrutement.

En revanche pour les poumons ayant déjà atteint leur taux de COe basal la baisse de PEP n'avait que peu d'influence sur le taux de COe (Figure 36).

L'augmentation de PEP, entraînant un meilleur recrutement alvéolaire, permettait probablement une meilleure élimination du CO contenu et stocké dans les alvéoles.

L'effet inverse se produisait probablement lors de la diminution de la PEP expliquant la baisse brutale de COe.

L'exposition courte des poumons à des PEP comprises entre 5 et 10 cm H₂O n'est probablement pas à l'origine de lésions épithéliales inflammatoires et n'explique pas l'augmentation de COe^{[76],[77]}.

Certains auteurs décrivent même un effet protecteur de la PEP sur les lésions pulmonaires inflammatoires qui auraient donc tendance à faire diminuer le taux de COe mais là encore les effets à très court terme ne se font probablement pas ressentir sur la production de COe^[78].

Au total, cela laisse penser à un effet mécanique par recrutement alvéolaire prédominant de l'influence de la PEP sur le COe.

2- Influence des variations de FiO₂ sur le COe

Il y avait une augmentation rapide et importante des taux de COe lors du passage de 21% à 100% de FiO₂. Cette augmentation de COe lors de l'augmentation de FiO₂ a déjà été largement décrite chez des patients^{[79],[80],[81],[82]}. Nous avons également retrouvé cette augmentation brutale dans notre étude sur volontaires sains^[83].

L'augmentation de COe lors de l'augmentation de FiO₂ était probablement en grande partie due à l'effet compétitif de l'oxygène à haute concentration sur l'hème au niveau de ses récepteurs libérant les molécules de CO.

L'action pro-inflammatoire de l'hyperoxie (FiO₂ 100%) est également largement décrite entraînant une augmentation de production de l'Hème Oxygénase-1 ce qui pourrait entraîner une augmentation de COe^[84]. Cependant, les durées d'expositions sont probablement trop courtes pour que l'hyperoxie ait un effet sur la production de COe. De plus, la décroissance progressive des taux de COe lors de l'exposition des poumons à une FiO₂ de 100% n'est pas non plus en faveur de cette hypothèse.

La baisse brutale, bien que peu intense, du COe en fin de recrutement ou seule la FiO₂ est modifiée est également plutôt en faveur de l'explication d'effet compétitif de l'oxygène sur l'hème. En effet, il est peu probable que la baisse de FiO₂ entraîne une baisse de la concentration de l'hème oxygénase sa demi-vie étant de plusieurs heures^{[85],[86]}.

Au début des phases de recrutement il y avait probablement **un effet mixte** expliquant l'augmentation brutale du COe due à l'augmentation de la FiO₂ par effet compétitif de l'oxygène sur l'hème et de la PEP et par un meilleur recrutement alvéolaire.

3- Production continue de COe et stabilisation des valeurs de COe

Les poumons produisaient du CO tout au long de la requalification et les taux mesurés lors des phases stables correspondaient bien à la **production de CO en temps réel**.

En effet, si le COe mesuré ne provenait pas de la production pulmonaire en temps réel, la concentration diminuerait progressivement dans le temps dû au « lavage des poumons » lors de la ventilation, l'air étant renouvelé par le respirateur.

Les paramètres de perfusion sont inchangés durant la procédure de PPEV à partir de l'obtention du débit cible. La perfusion étant stable durant toute la procédure et standardisée pour chaque greffon, elle n'a probablement pas d'influence sur les taux de COe mesurés. La température était progressivement augmentée puis était également inchangée à partir de 37°C et donc n'influencait pas non plus le COe. Lors de chaque changement de réglage ventilatoire, il y avait une variation du taux de COe qui tendait vers une stabilisation des valeurs en fin de chaque phase (lorsque les paramètres de l'XPS™ étaient fixés et inchangés) correspondant à la production pulmonaire de CO.

Les paramètres ventilatoires et de perfusion étant protocolisés et reproductibles pour chaque procédure de PPEV, le taux de COe, après stabilisation était propre à chaque poumon et non biaisé par des modifications de réglage d'une procédure à l'autre.

Enfin, les taux de COe des poumons isolés étaient environ cent fois inférieurs aux taux que nous avons mesurés chez les volontaires sains. Les poumons isolés étant de fait dépourvus de production systémique, il est logique que les taux retrouvés soient bien inférieurs.

Ce sont probablement **en fin de phase de recrutement, en condition stable, que les taux de COe sont les plus interprétables, correspondant à la production en temps réel des poumons**, après « lavage alvéolaire » du CO stocké dans les poumons **et non influencés par les modifications de réglage ventilatoire.**

De plus, il s'agit de moments d'évaluation privilégiés des greffons par l'équipe chirurgicale (avec notamment la réalisation des gaz du sang en fin de phase de recrutement).

B- Interprétation du COe en fonction du donneur

1- Anamnèse et motif d'entrée en procédure de PPEV

Dans notre cohorte la plupart des poumons à « critères élargis » venait de patients cérébro-lésés.

Les patients cérébro-lésés présentent fréquemment des lésions respiratoires associées [87],[88]. Outre les pneumopathies acquises sous ventilation, les patients cérébro-lésés sont exposés à des complications pulmonaires de type SDRA ou plus spécifiquement des œdème pulmonaires neuroniques^[89].

L'origine des lésions pulmonaires serait double^[90]. D'une part, les décharges cathécolaminergiques et les dérèglements du système nerveux autonome secondaires à la mort encéphalique et à l'augmentation de la pression intracrânienne seraient à l'origine de lésions inflammatoires systémiques induisant des lésions pulmonaires. Le système nerveux lésé serait à l'origine d'une augmentation de production de protéines inflammatoires^{[91],[92]} (interleukines). D'autre part, les poumons subiraient un phénomène « blastique »^[93], c'est à dire des lésions de la membrane alvéolo-capillaire pulmonaire qui seraient induites par une augmentation brutale de pression artérielle secondaire à l'augmentation de la pression intra-crânienne.

Nous avons donc testé si les patients cérébro-lésés avaient des taux de CO_e plus élevés que les autres. Nous n'avons pas retrouvé de différence, nous n'avons donc pas fait de sous-groupe pour les analyses.

Certains auteurs ont décrit les poumons provenant de donneurs « DDAC-M3 » comme étant globalement de meilleure qualité que les greffons « à critères élargis ». Dans un essai sur modèle porcine, Neyrink *et al.* [94] avaient comparé deux groupes de poumons. Après avoir infligé une mort encéphalique par traumatisme crânien, pour un groupe, mais gardant une activité cardiaque, les organes avaient été conservés au froid pendant cinq heures. Pour l'autre groupe, le décès était causé par fibrillation ventriculaire puis les poumons exposés à une heure d'ischémie chaude et enfin refroidis quatre heures. Les poumons des porcs cérébro-lésés présentaient des altérations des résistances vasculaires et des pressions de plateau plus élevées par rapport à ceux ayant subi une heure d'ischémie chaude. En revanche ils ne retrouvaient pas de différence sur la formation d'œdème pulmonaire ni sur le rapport PaO₂/FiO₂. Les auteurs concluaient à un meilleur état fonctionnel des poumons exposés à une heure d'ischémie chaude encourageant donc l'utilisation de poumons provenant de patients donneurs « DDAC-M3 ». D'un autre côté pour pouvoir transplanter les poumons « DDAC-M3 », ils doivent être optimisés en PPEV (obligation législative en France).

Afin d'évaluer si les poumons provenant d'un des deux groupes avaient des taux de CO_e systématiquement plus élevés, nous avons donc testé les taux de CO_e. **Les taux de CO_e étaient comparables quelle que soit la raison d'entrée des greffons en PPEV** (« critères élargis » ou « DDAC-M3 »). Cette donnée nous paraît intéressante car si le CO_e est bien un marqueur de l'état inflammatoire des poumons, cela plaide en faveur d'entrée en procédures de PPEV pour tous les greffons d'origine DDAC-M3 devant leur probable état inflammatoire similaire aux poumons à « critère élargi » en début de procédure.

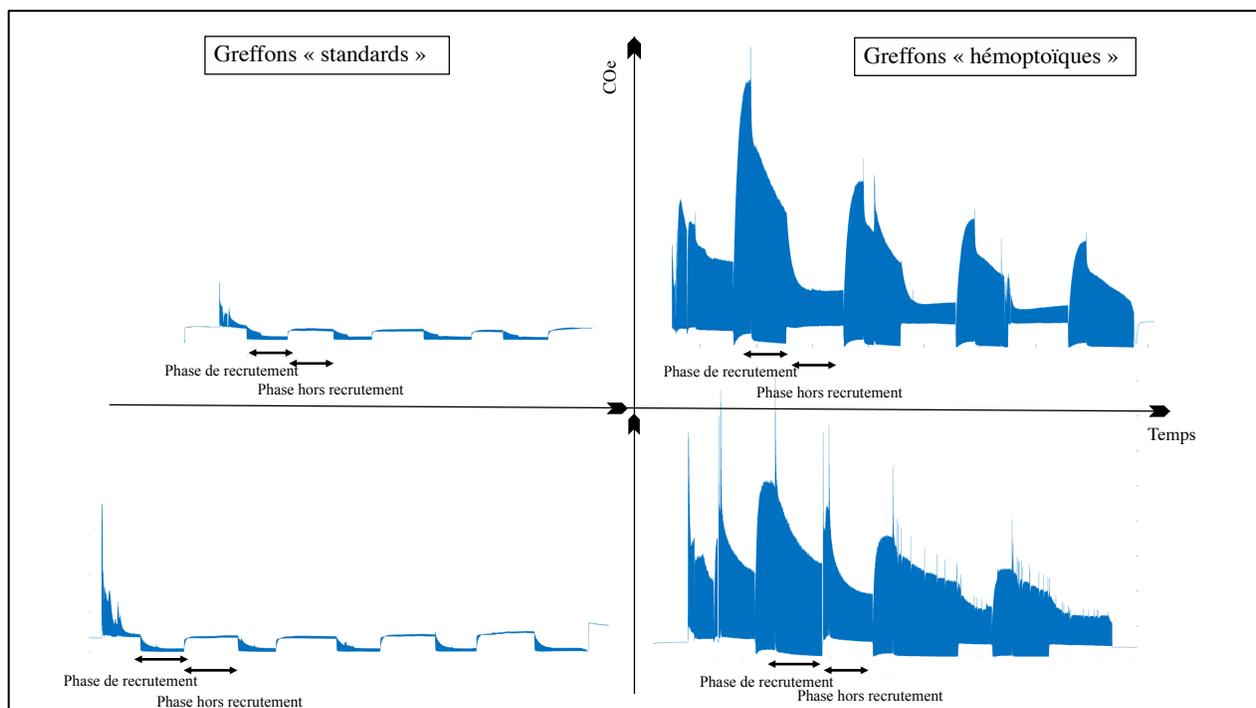
Devant ces absences de différence de CO_e nous avons interprété les résultats indépendamment de la raison d'entrée des poumons en procédure de PPEV et n'avons pas fait de sous-groupe ni pour les patients cérébro-lésés ni en fonction de l'origine « critères élargis » / DDAC-M3.

2- Saignement dans les voies aériennes avant prélèvement

L'autre découverte très intéressante de l'analyse du COe en fonction du donneur concernait la présence de sang dans les voies aériennes.

Nous avons mis en évidence que la présence de sang visualisable en bronchoscopie avant prélèvement, faussait les résultats de COe donnant des valeurs très élevées et aberrantes. La Figure 37 représente des courbes de greffons non hémoptoïques en comparaison à des greffons présentant du sang dans les voies aériennes.

Figure 37 : Exemple de courbes de COe de poumons avec et sans sang dans les voies aériennes



*A gauche deux exemples de courbes de CO de poumons sans saignement,
À droite deux courbes de COe de poumons présentant du sang dans les voies aériennes.
Les échelles de temps et de COe sont comparables pour les courbes à gauche et à droite.
Les taux de COe des greffons « hémoptoïques » sont plus de dix fois supérieurs aux greffons « non hémoptoïques » et des taux de COe qui n'ont toujours pas atteint la stabilité en fin de phase de recrutement.*

Ces taux de COe extrêmement élevés étaient probablement dûs à la dégradation de l'hème contenue dans les hématies du sang dans les voies aériennes. L'hème dégradée est à l'origine de la production de CO. La grande concentration d'hème dans les globules rouges explique probablement qu'en présence de sang les taux de COe soient très élevés indépendamment de l'état inflammatoire des poumons. Cette production de CO secondaire à l'hémolyse est d'ailleurs connue et décrite de longue date^{[95],[96]}. Il est également possible que la présence de sang soit le reflet d'autres lésions qui entraînent une plus grande inflammation. Cependant les 3 poumons ayant eu du sang en bronchoscopie ont été transplantés et les receveurs n'ont pas présenté de complications particulières. Il est également intéressant de noter que ces poumons n'avaient pas non plus d'augmentation de leur taux de protéines inflammatoires dans le perfusé.

Nous en avons conclu que le monitoring du COe n'est pas possible lorsqu'il y a du sang dans les voies aériennes visualisées en bronchoscopie et qu'il s'agit d'une limite au monitoring du COe.

Nous avons profité d'une autre étude sur poumons porcins pour tester cette hypothèse. Nous avons administré 50 ml de sang frais dans des poumons et avons testé les taux de COe (données non publiées). Nous n'avons pas retrouvé d'augmentation massive du taux de COe après l'ajout de sang. Il est possible que la faible durée entre l'ajout de sang et la mesure de COe n'ait pas permis la dégradation de l'hémoglobine et de l'hème responsable de l'augmentation de COe. Cette hypothèse sera à confirmer par d'autres mesures.

Nous n'avons **pas trouvé d'autre relation significative entre les caractéristiques des donneurs et les valeurs de COe**. Nous avons testé l'anamnèse récente (incluant la survenue d'un arrêt cardio-circulatoire), la durée de réanimation, la présence d'anomalie radiologique, de contusion ou d'atélectasie, la numération des globules blancs, l'âge et le sexe des donneurs ou encore la présence d'arguments pour une pneumopathie.

Il nous paraît donc que le monitoring du COe lors des procédures de PPEV est possible et fiable quelle que soit la raison d'entrée en PPEV et indépendamment de l'anamnèse récentes. La seule limite que nous avons retrouvée ne permettant pas l'analyse du COe est la présence de sang dans les voies aériennes.

C- Taux de COe et durée de première ischémie froide

Il y avait une corrélation entre la durée de première ischémie froide et le taux de COe lors de la phase « d'ouverture » des poumons. Les poumons produisent probablement du CO tout au long de la première phase d'ischémie froide, bien qu'ils ne soient pas perfusés et refroidis. Le taux de COe au début de la ventilation serait donc d'une part dépendant de la quantité produite par unité de temps (probable reflet de l'inflammation) et également de la durée totale de cette première ischémie froide.

D'autre part, le taux de COe à l'ouverture est probablement également influencé par plusieurs facteurs et ne reflète probablement pas que l'état inflammatoire du greffon.

Il a déjà été établi par de nombreuses équipes que le COe est en rapport avec l'état inflammatoire global et systémique des patients^{[52],[58],[97]}

Nous avons montré une corrélation sur modèle porcin entre la durée d'ischémie froide, le COe et l'état inflammatoire des poumons (protéines inflammatoires)^[73] qui se maintenait dans le temps. Les durées d'ischémie que nous infligeons aux poumons étaient bien plus importantes (vingt-quatre heures soit quatre fois supérieures que la plus grande durée de première ischémie froide lors des procédures de PPEV sur poumon humain). Il est probable que la durée de première ischémie froide entraîne des lésions inflammatoires (secondaires à l'ischémie reperfusion) mais que les faibles durées n'aient pas de retentissement majeur sur l'état inflammatoire des greffons.

Le CO systémique produit est éliminé au niveau des poumons. Ainsi, le taux de COe retrouvé lors de la « phase d'ouverture » est probablement également dépendant de la production systémique du donneur avant le prélèvement d'organe, stocké dans les poumons. Ce CO « systémique » du donneur est probablement progressivement lavé lors de la ventilation au cours de la PPEV avant que le COe ne devienne le reflet de la production du greffon pulmonaire seule.

On ne retrouvait plus de corrélation entre cette durée de première ischémie froide et le taux de COe sur le reste des procédures notamment lors des phases de recrutement.

Dans tous les cas, si des lésions sont engendrées par cette première ischémie froide, elles sont à évaluer au même titre que les autres lésions inflammatoires pulmonaires pour l'analyse des greffons, pour la décision de passage en greffe et pour l'aide à la gestion péri-opératoire des patients greffés.

Au total il est probable que le taux de COe à « l'ouverture » ne soit pas interprétable de façon brute pour l'évaluation des greffons car dépendant du temps de première ischémie froide et de la quantité de COe systémique résiduel du donneur.

En revanche, les valeurs de COe à distance du début de la ventilation (une fois que les poumons sont « lavés » du CO produit et stocké durant la première ischémie froide et du CO d'origine systémique du donneur) sont probablement celles utiles à l'analyse de l'état inflammatoire des poumons.

3- Le monoxyde de carbone exhalé comme marqueur pronostique

A- Taux de COe et acceptation des greffons

Une de nos hypothèses était que les greffons qui seraient récusés à la greffe auraient des taux de COe plus élevés que les autres et ainsi que le taux de COe pourrait être une aide à la décision d'acceptation des greffons.

Malheureusement il n'y a eu que deux greffons récusés sur les 21 procédures.

Il y avait une tendance à un taux de COe plus élevé pour les poumons récusés mais cette différence n'était pas statistiquement significative ($p=0,068$). Cette tendance au COe élevé pour les greffons récusés était présente précocement, dès la fin du premier recrutement.

Une autre donnée intéressante était qu'aucun greffon avec un taux très bas de COe n'a été récusé.

Si ces données venaient à se confirmer, elles pourraient permettre d'apporter une aide pour la décision d'acceptation des greffons dès la fin de la première phase de recrutement. Cela pourrait ainsi permettre d'anticiper rapidement l'organisation péri-opératoire aidant notamment pour la préparation du patient à transplanter (psychique, physique et matérielle) en cas de taux de COe bas. Au contraire un taux de COe élevé inciterait à la temporisation et à la poursuite de l'optimisation pulmonaire.

Ainsi, l'évaluation du taux de COe pourrait entrer dans la composition d'un score d'aide à l'acceptation des greffons.

Au total, bien que cette donnée soit évidemment à confirmer, il est possible **qu'un taux de COe très bas en fin de premier recrutement, associé aux autres marqueurs habituellement testés, pourrait aider à anticiper l'évolution vers la greffe.**

En revanche en cas de CO élevé en fin de premier recrutement, en dehors d'une cause évidente de type saignement dans les voies aériennes, la greffe serait à reconsidérer ou le greffon à tester plus longuement.

B- COe, rapport PaO₂/FiO₂ et compliances pulmonaires per PPEV

Il n'y avait pas de liens entre le taux de COe et le rapport PaO₂/FiO₂ lors des phases de recrutement durant les procédures de PPEV.

Pour la plupart des auteurs les capacités d'échange gazeux per PPEV sont un bon reflet de la qualité des poumons et aident à la décision de transplanter ou non les poumons^[98]. Certains auteurs ont au contraire récemment remis en cause l'utilisation prédominante de ce rapport pour l'évaluation des greffons^[99].

D'autres auteurs pondèrent les capacités d'hématose chez les donneurs pour l'évaluation des greffons^[100], (incitant à tester les poumons en PPEV). Évidemment cette notion est bien différente de l'évaluation per PPEV mais est un argument modérant l'évaluation de la qualité des greffons par leur seul rapport PaO₂/FiO₂.

Okamoto *et al.* avaient retrouvé une corrélation entre le rapport PaO₂/FiO₂ et les compliances pulmonaires^[102]PPE chez des poumons humains. Pour autant les poumons testés dans cette étude n'ont pas été transplantés, il est donc difficile de conclure à la qualité de marqueurs pronostiques de ces deux paramètres. Ils ne retrouvaient pas de lien entre le rapport PaO₂/FiO₂ et les résistances vasculaires.

Il est possible que l'inflammation pulmonaire évaluée par le taux de COe n'ait pas encore de retentissement sur les capacités d'échange gazeux ni sur la compliance des voies aériennes per PPEV, alors que des lésions inflammatoires s'installent et vont perturber l'hématose en péri et post-opératoire. La capacité d'échange gazeux du greffon pendant la procédure de PPEV n'est pas une fin en soi, l'enjeu étant bien de chercher un marqueur pronostique de l'hématose du receveur, et le devenir global post opératoire. Ainsi l'absence de liens retrouvés entre paramètres respiratoires per PPEV et COe ne doit pas remettre en question l'utilisation du COe en tant que marqueur pronostique.

C- Comparaison aux autres marqueurs habituellement testés

Nous avons testé si des liens existaient entre le COe et les autres paramètres habituellement testés lors de l'évaluation des greffons.

Les lésions secondaires aux mécanismes d'ischémie-reperfusion entraînent classiquement de façon macroscopique un œdème pulmonaire non cardiogénique^{[22],[23],[103]}. La fuite de liquide de perfusion étant un reflet de lésion de la barrière alvéolo-capillaire et de la formation d'œdème pulmonaire, nous nous attendions à retrouver une corrélation entre taux de COe et fuite de liquide de perfusion ce qui n'a pas été le cas. La fuite de liquide était assez compliquée à mesurer de façon fiable pendant les procédures car relevée manuellement avec des graduations peu précises. Il est donc possible que de ce fait ces données soient peu interprétables et que ce soit une des explications à cette absence de corrélation. Il est également possible que les poumons très œdématisés n'arrivent pas à expirer leur CO et qu'il ne soit ainsi pas mesurable dans l'air expiré alors qu'il est produit par l'épithélium pulmonaire. Cette hypothèse pourrait expliquer l'effondrement des taux de COe en fin de procédure pour un des greffons récusés. Avec seulement deux poumons récusés cette hypothèse n'a pas pu être testée.

Il y avait une tendance non significative à un lien entre le taux de COe et les résistances vasculaires. Certains auteurs ont décrit les résistances vasculaires en PPEV comme potentiel bon marqueur d'évolution des patients transplantés^[104]. Bien que non statistiquement significative, cette donnée est concordante avec l'hypothèse que le COe pourrait être un marqueur de qualité des poumons.

Nous avons retrouvé une corrélation entre le taux de COe et la consommation de glucose. L'hème est connue pour être impliquée dans le métabolisme du glucose^{[105],[106]}. Certains auteurs avaient déjà mis en avant une corrélation entre la consommation de glucose et la qualité des poumons sur modèle porcin^[107]. Brièvement dans cet essai sur modèle porcin, Valenza *et al.* ont analysé la consommation de glucose de huit paires de poumons per PPEV et les ont classées en deux groupes de quatre (haute ou basse consommation de glucose). Dans cet essai l'augmentation d'apport d'oxygène aux poumons n'augmentait pas leur consommation de glucose. En revanche, une haute consommation de glucose était associée à une dégradation de l'état pulmonaire mesurée par les performances d'oxygénation des greffons et à la survenue d'œdème pulmonaire.

Cette augmentation de consommation de glucose serait en rapport avec une augmentation du métabolisme du poumon en rapport avec les processus actifs de réabsorption de l'œdème pulmonaire^{[108],[109]} et la stimulation de la pompe Na/K ATPase. Il n'est donc pas surprenant qu'un taux de COe élevé, s'il est bien le reflet de l'inflammation du tissu pulmonaire soit associé à une plus grande utilisation du glucose nécessaire à la lutte contre l'œdème alvéolaire.

Certains auteurs ont décrit le passage à la glycolyse aérobie vers la glycolyse anaérobie lors de l'activation de l'hème oxygénase. La glycolyse anaérobie consomme plus de glucose et produit plus de lactates pour la même quantité d'ATP produite^[110].

Nous avons également retrouvé une corrélation significative entre le COe et le taux de lactates.

Les lactates, reflets de la consommation de glucose en situation anaérobie, sont de longue date décrits comme marqueurs pronostics dans de nombreuses circonstances principalement lors de phénomènes hypoxiques^[111]. Il a également déjà été rapporté une augmentation de production de lactates par le tissu pulmonaire inflammatoire^[112] (patients souffrant de SDRA).

Plus récemment, Koike *et al.* avaient étudié le ratio lactates/pyruvate en PPEV^[111].

Ils avaient montré une augmentation du taux de lactates de tous les poumons étudiés sur la durée de PPEV (28 procédures cliniques et 8 procédures expérimentales).

Ils avaient retrouvé une corrélation entre les taux de lactates et les pressions de pointe en *Ex-Vivo*. En revanche ils n'avaient pas retrouvé de corrélation avec les capacités d'échange gazeux pulmonaires lors des procédures de PPEV ni en post greffe, ni avec l'évolution clinique des receveurs. Les auteurs concluaient que les lactates élevés ne devaient pas décourager à la transplantation si les autres marqueurs d'acceptabilité des poumons étaient rassurants.

L'évaluation des greffons grâce au taux de lactates est peu utilisée. Contrairement à la production de lactates, la production de CO n'est pas dépendante uniquement des mécanismes de respiration cellulaires mais également médiée par les protéines inflammatoires via l'HO. Ainsi le COe est probablement un meilleur reflet de l'état inflammatoire des poumons que le taux de lactates.

Au total le COe était corrélé avec des marqueurs indirects de l'état inflammatoire pulmonaire (consommation de Glucose et taux de Lactates).

D- COe et évolution des receveurs post transplantation

Bien que non significatif, le taux de COe en fin de premier recrutement semblait lié aux capacités d'échange gazeux à 24 heures post opératoire (N.S. $p=0,052$).

Tous les greffons ayant un taux de COe élevé ont présenté un score de DPG 3 dans les 72 heures (N.S. $p=0,088$).

Van Muylem *et al.* ont déjà mis en évidence que l'augmentation de COe en post transplantation était associée à une augmentation du risque de dysfonction primaire du greffon^[69]. Il semble que cette relation entre COe et DPG pourrait exister dès le stade précoce de PPEV.

Une autre donnée particulièrement intéressante était **la tendance (N.S.) à un lien entre le taux de COe et la durée de séjour en réanimation ($p=0,06$) et sur la durée totale en service de soins intensifs ($p=0,07$)** (réanimation et soins intensifs cumulés).

Bien que non significatives, ces tendances sont des arguments pour l'utilité du COe pour l'évaluation des greffons per PPEV pour l'aide à la gestion post-opératoire immédiate des patients transplantés.

Si ces données venaient à se confirmer un taux de COe élevé en PPEV pourrait alerter sur la nécessité de surveillance plus rapprochée du receveur et le support ventilatoire à leur apporter.

Un taux bas de COe pourrait d'un côté orienter vers une extubation rapide du receveur alors qu'au contraire un taux de COe élevé pourrait alerter sur le risque de mauvaise capacité d'échange gazeux à court terme et ainsi orienter vers la nécessité d'une surveillance accrue de l'état respiratoire. Nous avons d'ailleurs retrouvé une légère tendance non significative à des extubations plus précoces chez les patients ayant reçu des poumons ayant des taux de COe bas.

E- Seuil de COe en fin de premier recrutement

Nous avons proposé un seuil de valeur de COe de 0,235 ppm pour définir les poumons comme ayant un taux de COe élevé ou bas. Avec ce seuil pour classer les poumons, une tendance se dégageait sur l'évolution pour les receveurs à court terme. Évidemment ce seuil basé sur un petit effectif sera à confirmer.

F- Analyse des marqueurs biologiques

Nous n'avons pas mis en évidence de lien entre les taux de COe et les cytokines inflammatoires per PPEV, ni entre les taux de cytokines et l'acceptation des greffons.

Nous avons retrouvé une corrélation entre le TNF- α et la consommation de glucose ainsi que la production de lactates, cohérentes avec le mécanisme physiopathologique sous-jacent d'une possible activation de la pompe Na/K ATPase en cas de formation d'œdème alvéolaire. Le taux de COe était lui aussi corrélé statistiquement avec la consommation de glucose et la production de lactates. Nous n'avons cependant pas retrouvé de lien statistiquement significatif entre le COe et le TNF- α . Cette absence de lien statistique peut être dû au faible effectif de l'étude mais aussi à des mécanismes de production cellulaires différents n'intervenant pas forcément au même moment.

D'autre part, la concentration d'Il-1 β per PPEV semblait corrélée avec le devenir post opératoire des patient transplanté (durée d'intubation oro-trachéale, durée de séjour en réanimation, dysfonction primaire du greffon).

La principale limite à l'analyse de ces cytokines inflammatoires était l'absence de standardisation sur le moment de prélèvement des échantillons. La durée écoulée entre le début de la perfusion pulmonaire et le moment de recueil du liquide de perfusion n'était pas prédéfini.

Nous n'avons recueilli du liquide de perfusion uniquement lorsqu'il était « jeté » par l'équipe chirurgicale, de sorte à n'avoir aucun retentissement sur le déroulement des procédures de PPEV.

Ainsi, pour certaines procédures, nous n'avons recueilli qu'un seul échantillon de liquide de perfusion, lors de la fin de la procédure de PPEV. Pour d'autres procédures plus longues, l'équipe chirurgicale effectuait un renouvellement d'une partie du liquide de perfusion. Nous avons alors

pu recueillir deux échantillons de liquide, un lors du renouvellement de liquide et à la fin de la procédure.

Pour quatre procédures, nous avons pu recueillir deux échantillons de liquide. Les concentrations des cytokines varient du simple au triple entre la première et la deuxième analyse. Pour trois d'entre elles, l'évolution des concentrations était croissante et pour la quatrième le taux était décroissant. Cette observation souligne bien la variabilité des taux de cytokines au cours du temps pour une même procédure.

Pour les analyses statistiques, lorsque deux prélèvements étaient disponibles, nous n'avons gardé que les valeurs du premier échantillon, de sorte à ce que les durées de perfusion soient relativement comparables. Ainsi, le temps entre le début de la perfusion et le recueil d'échantillon variait entre deux et quatre heures pour l'ensemble des greffons et les échantillons n'avaient pas subi de dilution. Devant la grande variabilité des concentrations en fonction du temps pour une même procédure, il semble évident que le moment du recueil du liquide devrait être standardisé.

Au total, ces considérations nous interrogent sur la fiabilité des résultats des analyses des cytokines et leur interprétation.

Concernant la comparaison des protéines inflammatoires aux données cliniques des patients receveurs, la corrélation retrouvée entre l'IL-1 β , le rapport PaO₂/FiO₂ à 24h et le nombre de jours de réanimation semble intéressante.

Andreasson *et al.* avaient déjà mis en avant l'intérêt de cette protéine montrant une corrélation inverse entre sa concentration à 2 h de PPEV et l'oxygénation des receveurs à 24 h^[114]. Dans cette même étude de faisabilité les auteurs avaient en revanche retrouvé une différence de concentration entre les greffons acceptés à la transplantation et ceux récusés contrairement à nos résultats. Contrairement à nos résultats toujours, les auteurs trouvaient également une corrélation entre le taux d'IL-8 et l'acceptation des greffons. Enfin ils concluaient qu'une association entre IL-8 et IL1- β était probablement utile pour sélectionner les greffons.

La même équipe réaffirmait dans une autre étude, le potentiel diagnostique de IL1- β (et du TNF- α) de façon précoce que ce soit pour prédire le succès des procédures de PPEV ou le devenir clinique à court ou moyen terme des patient greffés^[115].

Dans une autre étude en PPEV humaine Machuca *et al.* retrouvait l'IL-8 à une heure comme meilleur marqueur d'évolution clinique (basé sur le score DPG). Il n'avaient en revanche pas mis en évidence de lien entre l'acceptation ou non des greffons et des cytokines parmi celles que nous avons également testés. Dans cette étude, les auteurs avaient par ailleurs bien mis en évidence la variation des concentrations de cytokines au cours du temps^[116]. La variation des concentration des cytokines au cours du temps avait également était mis en évidence par Sadaria *et al.*^[117].

Dans une autre étude Cypel *et al.* avait également montré des taux d'IL1- β et de TNF- α chez les poumons non acceptés pour la transplantation (hors PPEV)^[118].

Au total, nos résultats semblent confirmer l'intérêt de l'IL1-béata et le TNF-alpha dans l'évaluation des greffons évalués per PPEV conformément aux études publiées par d'autres équipes^{[114][119]}. L'IL1-béata pouvant éventuellement être envisagée comme une possible cible thérapeutique pour améliorer l'état des greffons testés par PPEV^[115]. Nous n'avons en revanche pas mis en évidence l'intérêt de L'Il-8 précédemment décrit.

L'absence de standardisation sur le recueil d'échantillon et le faible effectif expliquent peut-être le manque de liens entre le COe et l'IL1- β per PPEV dans notre étude, alors même que ces deux marqueurs semblaient liés à l'évolution post opératoires des receveurs.

Dans tous les cas, il est important de rappeler que l'un des avantages majeurs du COe est sa disponibilité en temps réel contrairement aux protéines inflammatoires qui nécessitent des analyses délocalisées et souvent longues en laboratoires et dont les résultats ne peuvent être exploités en temps réel durant les procédures de PPEV.

G- COe comme marqueur de lutte du tissu pulmonaire

Il semble qu'à court terme un CO élevé et de façon précoce soit en faveur d'une moins bonne qualité du greffon (poumons non transplantés malgré le taux de COe en aveugle pour la décision). Un taux de COe élevé semblait également être un marqueur de mauvaise évolution chez le receveur (durée plus élevée de réanimation, moins bonne hématoxémie post opératoire et score DPG).

Cependant, le COe n'est probablement pas qu'un marqueur passif d'inflammation suite aux phénomènes d'ischémie-reperfusion en faveur de la mauvaise qualité des greffons. Il peut au contraire être un gazo-transmetteur actif contre ces processus inflammatoires^{[110],[120]}.

Dans cette hypothèse un taux de COe élevé pourrait être le reflet au contraire d'une meilleure défense et d'une meilleure adaptation de certains poumons aux processus d'agressions inflammatoires. Si le COe se comportait plus comme un gazo-transmetteur actif la cinétique de production du CO pourrait-être intéressante au cours de la PPEV. Dans cette hypothèse les greffons qui produiraient le plus de CO seraient ceux luttant le mieux contre les phénomènes inflammatoire. Nous n'avons pas trouvé d'argument pour étayer cette hypothèse.

Le CO produit pourrait également avoir un rôle direct anti-inflammatoire comme décrit par Dong *et al.* qui ont montré une diminution des lésions d'ischémie reperfusion dans un modèle de PPEV chez le rat^[121]. Les poumons ventilés avec une part de CO présentaient moins de lésions d'ischémie reperfusion.

Van Muylem *et al.* dans une étude sur le COe mesuré en post transplantation, dont les taux étaient corrélés à l'évolution du receveur (dont le score DPG) ^[69] concluait également à la qualité de marqueur passif du COe.

Il est probable que le COe soit à la frontière entre les deux mécanismes, qu'il soit d'une part produit suite aux mécanismes inflammatoires secondaires notamment aux lésion d'ischémie-reperfusion et d'autre part qu'il soit le reflet des capacités de lutte aux agressions inflammatoires.

4- Limites

Nous n'avons pu inclure qu'un nombre limité de greffons, l'étude a été relativement courte et monocentrique limitant la puissance de nos résultats.

Malheureusement, seulement deux greffons ont été récusés à la transplantation sur la période de l'étude rendant difficile la comparaison des greffons en fonction de leur acceptation par l'équipe chirurgicale.

Nous n'avons pas pu suivre les patients après leur première hospitalisation pour évaluer leur devenir à moyen ou long terme. Cette analyse aurait pu être intéressante sur la pertinence du monitoring du COe sur le développement de complications à moyen ou long terme.

Nous avons mis en évidence que la présence de sang dans les voies aérienne perturbe les mesures de COe (trois poumons exclus de l'analyse), cependant un autre greffon avait un taux de COe très élevé sans que nous ne trouvions d'explication. Il est probable que d'autres facteurs confondants limitent l'utilisation du COe. L'analyse des données anamnestiques sont particulièrement dépendantes des fiches cristaux anonymes sur lesquels nous nous sommes basés. D'autres données auraient peut-être pu expliquer ce taux de COe très élevé notamment pour la procédure 18 dont le poumon a été transplanté et dont le devenir du receveur à court terme a été bon.

Nous avons construit une courbe ROC à partir d'une vingtaine de mesure. Notre but était de trancher pour la détermination d'un seuil pour classer les greffons avec un taux de COe élevé et ceux avec un taux de COe bas. Le choix de se baser sur le rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ à 24h est très discutable au niveau clinique. Cependant c'est ce critère qui nous offrait la plus grande aire sous la courbe. Par exemple, si nous utilisions le score DPG à 72h pour construire la courbe ROC le seuil proposé aurait été 0,139 ppm mais avec une AUC bien inférieur. En utilisant ce seuil les poumons auraient été séparés à peu près en deux groupes de taille équivalentes. Des greffons ayant des valeurs COe très proches aurait été séparés, certains étant classés dans le groupe haut et d'autres bas. En utilisant le seuil de 0,235 ppm, il semblait visuellement que les greffons se classaient plus naturellement en deux groupes.

En revanche, nous sommes conscients que choisir un seuil à partir de la $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ à 24 h et ensuite parler lien significatif entre COe et PaO_2 à 24h n'a que peu de sens (prophétie autoréalisatrice...) et que ce résultat a relativement peu d'intérêt. Cependant en utilisant ce seuil, le lien entre COe, durée de réanimation et le score DPG à 72 h semblait bien présent. Ce seuil sera évidemment à réévaluer.

Enfin nous avons déjà abordé les limites de résultats concernant le recueil et l'analyse des marqueurs biologiques dans une partie dédiée.

Le monoxyde de carbone est un gazo-transmetteur suscitant un intérêt croissant comme marqueur dans les processus inflammatoires que ce soit au niveau pulmonaire ou systémique. Le CO est produit de façon ubiquitaire dans l'organisme. Nous avons travaillé sur un organe isolé et de ce fait nous sommes certains que le taux de CO que nous avons analysé est bien produit par le greffon (à distance du début de la reventilation).

Aussi, notre étude était la première étude évaluant de façon précise et continue le monoxyde de carbone sur un modèle isolé de greffons pulmonaires humains durant des procédures de PPEV.

Bien que le nombre de procédures incluses soit assez restreint, le nombre de mesures est en revanche assez important ce qui nous a permis de valider la fiabilité des mesures sur un grand échantillon.

Nous avons pu décrire les phases d'analyse d'intérêt et proposer un seuil pour classer la production de CO comme haute ou basse.

Nous avons pu développer un outil de mesure fiable adapté à un environnement de bloc opératoire et facilement utilisable.

Un des avantages majeurs de ce marqueur est sa disponibilité en temps réel et non invasif étant donc disponible per procédure de PPEV.

Enfin, un des atouts de cette étude était qu'il s'agissait d'une étude multidisciplinaire incluant des chercheurs en physiologie respiratoire, des physiciens, un industriel, des chirurgiens et un centre d'investigation clinique.

L'utilité du COe comme marqueur diagnostic et pronostic nécessite évidemment d'être confirmée par une étude de plus grande ampleur, multicentrique et si possible européenne. Nous aimerions associer la mesure du COe à d'autres gazo-transmetteurs comme le Monoxyde d'Azote.

Conclusion

Le domaine de la greffe pulmonaire et de la PPEV est en plein essor et la recherche de marqueurs d'aide à la décision est essentielle.

Le COe semble être un marqueur d'intérêt, facilement mesurable, de façon non invasive, fiable et continue. Il pourrait s'avérer utile d'une part pour la décision d'acceptation du greffon et ce de façon précoce lors des procédures de PPEV et d'autre part pour l'anticipation du devenir à court terme du patient greffé et ainsi aider à la gestion péri-opératoire.

Le monitoring de COe lors des procédures de PPEV n'a pas pour but de répondre seul à la question de l'acceptation du greffon ni d'être un marqueur seul de gestion péri-opératoire.

En revanche il pourrait être associé à d'autres marqueurs pour arriver à un score soit d'acceptation des greffons soit d'aide à la gestion péri-opératoire des patients transplantés par exemple pour le support ventilatoire ou sur l'anticipation des besoins de soins en réanimation.

Les résultats de notre étude sont encourageants et restent à confirmer par une étude de plus grosse dimension.

Bibliographie

1. Chambers DC, Yusen RD, Cherikh WS, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Khusch K, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Lung And Heart-Lung Transplantation Report-2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2017;36(10):1047–59.
2. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Goldfarb SB, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report—2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *J Heart Lung Transplant* 2015;34(10):1264–77.
3. Singer LG, Chowdhury NA, Faughnan ME, Granton J, Keshavjee S, Marras TK, et al. Effects of Recipient Age and Diagnosis on Health-related Quality-of-Life Benefit of Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192(8):965–73.
4. Weill D, Benden C, Corris PA, Dark JH, Davis RD, Keshavjee S, 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 Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2015;34(1):1–15.
5. 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.
6. Arcasoy SM, Fisher A, Hachem RR, Scavuzzo M, Ware LB, ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part V: predictors and outcomes. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2005;24(10):1483–8.
7. de Perrot M, Bonser RS, Dark J, Kelly RF, McGiffin D, Menza R, 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 Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2005;24(10):1460–7.
8. Snell GI, Yusen RD, Weill D, Strueber M, Garrity E, Reed A, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction, part I: Definition and grading-A 2016 Consensus Group statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2017;36(10):1097–103.
9. Kotloff RM, Thabut G. Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184(2):159–71.
10. Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI, Litzky L, Blumenthal NP, Kaiser LR, et al. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest* 1998;114(1):51–60.
11. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Kern JA, Jones DR, et al. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg* 2002;73(4):1041–7; discussion 1047-1048.
12. Diamond JM, Wigfield CH. Role of innate immunity in primary graft dysfunction after lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2013;18(5):518–23.
13. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(4):490–511.
14. De Perrot M, Sekine Y, Fischer S, Waddell TK, McRae K, Liu M, 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.
15. Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol* 1997;150(5):1773–84.
16. 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.
17. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Cope JT, Laubach VE, 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.

18. Schmid RA, Zollinger A, Singer T, Hillinger S, Leon-Wyss JR, Schöb OM, 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.
19. Shah RJ, Emtiazjoo AM, Diamond JM, Smith PA, Roe DW, Wille KM, 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.
20. Pinsky DJ, Liao H, Lawson CA, Yan SF, Chen J, Carmeliet P, 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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):L52–59.
24. Matthay MA. Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189(11):1301–8.
25. 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.
26. Hunter DN, Morgan CJ, Yacoub M, Evans TW. Pulmonary endothelial permeability following lung transplantation. *Chest* 1992;102(2):417–21.
27. Christie JD, Carby M, Bag R, Corris P, Hertz M, Weill D, et al. 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 Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2005;24(10):1454–9.
28. Christie JD, Kotloff RM, Ahya VN, Tino G, Pochettino A, Gaughan C, et al. The effect of primary graft dysfunction on survival after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(11):1312–6.
29. Kreisel D, Krupnick AS, Puri V, Guthrie TJ, Trulock EP, Meyers BF, et al. Short- and long-term outcomes of 1000 adult lung transplant recipients at a single center. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;141(1):215–22.
30. Whitson BA, Prekker ME, Herrington CS, Whelan TPM, Radosevich DM, Hertz MI, et al. Primary graft dysfunction and long-term pulmonary function after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2007;26(10):1004–11.
31. Falque L, Gheerbrant H, Saint-Raymond C, Quéant S, Camara B, Briault A, et al. [Selection of lung transplant candidates in France in 2019]. *Rev Mal Respir* 2019;36(4):508–18.
32. Yeung JC, Cypel M, Waddell TK, van Raemdonck D, Keshavjee S. Update on donor assessment, resuscitation, and acceptance criteria, including novel techniques--non-heart-beating donor lung retrieval and ex vivo donor lung perfusion. *Thorac Surg Clin* 2009;19(2):261–74.
33. Hook JL, Lederer DJ. Selecting lung transplant candidates: where do current guidelines fall short? *Expert Rev Respir Med* 2012;6(1):51–61.
34. Steen S, Ingemansson R, Eriksson L, Pierre L, Algotsson L, Wierup P, et al. First human transplantation of a nonacceptable donor lung after reconditioning ex vivo. *Ann Thorac Surg* 2007;83(6):2191–4.
35. Ingemansson R, Eyjolfsson A, Mared L, Pierre L, Algotsson L, Ekmehag B, et al. Clinical transplantation of initially rejected donor lungs after reconditioning ex vivo. *Ann Thorac Surg* 2009;87(1):255–60.
36. Steen S, Sjöberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet Lond Engl* 2001;357(9259):825–9.
37. Sanchez PG, Bittle GJ, Burdorf L, Pierson RN, Griffith BP. State of art: clinical ex vivo lung perfusion: rationale, current status, and future directions. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2012;31(4):339–48.
38. Cypel M, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W, et al. Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med* 2011;364(15):1431–40.

39. Luo Q, Zhu L, Wang Y, Wang L, Lv W, Hu J. The Conversional Efficacy of Ex Vivo Lung Perfusion and Clinical Outcomes in Patients Undergoing Transplantation of Donor Lungs by Ex Vivo Lung Perfusion: A Meta-Analysis. *Ann Transplant* 2019;24:647–60.
40. Lindstedt S, Hlebowicz J, Koul B, Wierup P, Sjogren J, Gustafsson R, 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.
41. Divithotawela C, Cypel M, Martinu T, Singer LG, Binnie M, Chow C-W, et al. Long-term Outcomes of Lung Transplant With Ex Vivo Lung Perfusion. *JAMA Surg* 2019;
42. Chan PG, Kumar A, Subramaniam K, Sanchez PG. Ex Vivo Lung Perfusion: A Review of Research and Clinical Practices. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2020;24(1):34–44.
43. Tian D, Wang Y, Shiiya H, Sun C-B, Uemura Y, Sato M, et al. Outcomes of marginal donors for lung transplantation after ex vivo lung perfusion: A systematic review and meta-analysis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2019;
44. Possoz J, Neyrinck A, Van Raemdonck D. Ex vivo lung perfusion prior to transplantation: an overview of current clinical practice worldwide. *J Thorac Dis* 2019;11(4):1635–50.
45. Van Raemdonck D, Neyrinck A, Cypel M, Keshavjee S. Ex-vivo lung perfusion. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 2015;28(6):643–56.
46. Van Raemdonck D, Neyrinck A, Cypel M, Keshavjee S. Ex-vivo lung perfusion. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 2015;28(6):643–56.
47. Cypel M, Yeung JC, Machuca T, Chen M, Singer LG, Yasufuku K, et al. Experience with the first 50 ex vivo lung perfusions in clinical transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;144(5):1200–7.
48. Sage E, Mussot S, Trebbia G, Puyo P, Stern M, Darteville P, et al. Lung transplantation from initially rejected donors after ex vivo lung reconditioning: the French experience. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg* 2014;46(5):794–9.
49. Whitson BA, Nath DS, Johnson AC, Walker AR, Prekker ME, Radosevich DM, et al. Risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131(1):73–80.
50. Ryter SW. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol Rev* 2006;86(2):583–650.
51. Bilban M, Haschemi A, Wegiel B, Chin BY, Wagner O, Otterbein LE. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. *J Mol Med Berl Ger* 2008;86(3):267–79.
52. Ryter SW, Ma KC, Choi AMK. Carbon monoxide in lung cell physiology and disease. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2018;314(2):C211–27.
53. Park Y-Y. Ischemia/reperfusion Lung Injury Increases Serum Ferritin and Heme Oxygenase-1 in Rats. *Korean J Physiol Pharmacol Off J Korean Physiol Soc Korean Soc Pharmacol* 2009;13(3):181–7.
54. Ryter SW, Alam J, Choi AMK. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006;86(2):583–650.
55. Donnelly LE, Barnes PJ. Expression of heme oxygenase in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24(3):295–303.
56. 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.
57. 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.
58. Gajdócsy R, Horváth I. Exhaled carbon monoxide in airway diseases: from research findings to clinical relevance. *J Breath Res* 2010;4(4):047102.
59. Ghosh S, Gal J, Marczin N. Carbon monoxide: endogenous mediator, potential diagnostic and therapeutic target. *Ann Med* 2010;42(1):1–12.
60. Ryter SW, Kim HP, Nakahira K, Zuckerbraun BS, Morse D, Choi AMK. Protective Functions of Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in the Respiratory System. *Antioxid Redox Signal* 2007;9(12):2157–74.

61. Levitt DG, Levitt MD. Carbon monoxide: a critical quantitative analysis and review of the extent and limitations of its second messenger function. *Clin Pharmacol Adv Appl* 2015;7:37–56.
62. Althaus M, Fronius M, Buchäcker Y, Vadász I, Clauss WG, Seeger W, 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.
63. Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, et al. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat Med* 2001;7(5):598–604.
64. 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.
65. Wang W, Wang F, Shi L, Jia X, Lin L. Role of heme oxygenase-1/carbon monoxide system in pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2009;9(2):159–62.
66. Sethi JM, Otterbein LE, Choi AMK. Differential modulation by exogenous carbon monoxide of TNF-alpha stimulated mitogen-activated protein kinases in rat pulmonary artery endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2002;4(2):241–8.
67. Kohmoto J, Nakao A, Stolz DB, Kaizu T, Tsung A, Ikeda A, et al. Carbon monoxide protects rat lung transplants from ischemia-reperfusion injury via a mechanism involving p38 MAPK pathway. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2007;7(10):2279–90.
68. Vos R, Cordemans C, Vanaudenaerde BM, De Vleeschouwer SI, Schoonis A, Van Raemdonck DE, et al. Exhaled carbon monoxide as a noninvasive marker of airway neutrophilia after lung transplantation. *Transplantation* 2009;87(10):1579–83.
69. Van Muylem 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.
70. 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.
71. 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.
72. Maignan M, Briot R, Romanini D, Gennai S, Hazane-Puch F, Brouta A, et al. Real-time measurements of endogenous carbon monoxide production in isolated pig lungs. *J Biomed Opt* 2014;19(4):047001–047001.
73. Maignan M, Gennai S, Debaty G, Romanini D, Schmidt M-H, Brenckmann V, et al. Exhaled carbon monoxide is correlated with ischemia reperfusion injuries during ex vivo lung perfusion in pigs. *J Breath Res* 2017;11(3):036004.
74. Morville J, Kassi S, Chenevier M, Romanini D. Fast, low-noise, mode-by-mode, cavity-enhanced absorption spectroscopy by diode-laser self-locking. *Appl Phys B* 2005;80(8):1027–38.
75. 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.
76. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis* 1988;137(5):1159–64.
77. Kiss T, Bluth T, Braune A, Huhle R, Denz A, Herzog M, et al. Effects of Positive End-Expiratory Pressure and Spontaneous Breathing Activity on Regional Lung Inflammation in Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. *Crit Care Med* 2019;47(4):e358–65.
78. Verhage RJJ, Boone J, Rijkers GT, Cromheecke GJ, Kroese AC, Weijs TJ, et al. Reduced local immune response with continuous positive airway pressure during one-lung ventilation for oesophagectomy. *Br J Anaesth* 2014;112(5):920–8.
79. Schober P, Kalmanowicz M, Schwarte LA, Weimann J, Loer SA. Changes in Arterial Oxygen Tension Correlate with Changes in End-expiratory Carbon Monoxide Level. *J Clin Monit Comput* 2007;21(2):131–5.
80. Zegdi R, Caïd R, Van De Louw A, Perrin D, Burdin M, Boiteau R, et al. Exhaled carbon monoxide in mechanically ventilated critically ill patients: influence of inspired oxygen fraction. *Intensive Care Med* 2000;26(9):1228–31.
81. 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.

82. Schober P, Kalmanowicz M, Loer SA. Effects of Inspiratory Oxygen Concentration on Endtidal Carbon Monoxide Concentration. *J Clin Monit Comput* 2006;20(2):89–94.
83. Brenckmann V, Ventrillard I, Romanini D, Jaulin K, Calabrèse P, Briot R. High inhaled oxygen concentration quadruples exhaled CO in healthy volunteers monitored by a highly sensitive laser spectrometer. *Sci Rep* 2019;9(1):12259.
84. Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress. *Antioxid Redox Signal* 2002;4(4):625–632.
85. Leautaud V, Demple B. Regulation of heme oxygenase-1 mRNA deadenylation and turnover in NIH3T3 cells by nitrosative or alkylation stress. *BMC Mol Biol* 2007;8:116.
86. Srivastava KK, Cable EE, Donohue SE, Bonkovsky HL. Molecular basis for heme-dependent induction of heme oxygenase in primary cultures of chick embryo hepatocytes. *Eur J Biochem* 1993;213(3):909–17.
87. Zygun DA, Kortbeek JB, Fick GH, Laupland KB, Doig CJ. Non-neurologic organ dysfunction in severe traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2005;33(3):654–60.
88. Solenski NJ, Haley EC, Kassell NF, Kongable G, Germanson T, Truskowski L, et al. Medical complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a report of the multicenter, cooperative aneurysm study. Participants of the Multicenter Cooperative Aneurysm Study. *Crit Care Med* 1995;23(6):1007–17.
89. Fontes RBV, Aguiar PH, Zanetti MV, Andrade F, Mandel M, Teixeira MJ. Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. *J Neurosurg Anesthesiol* 2003;15(2):144–50.
90. Mascia L. Acute lung injury in patients with severe brain injury: a double hit model. *Neurocrit Care* 2009;11(3):417–26.
91. Campbell SJ, Perry VH, Pitossi FJ, Butchart AG, Chertoff M, Waters S, et al. Central nervous system injury triggers hepatic CC and CXC chemokine expression that is associated with leukocyte mobilization and recruitment to both the central nervous system and the liver. *Am J Pathol* 2005;166(5):1487–97.
92. Wu S, Fang CX, Kim J, Ren J. Enhanced pulmonary inflammation following experimental intracerebral hemorrhage. *Exp Neurol* 2006;200(1):245–9.
93. Theodore J, Robin ED. Speculations on neurogenic pulmonary edema (NPE). *Am Rev Respir Dis* 1976;113(4):405–11.
94. Neyrinck AP, Van De Wauwer C, Geudens N, Rega FR, Verleden GM, Wouters P, et al. Comparative study of donor lung injury in heart-beating versus non-heart-beating donors. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;30(4):628–36.
95. Sjöstrand T. The Formation of Carbon Monoxide by in Vitro Decomposition of Haemoglobin in Bile Pigments. *Acta Physiol Scand* 1952;26(4):328–33.
96. Hampson NB. Carboxyhemoglobin elevation due to hemolytic anemia. *J Emerg Med* 2007;33(1):17–9.
97. Zhou M, Liu Y, Duan Y. Breath biomarkers in diagnosis of pulmonary diseases. *Clin Chim Acta* 2012;413(21–22):1770–80.
98. Okamoto T, Wheeler D, Liu Q, Quintini C, Hata JS, McCurry KR. Correlation between PaO₂/FiO₂ and airway and vascular parameters in the assessment of cellular ex vivo lung perfusion system. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2016;35(11):1330–6.
99. Yeung JC, Cypel M, Machuca TN, Koike T, Cook DJ, Bonato R, et al. Physiologic assessment of the ex vivo donor lung for transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2012;31(10):1120–6.
100. Whitford H, Kure CE, Henriksen A, Hobson J, Snell GI, Levvey BJ, et al. A donor PaO₂/FiO₂ < 300 mm Hg does not determine graft function or survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2020;39(1):53–61.
101. Okamoto T, Omara M, Ahmad U, Yun J, Bribriescio A, Unai S, et al. Utilization of Marginal Lung Donors With Low PaO₂/FiO₂ Ratio and High Body Mass Index. *Ann Thorac Surg* 2020;109(6):1663–9.
102. Okamoto T, Wheeler D, Liu Q, Quintini C, Hata JS, McCurry KR. Correlation between PaO₂/FiO₂ and airway and vascular parameters in the assessment of cellular ex vivo lung perfusion system. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2016;35(11):1330–6.
103. 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.

104. Sommer W, Salman J, Avsar M, Hoeffler K, Jansson K, Siemeni TN, et al. Prediction of transplant outcome after 24-hour ex vivo lung perfusion using the Organ Care System in a porcine lung transplantation model. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2019;19(2):345–55.
105. Zhang T, Bu P, Zeng J, Vancura A. Increased heme synthesis in yeast induces a metabolic switch from fermentation to respiration even under conditions of glucose repression. *J Biol Chem* 2017;292(41):16942–54.
106. Müllbner A, Dorighello GG, Kozlov AV, Duvigneau JC. Interaction between Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Heme Oxygenase, and Nitric Oxide Synthase Stimulates Phagocytosis in Macrophages. *Front Med* 2017;4:252.
107. Valenza F, Rosso L, Pizzocri M, Salice V, Umbrello M, Conte G, et al. The consumption of glucose during ex vivo lung perfusion correlates with lung edema. *Transplant Proc* 2011;43(4):993–6.
108. 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.
109. Valenza F, Rosso L, Coppola S, Froio S, Colombo J, Dossi R, 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.
110. Duvigneau JC, Esterbauer H, Kozlov AV. Role of Heme Oxygenase as a Modulator of Heme-Mediated Pathways. *Antioxidants* [Internet] 2019 [cited 2020 Mar 28];8(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6827082/>
111. Eldridge F. Blood lactate and pyruvate in pulmonary insufficiency. *N Engl J Med* 1966;274(16):878–83.
112. Brown SD, Clark C, Gutierrez G. Pulmonary lactate release in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *J Crit Care* 1996;11(1):2–8.
113. Koike T, Yeung JC, Cypel M, Rubacha M, Matsuda Y, Sato M, et al. Kinetics of lactate metabolism during acellular normothermic ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant* 2011;30(12):1312–9.
114. Andreasson ASI, Karamanou DM, Gillespie CS, Özalp F, Butt T, Hill P, et al. Profiling inflammation and tissue injury markers in perfusate and bronchoalveolar lavage fluid during human ex vivo lung perfusion. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg* 2017;51(3):577–86.
115. Andreasson ASI, Borthwick LA, Gillespie C, Jiwa K, Scott J, Henderson P, et al. The role of interleukin-1 β as a predictive biomarker and potential therapeutic target during clinical ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2017;36(9):985–95.
116. Machuca TN, Cypel M, Yeung JC, Bonato R, Zamel R, Chen M, et al. Protein expression profiling predicts graft performance in clinical ex vivo lung perfusion. *Ann Surg* 2015;261(3):591–7.
117. Sadaria MR, Smith PD, Fullerton DA, Justison GA, Lee JH, Puskas F, et al. Cytokine expression profile in human lungs undergoing normothermic ex-vivo lung perfusion. *Ann Thorac Surg* 2011;92(2):478–84.
118. Cypel M, Kaneda H, Yeung JC, Anraku M, Yasufuku K, Perrot M de, et al. Increased levels of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in donor lungs rejected for transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2011;30(4):452–9.
119. Nakajima D, Cypel M, Bonato R, Machuca TN, Iskender I, Hashimoto K, et al. Ex Vivo Perfusion Treatment of Infection in Human Donor Lungs. *Am J Transplant* 2016;16(4):1229–37.
120. Ryter SW, Choi AMK. Carbon monoxide in exhaled breath testing and therapeutics. *J Breath Res* 2013;7(1):017111.
121. 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):429-436.e1.

OPEN

High inhaled oxygen concentration quadruples exhaled CO in healthy volunteers monitored by a highly sensitive laser spectrometer

Received: 15 May 2019
Accepted: 12 August 2019
Published online: 22 August 2019

Vivien Brenckmann^{1,2}, Irène Ventrillard³, Daniele Romanini³, Kévin Jaulin⁴, Pascale Calabrèse² & Raphaël Briot^{1,2}

Carbon monoxide (CO) monitoring in human breath is the focus of many investigations as CO could possibly be used as a marker of various diseases. Detecting CO in human breath remains a challenge because low concentrations (<ppm) must be selectively detected and short response time resolution is needed to detect the end expiratory values reflecting actual alveolar concentrations. A laser spectroscopy based instrument was developed (ProCeas) that fulfils these requirements. The aim of this study was to validate the use of a ProCeas for human breath analysis in order to measure the changes of endogenous exhaled CO (eCO) induced by different inspired fractions of oxygen (FiO₂) ranging between 21% and 100%. This study was performed on healthy volunteers. 30 healthy awake volunteers (including asymptomatic smokers) breathed spontaneously through a facial mask connected to the respiratory circuit of an anesthesiology station. FiO₂ was fixed to 21%, 50% and 100% for periods of 5 minutes. CO concentrations were continuously monitored throughout the experiment with a ProCeas connected to the airway circuit. The respiratory cycles being resolved, eCO concentration is defined by the difference between the value at the end of the exhalation phase and the level during inhalation phase. Inhalation of 100% FiO₂ increased eCO levels by a factor of four in every subjects (smokers and non smokers). eCO returned in a few minutes to the initial value when FiO₂ was switched back to 21%. This magnification of eCO at 21% and 100% FiO₂ is greater than those described in previous publications. We hypothesize that these results can be explained by the healthy status of our subjects (with low basal levels of eCO) and also by the better measurement precision of ProCeas.

Monitoring the endogenous carbon monoxide in exhaled breath (eCO) is of growing interest in clinical studies. This rapid and non-invasive measurement may reveal various pathological conditions.

Carbon monoxide (CO) has been extensively studied, as it is well known as a toxic gas in ambient air due to incomplete combustion of organic products. Beyond this external toxic effect, CO is normally produced endogenously by the degradation of heme porphyrins to biliverdin and iron (bilirubin metabolism or heme catabolism). This reaction is catalyzed by the rate-limiting enzyme family of heme oxygenases (HO). Several sources of stress including inflammation and ischemia-reperfusion injury, dramatically increased expression of HO-1, the inducible isoform, leading to increased levels of endogenous CO¹. Thus endogenous CO is not the cause of the diseases but it could be an interesting marker to monitor closely. Endogenous CO is eliminated from the body in exhaled air *via* the normal respiratory process. CO concentration in exhaled air (*i.e.* eCO) is thus a good indicator of the actual values of this molecule in the body. The eCO level increases in several airways inflammatory diseases like asthma², COPD³, and allergic rhinitis⁴. eCO is also increased in some systemic diseases such as severe sepsis occurring in cirrhotic patients⁵. Moreover it is a predictive marker of obliterative bronchiolitis which occurs after lung transplantation⁶.

¹Emergency Department, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France. ²Laboratory TIMC; Team PRETA; UMR 5525 CNRS - University Grenoble Alpes, Grenoble, France. ³Laboratory LIPhy, UMR 5588 CNRS - University Grenoble Alpes, Grenoble, France. ⁴AP2E company, Aix-en-Provence, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.B. (email: rbriot@chu-grenoble.fr)

The increase in CO production, in turn, exerts anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-proliferative effects and limits ischemia-reperfusion injury consequences. For example, reduction of CO production (by inhibition of HO enzyme activity) after experimental lung ischemia-reperfusion, increases alveolar cell damage, recruitment of inflammatory cells, and lung edema. In contrast, inhalation of small concentrations of exogenous CO (100 ppm to 500 ppm), reduces apoptosis, excretion of inflammatory mediators and pulmonary edema caused by ischemia-reperfusion injury¹.

eCO concentrations in healthy subjects reach 1.5 ppm up to more than 10 ppm depending on smoking status of the subjects⁷. Some clinical studies require eCO continuous monitoring with a sensitive and reliable device allowing cycle to cycle variation measurements by high frequency sampling. This allows to accurately monitor the eCO deduced from the value measured at the end of the exhalation phase to which is subtracted the CO background measured during the inhalation phase. This background corresponds to CO concentration in inhaled gas that may be subject to change. As an example, in a clinical room, CO concentration in ambient air can vary daily in a typical range of 0.3 to 0.9 ppm. In medical gas supplies (medical air or oxygen) CO concentration is usually lower (<0.2 ppm) and more stable⁸. The recently developed laser spectroscopy technique named OF-CEAS (for Optical Feedback - Cavity Enhanced Absorption Spectroscopy), has been described in detail in previous publications^{8–10}. The instrument implementing this technique, commercialized by the French company AP2E, goes under the denomination of ProCeas used further below. The OF-CEAS technique has the advantage, relative to others laser spectroscopy methods¹¹ to offer an exceptionally low CO detection limit (typically 1 part per billion: 1 ppb) over a short response time (about 1 second) and using a modest gas flow (0.15 L/min). Moreover, OF-CEAS provides real time measurements without the need for a periodic calibration. The instrument is compact and can be operated by non-specialists in a medical environment.

Since endogenous CO is rather slowly eliminated in exhaled air, and its elimination is accelerated by a high oxygen rate, high oxygen concentrations are clinically used as a treatment in severe CO poisoning. Hyperbaric oxygen therapy is broadly used for carbon monoxide poisoning although its efficacy and details of implementation remain controversial^{12,13}. Increasing FiO₂ was already used for studying variations of eCO in spontaneously breathing patients just before cardiac surgery¹⁴ and in mechanically ventilated patients under general anesthesia^{15,16}.

The aim of this study is to test the relevance of the OF-CEAS technique to monitor eCO variations due to modified FiO₂ in healthy volunteers. Additionally, we compared ProCeas real-time measurements with values obtained by sample analysis of exhaled gas with a standard electrochemical handheld sensor (MicroCO; VYaire).

Methods

A prospective monocentric clinical trial in adult healthy volunteers was conducted over a one-month period. The protocol was carried out in accordance with relevant guidelines and regulations of French law concerning persons participating in biomedical research. The study protocol was registered in ClinicalTrials.gov (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01881945) and was approved by the French "Comity for Protection of People" (CPP of region South East 5) (registration number 2008-A00273-52). Thirty healthy volunteers participated to the experiment. Informed consent was obtained from each subject. For medical gas supply convenience, measurements took place in an operating room of the Grenoble University hospital. The healthy subjects, comfortably seated and perfectly awake, would breath at rest through a facial mask connected to the airway circuit of an anesthesiology station (Primus Dräger). This station was connected to the regular medical gas supply (air and oxygen) of the operating room. Once the subject was installed, he/she was required to hold the mask tightly against his/her face and asked to breath through the mask at a resting rate. Initially the mask was only connected to an antiparticle filter, so that the subject would breath ambient air. Then the mask and the filter were connected to the tubing circuit of the anesthesiology station. The airway circuit of the station was set in manual mode for spontaneous breathing (*i.e.* no mechanical ventilation) and on "open circuit" with a fresh gas flow rate sufficient to prevent rebreathing.

Different values of the inspired fraction of oxygen were applied through the control panel of the anesthesiology station. Over a period of 30 minutes, eCO levels were recorded during different steps (ambient air, FiO₂ 21%, FiO₂ 50%, FiO₂ 100%). Each step had a five minute duration of steady-state duration.

eCO measurement by optical feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy (OF-CEAS).

This laser spectroscopy technique and its potential interest in clinical implementation have been described in details in previous publications^{8–11}. Briefly, laser spectroscopy measurements of very low gas concentrations (less than 1 ppm for endogenous expired CO for a non-smoker patient) require a large light absorption path. As some other spectroscopy techniques, OF-CEAS exploits a resonant optical cavity that allows an effective optical absorption path length of several kilometers while the cavity is only one meter long (folded in two arms) and its volume is about 20 cm³. This allows very sensitive measurements with compact instruments and a small sampling volume. Additionally, OF-CEAS provides absolute concentration measurements of sufficient accuracy without any periodic calibration with certified gas mixtures. In contrast to the somewhat complex physics underlying OF-CEAS, its optical layout consists of few basic optical elements allowing for a compact and robust device. In this study we use an OF-CEAS analyzer (ProCeas) commercialized by the AP2E company (Aix-en-Provence, France). This instrument, including electronics for laser control and data acquisition, fits inside a 19 inches rack and is perfectly adapted to a medical environment (Fig. 1). The ProCeas continuously measures CO concentration by extracting a flow of 0.15 L/min from the airway circuit of the anesthesiology station. Measurements are performed at a reduced pressure of 140 mbar in the optical cavity. The CO detection limit is about 1 ppb for an acquisition time of 0.2 second (Fig. 2A). The response time is limited to 1 second by the gas exchange time in the cavity. For each eCO measurement, a zone of interest of about one minute of the cycle-to-cycle recorded curve was selected (Fig. 2B). An automatic computer analysis detected the maximum and minimum values of each cycle and calculate the difference, for each respiratory cycle, between inhaled and exhaled CO. This provides the

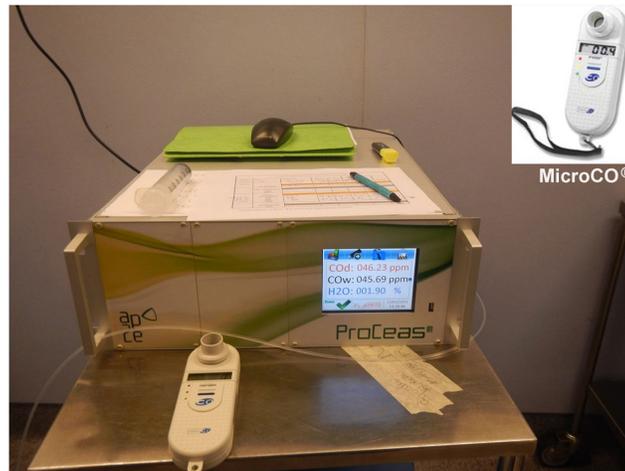


Figure 1. eCO was measured by both ProCeas and MicroCO devices.

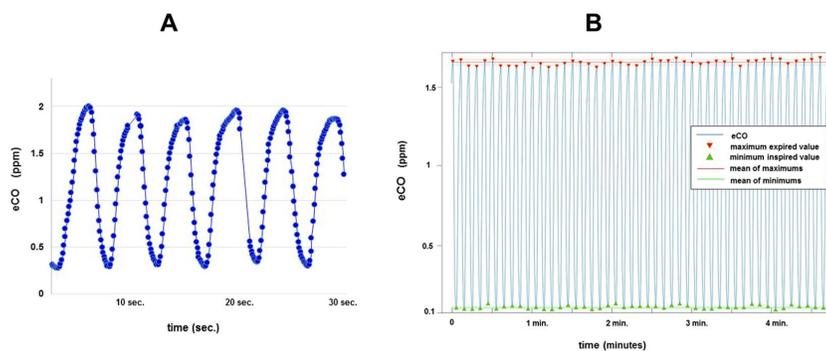


Figure 2. (A,B) eCO curves recorded with a ProCeas for a non-smoker healthy volunteer breathing medical air (21% FiO₂). (A) eCO is monitored with a sampling frequency of 5 Hz (one measure every 0.2 second). (B) Maximum (expiration) and minimum (inspiration) values are automatically detected, cycle-to cycle, by automatic computer analysis. The maximum corresponds to the end-expiratory alveolar concentration of eCO and the minimum corresponds to the CO concentration in ambient air or medical gas. To calculate the actual eCO after correction of ambient CO, the software automatically subtracts, cycle by cycle, the minimum from the maximum.

actual amount of endogenous CO produced by the organism, regardless of CO levels in ambient air or in medical gases supplied to the anesthesiology station. Another research group, using a close laser spectroscopy technic, coupled with eCO₂ expirograms measured by capnography and laser spectroscopy, confirmed the true real-time detection of this technic¹⁷. It as to be noted that eCO exhalation profiles have a slightly different shape than the eCO₂ profiles (due to its local production by airway epithelium) therefore showing a dependence on exhalation flow rate and breath-holding time.

eCO measurement with an electrochemical sensor (MicroCO). All along the experiment we also measured eCO with a standard electrochemical fuel cell handheld sensor (MicroCO; VYaire Fig. 1). This instrument is commonly used in smoking cessation clinical programs or for detection of CO poisoning. The comparison between the two devices was not the main goal of our study as, by construction, the two devices display very different characteristic and sensitivities. Indeed, the MicroCO resolution is 1 ppm with a response time below 15 second. Comparison with the MicroCO is useful to illustrate the wide difference between today available medical devices and the accuracy and speed attainable with a ProCeas laser spectrometer. The MicroCO device was

	Ambient air	Medical air	Medical gas mixture	Medical pure oxygen	Medical air
Time from beginning of experiment	5 min.	10 min.	15 min.	20 min.	25 min.
FiO ₂	21%	21%	50%	100%	21%
Exhaled CO (ppm)	4.98 ± 1.06	5.20 ± 1.08	9.30 ± 1.82 *	20.51 ± 4.08 **	5.50 ± 1.14 *

Table 1. Exhaled Carbon Monoxide values measured by the ProCeas in healthy volunteers (smokers and non-smokers together). ** $p < 0.001$ Exhaled CO with FiO₂ 100% versus every other situation. * $p < 0.01$ Exhaled CO with FiO₂ 50% versus ambient air or medical air (FiO₂ 21%). Comparisons by paired *t* test, for $n = 30$.

carefully calibrated before the experiments using a calibration gas containing 20 ppm of CO (from VYaire). For measurements, a sample of exhaled air was taken during mid-outbreath using a 60 mL syringe connected to a three-way valve placed in the airway circuit. The air in the syringe was then slowly expelled into the MicroCO. Each MicroCO measurement was performed three times, then results were averaged.

Statistical analysis. The sample-size estimation (NQuery Advisor 7.0 software; Statistical Solutions Ltd, Boston MA, USA) was based on data from previous publications^{15,16,18} with the aim to detect a difference of 5 ppm in eCO measured by ProCeas between FiO₂ 21% and FiO₂ 100% (patient being his own control) with a power of 90% and a 2-tailed significance level of 0.05. For the comparison of eCO values taken at different FiO₂, we used paired *t* test with Bonferroni correction for five repeated tests. Consequently, only *p* values < 0.01 were considered as significant. eCO results are finally presented as mean ± standard error (m ± S.E.). Correlation and reliability between ProCeas and MicroCO devices were tested by linear regression analysis and Bland and Altman plots.

Ethics approval and consent to participate. The study protocol was approved by the French “Comité de Protection of People” (CPP of region South East 5) (registration number 2008-A00273-52). Only adults volunteers participated to the experiment. Written consent was obtained from every subjects.

Results

30 healthy participants (29.7 ± 7.2 years old with a sex ratio of 53.7% of women) were included in this experiment. 19 subjects were non-smokers whereas 11 subjects admitted smoking habits between 1 and 20 pack-years (mean: 8.6 ± 1.8 pack-years). The time between the last cigarette and the moment of eCO measurement was also variable among the smokers (from 2 hours to 24 hours). CO concentration gas in the airway circuit was monitored in real time during all the 30 minutes breathing by the ProCeas analyzer. Measurements during inhalation phases allow to deduce the CO background in inhaled air that is cycle by cycle subtracted to the exhaled CO concentration values, as described above in the methods section. For accurate measurements monitoring the inhaled CO concentration is required as it varies at each FiO₂ step: from a few ppb at FiO₂ 100% (pure medical oxygen) to a hundred of ppb at FiO₂ 21% (pure medical air) and has daily variations of hundreds ppb in ambient air (typically around 500 ppb). MicroCO was not sensitive enough to detect any CO in ambient air, neither in medical gases. eCO values measured while subjects breathed ambient air or medical air (FiO₂ 21%) were approximately similar (mean 5.225 ± 0.624 ppm) regardless of the moment when high FiO₂ values were applied. Breathing high FiO₂ dramatically increased eCO (Table 1).

Subjects with smoking habits typically exhaled five times more eCO than non-smokers, regardless of FiO₂ (Fig. 3). However, whatever the initial eCO values in ambient air or medical air, applying FiO₂ 100% enhances eCO levels by a factor of four in smokers as well as in non smokers (Fig. 3). When FiO₂ was switched back to 21%, eCO returned in a few minutes to the initial value measured before FiO₂ elevation.

ProCeas values correlated well with MicroCO measurements (correlation coefficient $r = 0.98$) (Fig. 4A). However Bland – Altman analysis showed a mean bias of 2.2 ± 6.1 ppm with underestimation by MicroCO for low concentrations (MicroCO detection limit is 1 ppm) and overestimation by MicroCO for high CO levels (Fig. 4B).

Discussion

The main results of our study is that inhalation of 100% FiO₂ increased eCO levels by a factor of four in every subjects (smokers and non smokers). Moreover the laser spectrometry analyzer ProCeas allows a precise and reliable cycle to cycle monitoring of endogenous exhaled CO. It measures accurately eCO elevations induced by FiO₂ variations in healthy volunteers.

Comparison of different instruments. To our knowledge, this is the first study with a laser spectroscopy based analyzer, monitoring one-line, cycle-to-cycle, eCO changes due to FiO₂ variations in healthy volunteers. Different instruments have been used to measure eCO concentration. Gas chromatography or mass spectrometry analyzers, do not allow real time analysis and are too heavy and bulky for a convenient utilization in medical environment. Thus, until now, electrochemical devices were most frequently used in clinical practice.

Electrochemical sensors. The detection thresholds of these sensors are generally above 1 ppm. Measuring actual alveolar eCO concentrations under various FiO₂ is challenging with electrochemical devices. In volunteers this can be obtained from a single breath at forced expiration¹⁴. In mechanically ventilated patients, obtaining end-tidal gas samples requires to stop the ventilation in end-inspiration phase, clamp and disconnect the endotracheal tube from the ventilator, then released the clamp so that all gas from the lungs is exhaled passively through

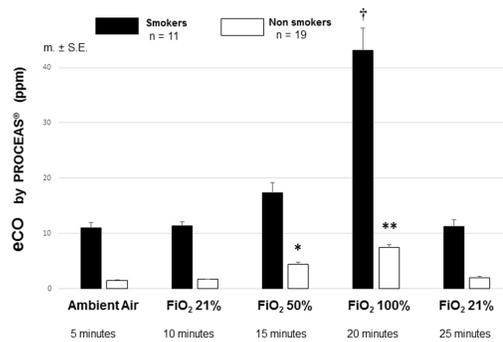


Figure 3. eCO measured by ProCeas in smokers (n = 11) and non-smoker (n = 19) subjects. Values are given from the five minute duration of the steady-state after FiO₂ changes. †*p* < 0.001 eCO with FiO₂ 100% versus every other situations in smokers. ***p* < 0.001 eCO with FiO₂ 100% versus every other situations in non-smoker subjects. **p* < 0.01 eCO with FiO₂ 50% versus ambient air or medical air (FiO₂ 21%) in non-smoker subjects. Comparisons by paired *t* test.

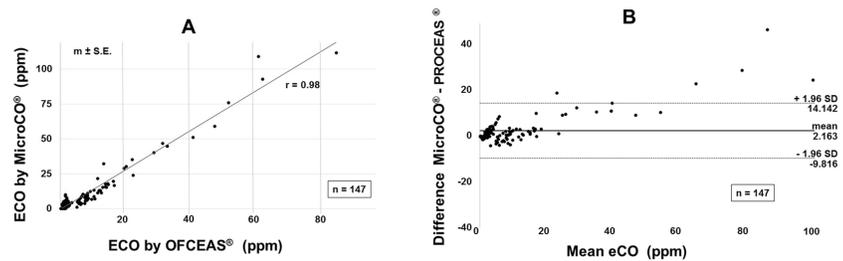


Figure 4. (A,B) Comparison of ProCeas and MicroCO measurements. (A) Correlation scatter plot; correlation represents the relationship between dataset; correlation coefficient is given as *r*. (B) Bland-Altman plots; eCO are given in ppm; vertical axis shows the eCO difference between the compared devices; mean eCO on the horizontal axis refers to the average of the eCO values measured by both devices.

the CO monitor to residual functional capacity¹⁸. Other authors collected exhaled breath at the outlet of the ventilator and either measured averaged eCO concentrations¹⁵, or picked-up highest eCO (as end-tidal values) among all collected data¹⁶. Compared to these methods, our one-line, cycle-to-cycle monitoring with the ProCeas, allows 5 measurements per second (5 Hz acquisition rate) and resolves each respiratory cycle. In our data, eCO level was lowest (1.71 ± 0.09 ppm) in non-smoker subjects at 21% FiO₂. Such concentrations are close to the detection limit of the MicroCO. The range of eCO concentrations we measured at various FiO₂, was roughly consistent with values found in other publications^{14–16,18}. However, in our data, eCO measured by ProCeas almost quadrupled between 21% and 100% FiO₂ whatever group being considered (smokers or non-smokers). This increase is greater than in other studies. It is also greater than our data with MicroCO which only detects a 2-fold eCO increase in non-smoker subjects breathing pure oxygen. It may be attributed to the high sensitivity and the better resolution of the respiratory cycle of our measurements, that allows to accurately measure end-tidal values and also to subtract cycle by cycle the inhaled level of CO to estimate correctly endogenous CO production.

Laser spectrometers. Over the two last decades, optical laser spectrometers started being used for eCO measurement¹¹. These devices are almost maintenance free and can operate continuously for long time periods. In 2000 Zegdi *et al.*¹⁵ published the first study using an infrared CO analyzer (CO 2000, Sérés, La Duranne, France) to measure eCO variations due to FiO₂ elevation, in mechanically ventilated critically ill patients. This study displayed very low eCO values compare to our data and to other publications^{14,16,18}. The explanation is probably that owing to the long response time of the CO 2000 device (70 s), only averaged eCO concentrations were measured rather than alveolar (end-tidal) concentrations. These measurements could not be performed on-line but exhaled breath had to be collected in bags placed at the outlet of the ventilator before analysis.

Other laboratory prototypes have been developed using various laser spectroscopy techniques to measure CO in exhaled breath. A laser spectrometer exploiting resonant cavity with a technique very close to the OF-CEAS (named cavity ring-down spectroscopy), demonstrates similarly low detection limit (1ppb in 1 second), on-line as

well, but with a larger gas flow (0.7 L/min) extracted from the gas line for the laser analyzer¹⁹. So far, this research group validated the accuracy of their eCO measurements in few subjects and various situations: one smoker versus two non-smokers¹⁹, ten healthy volunteers practicing exercise²⁰. However due to the use of a bulky laser (CO laser), unlike the ProCEAS, this system is a laboratory analyzer and is not transportable in medical environments. Compact analyzers adapted for eCO detection have been recently developed, based on the use of a multipass cell to enhance the light absorption path rather than a resonant optical cavity as used in OF-CEAS. Contrary to cavity enhanced techniques, the use of a multipass cell requires regular calibration (such as the commercial CO 2000 device used by Zegdi *et al.*, calibrated every week). Despite the lower absorption path of a multipass cell, the use of new semi-conductor lasers (QCL and ICL in the mid infrared range where CO absorption may be stronger) allows the development of compact and sensitive analyzers. A detection limit as low as 7 ppb for an integration time of 1 second was achieved by Pakmanesh *et al.*²¹. Here, as for the ProCEAS, the response time is limited by the gas exchange time in the cell. The small multipass cell volume (47 mL) and the reduced pressure (20 mbar) allows a gas exchange time of 1.7 s, that could be even reduced below 1 second by increasing the flow from 33 mL/min (value reported in²¹) to 100 mL/min. In comparison, the ProCeaS operates at a sampling flow of 150 mL/min, flow that can be extracted from a ventilator gas line. More recently, Ghorbani *et al.*²² developed an instrument for eCO measurement that allows to resolve breath-cycle with a lower detection limit (~3 ppb in 1 second). With this device, different exhalation profile shapes are studied and a mathematical model is proposed to differentiate the CO gas exchange parameters between airways and alveoli. However, to reach such precision and resolution levels, this device needs to sample the gas with a flow of 3 L/min that has to be subtracted from the airway circuit¹⁷. Such flows represents almost the totality of normal human breath (tidal volume) at rest and is incompatible with an airway ventilator system as used in the work reported here.

Tobacco and eCO. In our data, any subject having recently smoked showed higher eCO levels than non-smokers. This effect is well known and is used to control actual tobacco consumption in clinical programs for smoke cessation²³.

Oxygen and eCO. We found a systematic rise in eCO while increasing FiO₂. eCO quadrupled between 21% and 100% FiO₂ whatever was basal eCO level of each subject (smokers or non-smokers). eCO returned to basal values after FiO₂ was switched back from 100% to 21%. This phenomenon is classically described in several publications^{14–16,18} within a broad spectrum of eCO values at comparable FiO₂.

Schober *et al.*¹⁸ using an electrochemical sensor, measured eCO variation due to oxygen variation in volunteers. eCO values increased from 10.7 ± 5.9 ppm (21% FiO₂) to 16.0 ± 6.0 ppm (100% FiO₂). They also measured eCO in patients undergoing surgery, before and after pre-oxygenation for anesthesia, and after oro-tracheal intubation. Similarly to volunteers, in eCO increased from 7.1 ± 6.1 to 16.4 ± 8.6 ppm after 10 min pre-oxygenation with pure oxygen. Oro-tracheal intubation enhances this increased eCO up to 26.1 ± 13.1 ppm.

The same research group performed the same kind of measurements, just before anaesthesia, in 19 patients scheduled for cardiac surgery. Oxygen inhalation resulted in an increase in eCO levels from 8.6 ± 4.9 to 16.7 ± 9.4 ppm¹⁴. Adachi *et al.*¹⁶ studied (with an electrochemical sensor) the effect of FiO₂ variations on exhaled CO, in thirty patients under general anaesthesia who underwent elective operations. They, all the same, found an eCO increase with high FiO₂ (from 3.35 ± 0.62 ppm in basal value up to 7.57 ± 1.49 ppm under 100% FiO₂). Zegdi *et al.*¹⁵ using an infrared CO analyzer, measured eCO variations due to FiO₂ elevation, in nine mechanically ventilated critically ill patients. These authors described also a rise in eCO with pure oxygen (from 0.63 ± 0.13 ppm in basal value up to 1.54 ± 0.16 ppm under 100% FiO₂).

In our study, the amplitude of the eCO increase we measured (4 fold increase) is larger than those described in all these previous publications.

Various clinical situations and possible lack of precision of instruments may explain the discrepancies. Indeed most of these studies employed electrochemical devices. Nonetheless, a marked elevation of eCO with increasing FiO₂ is systematically found in the literature. At 100% FiO₂ all studies showed an eCO increase by a factor 2 or 3 compared to basal levels. However frequently, basal values, in those series, are higher than found in our volunteers. Most of those previous publications concerned critically ill patients, or undergoing surgery, under mechanical ventilation. In Zegdi *et al.* study¹⁵ patients were all in intensive care unit and their “basal status” was a mechanical ventilation with 50% FiO₂. This may perhaps explain the smaller difference (compare to ours) in eCO increase between their basal status and pure oxygen administration. Our healthy subjects (even if including non-symptomatic smokers) had probably less airways inflammation than those patients. Because eCO is elevated in many inflammatory situations, this could explain why basal eCO levels were higher in other series than in our study.

Mechanisms of eCO increase under high FiO₂. eCO elevation while increasing FiO₂ may be due to a displacement of pre-existing CO from its hemoglobin bound. It could also originate as new CO production by hemoxygenase HO-1 induction. The few previous clinical studies investigating eCO changes while breathing oxygen-enriched air are in favor of the theory of CO displacement from hemoglobin. In Zegdi *et al.* study¹⁵ eCO rose markedly to a transient peak before returning to baseline values after seven hours of 100% FiO₂. Schober *et al.*¹⁴ measured arterial oxygen tension (PaO₂) and arterial carboxy-hemoglobin levels (CO-Hb), in mechanically ventilated patients. They showed a correlation between PaO₂ and eCO levels which is in favor of the displacement of CO from hemoglobin bond. However, they failed to find a correlation between eCO concentrations and arterial CO-Hb levels. Adachi *et al.*¹⁶ have shown a decrease of blood CO-Hb concentrations over time, correlated to a return of eCO to the baseline (and even lower the baseline level) after four hours of ventilation at 75% FiO₂. This findings argues in favor of the CO displacement hypothesis. However, deleterious effects of high oxygen concentrations are known and hyperoxia is used to induce an experimental acute lung injury in several animal models²⁴. Hyperoxia may provoke an over-expression of HO-1 that in turn brings about an overproduction of

carbon monoxide²⁵. Possibly this mechanism might account for a part of the eCO we measured in our subjects but we have not measured HO-1 in our healthy volunteers. As our subjects were only exposed to 100% FiO₂ for a very short period (five minutes) we think that inflammatory reactions due to hyperoxia probably did not have sufficient time to occur nor did the production of CO from the degradation of the heme molecules. Therefore we hypothesize that our eCO increase under pure oxygen is mostly due to CO displacement from hemoglobin.

Limits of the study. The carbon monoxide content in ambient air was not taken into account when recording MicroCO values, however this device was not sensitive enough to detect any CO in ambient air or in medical gases. No blood sample was collected during our experiments on healthy volunteers. Measurement of inducible hemeoxygenase (HO-1), carboxyhemoglobin (Hb-CO) or pro-inflammatory cytokines could have been of interest. However, the main goal of the study was to test the accuracy of the ProCeas in clinical setting rather than questioning the physiological CO production pathways. The study was conducted in healthy volunteers and not on critically ill patients whose profile of endogenous CO production is probably different from physiological pathways, due to inflammation and others pathological mechanisms.

Future applications. CO is increasingly being accepted as a cytoprotective and homeostatic molecule with important signaling capabilities in physiological and pathophysiological situations^{1,26}. Being able to monitor on line and precisely the endogenous production of CO could be of high interest in several clinical situations such as those concerning airways inflammation (COPD, Asthma, Cystic Fibrosis, lung transplantation). Some research teams also use eCO levels to estimate accurately red blood cell lifespan and study several forms of anemia²⁷. As another application, the precision of the OF-CEAS technique allows to selectively measure lung CO production in an experimental *ex vivo* pig lung perfusion (EVLV) model in order to develop noninvasive identification of the most IR injured lungs¹⁰. One of our ongoing study is currently evaluating eCO measurements in human EVLP procedures in a clinical lung transplantation program.

Conclusion

The ProCeas instrument, based on the OF-CEAS technique, demonstrated its suitability in clinical setting for on-line cycle-to-cycle monitoring of endogenous exhaled CO. In an operating room environment, ProCeas measured a four fold increase in eCO in healthy volunteers (smokers and non-smokers) breathing pure oxygen compared to air. This amplitude of eCO increase between 21% and 100% FiO₂ is greater than those described in previous publications. We hypothesize that the precision of measurements and a better respiratory cycle resolution of ProCeas explains these results.

Data Availability

The datasets used and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Ryter, S. W. & Choi, A. M. Carbon monoxide in exhaled breath testing and therapeutics. *J Breath Res.* **7**, 017111 (2013).
- Zhang, J. *et al.* Exhaled carbon monoxide in asthmatics: a meta-analysis. *Respir Res.* **11**, 50 (2010).
- Montuschi, P., Kharitonov, S. A. & Barnes, P. J. Exhaled carbon monoxide and nitric oxide in COPD. *Chest.* **120**, 496–501 (2001).
- Monma, M. *et al.* Increased carbon monoxide in exhaled air of patients with seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* **29**, 1537–41 (1999).
- Gajdosy, R. & Horvath, I. Exhaled carbon monoxide in airway diseases: from research findings to clinical relevance. *J Breath Res.* **4**, 047102 (2010).
- Van Muylem, A., Knoop, C. & Estenne, M. Early detection of chronic pulmonary allograft dysfunction by exhaled biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med.* **175**, 731–6 (2007).
- Ventrillard-Courtilot, 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.* **14**, 064026 (2009).
- Maignan, M. *et al.* Real-time measurements of endogenous carbon monoxide production in isolated pig lungs. *J Biomed Opt.* **19**, 047001 (2014).
- Morville, J., Kassi, S., Chenevier, M. & Romanini, D. Fast, low-noise, mode-by-mode, cavity-enhanced absorption spectroscopy by diode-laser self-locking. *Applied Physics B: Lasers and Optics.* **80**, 1027–38 (2005).
- Maignan, M. *et al.* Exhaled carbon monoxide is correlated with ischemia reperfusion injuries during *ex vivo* lung perfusion in pigs. *J Breath Res.* **11**, 036004 (2017).
- Henderson, B. *et al.* Laser spectroscopy for breath analysis: towards clinical implementation. *Applied Physics B.* **124**, 161 (2018).
- Annane, D. *et al.* Hyperbaric oxygen therapy for acute domestic carbon monoxide poisoning: two randomized controlled trials. *Intensive Care Med.* **37**, 486–92 (2011).
- Buckley, N. A., Juurlink, D. N., Isbister, G., Bennett, M. H. & Lavonas, E. J. Hyperbaric oxygen for carbon monoxide poisoning. *Cochrane Database Syst Rev.* Cd002041 (2011).
- Schober, P., Kalmanowicz, M., Schwarte, L. A., Weimann, J. & Loer, S. A. Changes in arterial oxygen tension correlate with changes in end-expiratory carbon monoxide level. *J Clin Monit Comput.* **21**, 131–5 (2007).
- Zegdi, R. *et al.* Exhaled carbon monoxide in mechanically ventilated critically ill patients: influence of inspired oxygen fraction. *Intensive Care Med.* **26**, 1228–31 (2000).
- 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.* **105**, 696–9 (2007).
- Ghorbani, R. & Schmidt, F. M. Real-time breath gas analysis of CO and CO₂ using an EC-QCL. *Applied Physics B.* **123**, 144 (2017).
- Schober, P., Kalmanowicz, M. & Loer, S. A. Effects of inspiratory oxygen concentration on endtidal carbon monoxide concentration. *J Clin Monit Comput.* **20**, 89–94 (2006).
- Fritsch, T., Hering, P. & Murtz, M. Infrared laser spectroscopy for online recording of exhaled carbon monoxide—a progress report. *J Breath Res.* **1**, 014002 (2007).
- Sowa, M., Murtz, M. & Hering, P. Mid-infrared laser spectroscopy for online analysis of exhaled CO. *J Breath Res.* **4**, 047101 (2010).
- Pakmanesh, N., Cristescu, S. M., Ghorbanzadeh, A., Harren, F. J. M. & Mandon, J. Quantum cascade laser-based sensors for the detection of exhaled carbon monoxide. *Applied Physics B.* **122**, 10 (2016).

22. Ghorbani, R. & Schmidt, F. M. Fitting of single-exhalation profiles using a pulmonary gas exchange model-application to carbon monoxide. *J Breath Res.* **13**, 026001 (2019).
23. Goldstein, A. O., Gans, S. P., Ripley-Moffitt, C., Kotsen, C. & Bars, M. Use of Expired Air Carbon Monoxide Testing in Clinical Tobacco Treatment Settings. *Chest.* **153**, 554–62 (2018).
24. Kallet, R. H. & Matthay, M. A. Hyperoxic acute lung injury. *Respir Care.* **58**, 123–41 (2013).
25. Ryter, S. W. & Choi, A. M. Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress. *Antioxid Redox Signal.* **4**, 625–32 (2002).
26. Motterlini, R. & Otterbein, L. E. The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nature Reviews Drug Discovery.* **9**, 728 (2010).
27. Zhang, H. D. *et al.* Human erythrocyte lifespan measured by Levitt's CO breath test with newly developed automatic instrument. *J Breath Res.* **12**, 036003 (2018).

Acknowledgements

We thank Ms. Anne Moyroud, Ms. Estelle Iacovella and Mr. Gaetan Bossé (Anaesthetist Nurse School of Grenoble University Hospital) for their technical assistance. This study was supported by a grant of the French Ministry of Health (Agence BioMedecine).

Author Contributions

V.B. and R.B. collected the data, performed the data analysis, and wrote the initial draft and the final manuscript. K.J. supervised the commercial ProCeas[®] delivery. I.V. and D.R. participated in data collection and signal analysis and in revising the final manuscript. P.C. and R.B. designed the clinical protocol. P.C. participated in data collection and signal analysis and participated in revising the final manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Annexe 2 : Aspects administratifs

Rapport de l'analyse de risque du ProCEAS®

RAPPORT DE MANAGEMENT DU RISQUE / RISK MANAGEMENT REPORT			
Analyse Bénéfice / Risque pour chaque risque individuel Benefit / Risk Analysis for each individual risk			
Avant mesures de réduction de risques : 9 risques négligeables - 25 risques indésirables Après implémentation des mesures de réduction de risques : 34 risques négligeables			
Analyse globale du Bénéfice / Risque pour des risques résiduels Benefit / Risk Analysis for overall residual risk			
NA : tout risque individuel négligeable après implémentation des mesures de réduction des risques			
CONCLUSION			
<i>Sur la base des critères d'acceptation définis (06 -REGLES), le risque résiduel global est acceptable et est donc en faveur d'une utilisation de sécurité. Cela justifie l'utilisation du PROCEAS medical dans le cadre de protocole de recherche non RIPH, pour la mesure du taux de CO expiré (études nécessitant la mise en service du ProCEAS Médical dans les blocs opératoires des établissements habilités pour les greffes pulmonaires).</i>			