



HAL
open science

Microsphères de chimioembolisation appliquées au poumon : étude de la libération in vivo d'anticancéreux

Minh-Tâm Baylatry

► **To cite this version:**

Minh-Tâm Baylatry. Microsphères de chimioembolisation appliquées au poumon : étude de la libération in vivo d'anticancéreux. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114819 . tel-00665233

HAL Id: tel-00665233

<https://theses.hal.science/tel-00665233>

Submitted on 1 Feb 2012

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ
PÔLE : PHARMACOLOGIE EXPERIMENTALE ET CLINIQUE

ANNÉE 2011

SÉRIE DOCTORAT N° 1111

THÈSE

Présentée

À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE
FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

par

Mademoiselle BAYLATRY Minh-Tâm

Titre de la thèse :

Microsphères de chimioembolisation appliquées au poumon :
Etude de la libération *in vivo* d'anticancéreux

soutenue le 29/09/2011

JURY : Président : Pr Christos CHOUAID
Membres : Pr Jean-Pierre PELAGE
Dr Laurence MOINE
Rapporteurs : Pr Etienne CHATELUT
Dr Thierry DE BAERE
Directeurs de thèse : Dr Alexandre LAURENT
Pr Christine FERNANDEZ

*A Alex,
Pour cette incroyable aventure
humaine et professionnelle*

*A Anne-Christine,
Pour m'avoir donné l'opportunité
et les moyens de vivre cette aventure*

Remerciements au Jury

Au Professeur Christos Chouaid pour avoir accepté de faire parti de mon jury. Merci beaucoup pour ton soutien, ta disponibilité et ta gentillesse.

Au Professeur Etienne Chatelut et au Docteur Thierry De Baere pour avoir accepté de juger la qualité scientifique de ces travaux en tant que rapporteurs. Merci pour vos conseils, votre patience et votre indulgence.

Au Professeur Jean Pierre Pelage pour m'avoir « accueillie » dans la chimioembolisation pulmonaire et d'avoir accepté que je réalise mon travail de thèse dans ce domaine.

Au Maitre de Conférences Laurence Moine pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci beaucoup pour ton aide, tes conseils et ton écoute.

Au Professeur Christine Fernandez pour avoir accepté de co-diriger ce travail de thèse. Merci beaucoup pour ton aide, tes conseils, ton soutien et ta disponibilité.

Au Docteur Alexandre Laurent, pour m'avoir confié ce sujet de thèse. Merci beaucoup pour la qualité de ton encadrement tout au long de cette thèse, tes compétences, ton soutien, tes conseils, ton écoute, ta générosité et ta disponibilité.

Remerciements personnels

Une pensée à François...

Une aventure humaine de 4 ans...

Ils se sont retrouvés, malgré eux, embarqués dans cette aventure palpitante :

ma mère et mes proches, merci pour tout. Merci d'avoir assuré, du fou-rire à sortir lors des tempêtes à la logistique quand tout tanguait à bord. Merci de m'avoir soutenue sans jamais fléchir quelle que soit la météo.

Des rencontres rares et belles...

Un chef d'orchestre unique, à la tête de L'Archimmed Orchestra...l'harmonie dans la Recherche où s'accordent compétence, humanité, pointes d'humour et cordes artistiques...

Merci de m'avoir appris les clés pour lire, interpréter et écrire quelques partitions sur la chimioembolisation

Un chef de la tribu des UPAC, qui a compris l'importance de cette aventure et qui m'a encouragée à la vivre en me donnant sans compter un bout de terre pour établir mon port d'attache et une denrée rare...du temps.

Une coéquipière qui n'a jamais hésité à monter à bord en cas de besoin, merci pour ton soutien et ton aide précieuse

Alex, Anne-Christine, Catherine...je mesure vraiment ma chance de vous avoir rencontrés sur ma route ...et j'espère qu'on « bourlinguera » encore ensemble pendant longtemps !

Merci

A Monsieur Prugnaud pour avoir accepté que je réalise ce travail de thèse au cours de mon assistantat à l'Hôpital Saint-Antoine

A l'Archimmed Orchestra sans qui ce travail n'existerait pas : Hodayra, Julien, Valentin, Laurence, Michel, Florentina, Pierre Alain

A l'équipe de l'INRA pour leur aide et leur gentillesse

A l'équipe de l'UPAC pour leur soutien et leur compréhension

Sommaire

Résumé	- 9 -
Liste des productions scientifiques.....	- 10 -
Liste des abréviations	- 13 -
Liste des figures.....	- 14 -
Liste des tableaux	- 16 -
Introduction générale	- 17 -

PRESENTATION DU SUJET

Chapitre 1 - De l'embolisation à la chimioembolisation	- 22 -
1.1 L'embolisation.....	- 22 -
1.1.1 Définition	- 22 -
1.1.2 Agents d'embolisation	- 22 -
1.2 La chimioembolisation	- 26 -
1.2.1 Principe ..	- 26 -
1.2.2 Intérêt clinique	- 26 -
1.2.3 Les différentes techniques.....	- 27 -
Chapitre 2 – Les microsphères de chimioembolisation chargeables en principe actif - 31 -	
2.1 Caractéristiques des microsphères de chimioembolisation calibrées non dégradables et chargeables en principe actif	- 31 -
2.1.1 Caractéristiques idéales	- 31 -
2.1.2 Mécanismes de chargement extemporané du principe actif	- 33 -
2.1.3 Libération du principe actif.....	- 44 -
2.2 Applications médicales.....	- 52 -
2.2.1 Microsphères de chimioembolisation utilisées en clinique.....	- 52 -
2.2.2 Applications cliniques.....	- 53 -
Chapitre 3 – La chimioembolisation appliquée au poumon	- 54 -
3.1 Le poumon.....	- 54 -
3.1.1 Structures pulmonaires.....	- 54 -
3.1.2 Vascularisation pulmonaire.....	- 55 -
3.2 Intérêt de la chimioembolisation	- 56 -

3.2.1 Les tumeurs pulmonaires malignes	- 56 -
3.2.2 Les hémoptysies massives.....	- 58 -

TRAVAUX PERSONNELS

Partie 1- Microsphères de chimioembolisation chargées en irinotécan..... - 62 -

1.1 Contexte médical : les tumeurs pulmonaires malignes	- 62 -
1.1.1 Les tumeurs primitives.....	- 62 -
1.1.2 Les tumeurs secondaires	- 63 -
1.2 Principe actif étudié : irinotécan.....	- 63 -
1.2.1 Rationnel.	- 63 -
1.2.2 Caractéristiques	- 64 -
1.3 Travaux personnels.....	- 67 -
1.3.1 Quantification de l'irinotécan dans le plasma et dans le tissu pulmonaire de brebis....	- 67 -
1.3.2 Chimioembolisation de l'artère pulmonaire.....	- 75 -
1.3.3 Chimioembolisation des artères pulmonaire et bronchique	- 87 -

Partie 2- Microsphères de chimioembolisation chargées en sirolimus - 109 -

2.1 Contexte médical : les hémoptysies massives	- 109 -
2.2 Principe actif étudié : sirolimus	- 109 -
2.2.1 Rationnel.	- 109 -
2.2.2 Caractéristiques	- 110 -
2.3 Travaux personnels.....	- 113 -
2.3.1 Quantification du sirolimus dans le sang et dans le tissu pulmonaire de la brebis.....	- 113 -
2.3.2 Chimioembolisation de l'artère bronchique dans un modèle d'hypervascularisation systémique du poumon.....	- 115 -

Partie 3 - Discussion Générale..... - 117 -

3.1 Validité de nos résultats.....	- 117 -
3.1.1 Libération rapide et biphasique de l'irinotécan.....	- 117 -
3.1.2 Absence de toxicité systémique	- 119 -
3.1.3 Effets locaux sur tissu non tumoral.....	- 122 -
3.2 Chimioembolisation du poumon: performances selon la technique.....	- 125 -
3.2.1 Chimioembolisation « d'imprégnation »	- 125 -
3.2.2 Chimioembolisation « anti-recanalisation »	- 129 -

3.3 Microsphères de chimioembolisation chargeables : sont-elles des vecteurs adaptés à la chimioembolisation du poumon ?	- 130 -
3.3.1 Réduction des concentrations systémiques	- 130 -
3.3.2 Concentration et diffusion du principe actif dans le tissu pulmonaire.....	- 131 -
3.3.3 Performances de libération : influence du vecteur ou du principe actif ?.....	- 132 -
Partie 4 - Conclusion générale et Perspectives	- 134 -
Références.....	- 136 -

Résumé

La chimioembolisation est une thérapie loco-régionale qui consiste à injecter, au moyen d'un microcathéter, un principe actif et un agent d'occlusion vasculaire de manière la plus sélective possible dans les artères nourricières du processus pathologique. Les microsphères de chimioembolisation sont des microsphères calibrées et chargeables en principe actif, développées ces dernières années afin d'optimiser la chimioembolisation et permettre une libération ciblée et contrôlée du principe actif au sein du territoire pathologique. L'utilisation de ces microsphères n'a encore jamais été appliquée à la chimioembolisation du poumon. Elle pourrait être intéressante dans le traitement des tumeurs pulmonaires malignes en permettant une imprégnation de la tumeur par un anticancéreux, tout en évitant une toxicité systémique de ce dernier et dans le traitement des hémoptysies massives en évitant les récurrences, dues à une recanalisation des vaisseaux après embolisation, par l'utilisation d'un inhibiteur du remodelage vasculaire.

Notre travail a consisté à évaluer les performances de libération de l'irinotécan et du sirolimus à partir des microsphères de chimioembolisation au niveau systémique et au niveau tissulaire, sur des modèles de chimioembolisation pulmonaire chez la brebis. Nos résultats ont montré que les microsphères de chimioembolisation ne permettaient pas une délivrance tissulaire suffisamment prolongée de l'irinotécan pour espérer obtenir une imprégnation efficace d'un lobe pulmonaire. Les microsphères chargées en sirolimus semblent permettre une libération contrôlée du principe actif et paraissent intéressantes pour prévenir la recanalisation.

Les microsphères de chimioembolisation doivent être améliorées pour permettre une libération prolongée du principe actif. Des études complémentaires notamment en termes d'efficacité (modèle tumoral) doivent être réalisées pour montrer l'intérêt d'utiliser la chimioembolisation pulmonaire par microsphères en pratique clinique.

Mots clefs : chimioembolisation, microsphère, irinotécan, sirolimus, pharmacocinétique, poumon

Liste des productions scientifiques

Publications internationales dans des revues scientifiques à comité de lecture

- Baylatry MT, Pelage JP, Wassef M, Ghegediban H, Joly AC, Lewis A, Lacombe P, Fernandez C, Laurent A. Pulmonary artery chemoembolization in a sheep model : evaluation of performance and safety of irinotecan eluting beads (DEB-IRI). J Biomed Mater res B App Biomater 2011; 98B (2), 351-9.
- Baylatry MT, Joly AC, Pelage JP, Bengrine-Lefevre L, Prugnaud JL, Laurent A, Fernandez C. Simple liquid chromatography method for the quantification of irinotecan and SN38 in sheep plasma : application to in vivo pharmacokinetics after pulmonary artery chemoembolization using drug eluting beads. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010 ;878 :738-42.
- Brevet « injectable biomaterial and its process of manufacture » n°61/156,737 2 mars 2009. Baylatry MT, Bisdorf-Bresson A, Labarre D, Laurent A, Moine L, Saint-Maurice JP, Slimani K, Wassef M.
- Baylatry MT, Pelage JP, Wassef M, Ghegediban H, Joly AC, Lewis A, Lacombe P, Fernandez C, Laurent A. Can additional embolization of bronchial artery enhance the performance of pulmonary artery chemoembolization with irinotecan eluting beads? (en cours de rédaction).

Communications orales en congrès international

- Baylatry MT, Laurent A, Ghegediban HS, Wassef M, Lewis A, Tang Y, Pelage JP. Bronchial artery embolization using rapamycin drug-eluting beads in an animal model of lung hypervascularization. 97th Annual Meeting of the Radiological Society of North America, Chicago, USA, 27 November - 2 December 2011.

- Baylatry MT, Laurent A, Ghegediban HS, Wassef M, Lacombe P, Lewis A, Fernandez C, Tang Y, Pelage JP. Bronchial artery embolization with rapamycin-eluting beads : blood and lung concentrations in a sheep model. 36th Annual Meeting of the Society of Interventional Radiology, Chicago, USA, 26-31 March 2011.
- Baylatry MT, Pelage JP, Lacombe P, Wassef M, Ghegediban HS, Lewis A, Fernandez C, Laurent A. Plasmatic and lung concentrations after irinotecan-eluting-beads (DEBIRI) embolization of pulmonary artery alone vs combined with bronchial artery embolization in a sheep model. 26th Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Society of Europe, Valencia, Spain, 2-6 October 2010.
- Baylatry MT, Wassef M, Ghegediban SH, Namur J, Lewis AL, Joly AC, Fernandez C, Pelage JP, Laurent A. Pulmonary artery embolization using irinotecan eluting beads : drug delivery and pathology in a sheep model. 25th Annual Meeting of the cardiovascular and Interventional Society of Europe, Lisbon, Portugal, 19-23 September 2009.
- Ghegediban SH, Baylatry MT, Pelage JP, Lewis A, Wassef M, Laurent A. Lung chemoembolization with irinotecan eluting beads (DEBIRI) : comparison of tolerance and plasmatic level after pulmonary artery embolization alone vs combined with bronchial artery embolization in a sheep model. 35th Annual Meeting of the Society of Interventional Radiology, Tampa, USA, 13-18 March 2010.
- Pelage JP, Baylatry MT, Joly AC, Lewis A, Lacombe P, Laurent A. Irinotecan eluting beads (DEBIRI) for lung cancer embolization : pharmacokinetics after embolization of pulmonary artery alone or combined with bronchial artery embolization in a sheep model. 95th Annual Meeting of the Radiological Society of North America, Chicago, USA, 29 November - 4 December 2009.
- Namur J, Dinca H, Baylatry MT, Lewis AL, Manfait M, Laurent A. irinotecan concentration in drug eluting beads after 2 hours and 24 hours loading. 34th Annual Meeting of the Society of Interventional Radiology, San Diego, USA, 7-12 March 2009.

Communication affichée en congrès international

- Baylatry MT, Wassef M, Ghegediban SH, Namur J, Lewis AL, Joly AC, Fernandez C, Pelage JP, Laurent A. Irinotecan eluting beads for lung cancer embolization : pharmacokinetics and pathology in a sheep model. 36th Annual Meeting of Controlled Release Society, Copenhagen, Denmark, 18-22 July 2009.
- Ghegediban SH, Pelage JP, Wassef M, Baylatry MT, Lewis A, Lacombe P, Laurent A. Pulmonary artery embolization with and without additional bronchial artery embolization using irinotecan eluting beads : tolerance in a sheep model. 26th Annual Meeting of the cardiovascular and Interventional Society of Europe, Valencia, Spain, 2-6 October 2010.

Communication orale en congrès national

- Baylatry MT, Pelage JP, Ghegediban SH, Wassef M, Namur J, Fernandez C, Lewis AL, Lacombe P, Laurent A. Chimioembolisation bronchique avec de la rapamycine (modèle d'hypervascularisation pulmonaire) : étude pharmacologique et anatomopathologique. 59^{ème} Edition des Journées Françaises de Radiologie, Paris, 21-25 Octobre 2011.
- Lacombe P, Pelage JP, Baylatry MT, Ghegediban S, Lewis A, Wassef M, Laurent A. Chimioembolisation pulmonaire et bronchique par irinotecan : étude pharmacologique et anatomopathologique chez le mouton. 58^{ème} Edition des Journées Françaises de Radiologie, Paris, 22-26 Octobre 2010.

Communication affichée en congrès national

- Lacombe P, Pelage JP, Baylatry MT, Desperramons J, Ghegediban S, Namur J, Wassef M, Lewis A, Laurent A. Chimioembolisation pulmonaire par irinotecan sur le mouton : délivrance du produit et anatomopathologie. 58^{ème} Edition des Journées Françaises de Radiologie, Paris, 22-26 octobre 2010.

Liste des abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ARN** : Acide ribonucléique
- AMM** : Autorisation de mise sur le marché
- AUC** : Aire sous la courbe (area under curve)
- CBNPC** : Cancer bronchique non à petites cellules
- CBPC** : Cancer bronchique à petites cellules
- CHC** : Carcinome hépatocellulaire
- CPT11** : Irinotécan
- EDTA** : acide éthylène diamine tétracétique
- IA** : Intra-artériel
- IV** : Intraveineux
- KW** : Test non paramétrique de Kruskal Wallis
- mTOR** : mammalian target of rapamycine
- MW**: Test non paramétrique de Mann Whitney
- PVA** : Alcool de polyvinyle

Liste des figures

Figure 1- Embolisation d'un fibrome utérin	- 24 -
Figure 2- Illustration des trois principaux types d'agents d'embolisation et de leurs applications.....	- 24 -
Figure 3- Concentration en carboplatine dans le plasma et dans la tumeur hépatique après injection intra-artérielle seule versus chimioembolisation lipiodolée chez des lapins porteurs de tumeurs hépatiques VX2	- 28 -
Figure 4- Fonctions anioniques greffées dans les microsphères de chimioembolisation et impliquées dans le chargement du principe actif	- 36 -
Figure 5- Chargement de la doxorubicine dans les microsphères de chimioembolisation par interactions ioniques.....	- 36 -
Figure 6- Mode opératoire du chargement de la doxorubicine dans des microsphères de chimioembolisation	- 37 -
Figure 7- Influence du mode opératoire sur le taux de chargement en doxorubicine et sur la structure des microsphères	- 38 -
Figure 8- Temps de chargement de la doxorubicine et de l'irinotécan sur les microsphères fonctionnalisées.....	- 39 -
Figure 9- Effet du chargement de la doxorubicine ou de l'irinotécan sur les propriétés physiques des microsphères	- 41 -
Figure 10- Images obtenues par microscopie confocale à balayage laser de microsphères chargées en doxorubicine	- 43 -
Figure 11- Influence de la quantité de principe actif chargée dans la microsphère et de la taille des microsphères sur la cinétique de libération de la doxorubicine et de l'irinotécan <i>in vitro</i>	- 45 -
Figure 12- Profils de libération de la doxorubicine et de l'irinotécan à partir de microsphères (ms) porteuses de fonctions sulfonates ou carboxylates	- 46 -
Figure 13- Profil pharmacocinétique plasmatique de la doxorubicine et de l'irinotécan après chimioembolisation par microsphères (ms) chargées, comparée à une injection IA du principe actif seul ou à une chimioembolisation lipiodolée.....	- 48 -
Figure 14- Concentration en doxorubicine dans la tumeur après chimioembolisation par microsphères chargées en doxorubicine et injection IA de doxorubicine seule	- 50 -

Figure 15- Quantification de la doxorubicine dans le tissu, à l'intérieur et en dehors des microsphères, après chimioembolisation d'un foie sain de cochon	- 50 -
Figure 16- Concentrations dans le tissu tumoral en irinotécan et en SN38 et nécrose tumorale, observées dans un modèle tumoral VX2 chez le lapin, après chimioembolisation par microsphères chargées en irinotécan, injection IA ou IV d'irinotécan seul.....	- 51 -
Figure 17- Microsphères de chimioembolisation commercialisées : DC Bead® et Hépasphères®	- 52 -
Figure 18- Schéma du lobule pulmonaire chez l'homme et Photographie d'une coupe histologique de poumon de brebis.....	- 55 -
Figure 19- Profils concentration-temps du cisplatine chez le rat après administration intraveineuse, perfusion sur poumon isolé ou chimioembolisation	- 57 -
Figure 20- Recanalisation d'un vaisseau embolisé	- 58 -
Figure 21- -Structure chimique de l'irinotécan et du SN38	- 65 -
Figure 22- Structure chimique du sirolimus	- 111 -
Figure 23- Chromatogrammes d'un sang vierge de brebis, d'un point contrôle de sirolimus et de l'étalon interne.....	- 114 -
Figure 24- Profil sanguin du sirolimus après chimioembolisation bronchique.....	- 116 -
Figure 25- Chromatogramme d'un échantillon tissulaire contenant du sirolimus	- 116 -
Figure 26- Comparaison entre l'activité de la carboxylesterase du lapin et celle de l'homme dans la conversion de l'irinotécan en SN38	- 121 -
Figure 27- Activation de l'irinotécan en SN38 chez l'homme, la brebis et le lapin	- 122 -
Figure 28- Formes ionisées de la doxorubicine et de l'irinotécan en fonction du pH	- 124 -
Figure 29- Densité vasculaire dans le poumon sain et dans les tumeurs pulmonaires.....	- 127 -
Figure 30- Conséquence d'une libération initiale de principe actif en fonction de la dose libérée	- 130 -

Liste des tableaux

Tableau 1- Principales particules et microsphères utilisées pour l'embolisation	- 25 -
Tableau 2- Principales études sur la chimioembolisation par particules préchargées en principe actif.....	- 30 -
Tableau 3- Caractéristiques idéales des microsphères de chimioembolisation	- 32 -
Tableau 4- Principes actif chargés dans les DC Beads [®] et les Hepaspheres [®]	- 53 -
Tableau 5- Paramètres pharmacocinétiques de l'irinotécan après chimioembolisation de l'artère pulmonaire par microsphères chargées en irinotécan et après injection directe dans l'artère pulmonaire d'irinotécan libre	- 77 -

INTRODUCTION GENERALE

L'embolisation est une technique de radiologie interventionnelle, introduite dans les années 1960, qui consiste à injecter, au moyen d'un cathéter, un agent d'occlusion vasculaire afin d'obtenir l'oblitération d'une ou plusieurs artères alimentant une lésion. La chimioembolisation est apparue dans les années 1980 et consiste en l'injection intra-artérielle d'un principe actif et d'un agent d'occlusion vasculaire. Elle est indiquée dans le traitement des tumeurs malignes du foie. Elle a pour objectif d'une part d'obtenir une ischémie tumorale et d'autre part de concentrer le principe actif au niveau de la tumeur en réduisant la toxicité systémique de ce dernier.

La technique de chimioembolisation a considérablement évolué avec l'apparition, ces dix dernières années, des microsphères calibrées chargeables en principe actif. Ces microsphères reprennent les avantages des microsphères calibrées utilisées en embolisation, notamment le contrôle du niveau d'occlusion et de la répartition des microsphères dans le réseau vasculaire tumoral par un choix approprié de la taille de la microsphère, de la dilution et de la sélectivité du cathétérisme. Le chargement du principe actif directement dans la microsphère calibrée améliore les performances de la chimioembolisation classique en permettant une libération ciblée et contrôlée du principe actif au sein de la tumeur.

Les microsphères calibrées chargeables en principe actif ont été principalement utilisées dans la chimioembolisation hépatique. De nombreuses études ont montré que ces microsphères chargées en doxorubicine remplissaient leur double fonction d'embolisation et de vectorisation du principe actif.

La chimioembolisation par microsphères n'a jamais été étudiée dans le poumon. Deux applications potentielles semblent particulièrement intéressantes : les tumeurs pulmonaires et les hémoptysies massives. L'utilisation de microsphères chargées en anticancéreux permettrait une imprégnation de la tumeur pulmonaire maligne par l'anticancéreux, tout en évitant la toxicité systémique de ce dernier. Dans le cas des hémoptysies massives dont le premier traitement est l'embolisation bronchique, l'utilisation de microsphères chargées en inhibiteur du remodelage vasculaire permettrait d'éviter les récives dues à une recanalisation observée après embolisation.

L'objectif de nos travaux était de valider, à l'étape préclinique sur des modèles d'embolisation du poumon chez la brebis, les performances de libération du principe actif, à partir des microsphères de chimioembolisation, au niveau systémique et au niveau tissulaire.

Il doit être prouvé qu'avec la chimioembolisation par microsphères appliquée au poumon, les concentrations systémiques du principe actif sont inférieures à celles d'une injection intra-artérielle du principe actif seul et qu'elles ne génèrent pas de toxicité, que le principe actif est libéré de la microsphère en quantité suffisante dans le tissu, qu'aucun effet secondaire majeur n'apparaît localement ou sur le plan général.

Le premier volet de ce travail positionne le sujet sur la base d'une revue bibliographique des travaux antérieurs. Le premier chapitre expose les concepts de l'embolisation et de la chimioembolisation depuis le lipiodol et les particules non calibrées jusqu'aux microsphères calibrées et fonctionnalisées. Le deuxième chapitre rappelle d'une part, les caractéristiques des microsphères de chimioembolisation chargeables en principe actif notamment les principes de chargement et de libération de principe actif et d'autre part, les applications médicales actuelles de ces microsphères. Le troisième chapitre décrit l'intérêt d'une chimioembolisation par microsphères appliquée au poumon pour le traitement des tumeurs pulmonaires et des hémoptysies massives récidivantes.

Le second volet présente l'ensemble des travaux personnels expérimentaux, une discussion générale reprenant les principaux résultats obtenus et une conclusion sur nos travaux.

La première partie est consacrée à l'évaluation des microsphères de chimioembolisation chargées en irinotécan, proposé à visée antitumorale et constitue la partie la plus importante de ce travail. Nous présenterons successivement trois études réalisées chez la brebis : la première correspond à la mise au point et à la validation d'une méthode de dosage pour quantifier l'irinotécan dans le plasma et le tissu pulmonaire chez la brebis, les deux autres études correspondent à l'étude des performances de libération de l'irinotécan respectivement après chimioembolisation limitée à l'artère pulmonaire seule et chimioembolisation de l'artère pulmonaire combinée à une embolisation bronchique. Ces travaux ont abouti à la publication de deux articles scientifiques.

La seconde partie est consacrée aux microsphères de chimioembolisation chargées en sirolimus, proposé pour prévenir la recanalisation de l'artère bronchique responsable des récidives d'hémoptysies. Elle décrit les performances de libération du sirolimus dans un modèle d'hypervascularisation pulmonaire chez la brebis simulant les conditions d'une hémoptysie.

La troisième partie correspond à la discussion générale qui aborde la validité de nos principaux résultats, les performances des différentes techniques de chimioembolisation

pulmonaire présentées dans nos études et les performances des microsphères chargeables appliquées à la chimioembolisation du poumon.

La quatrième partie correspond à la conclusion générale et aux perspectives.

PRESENTATION DU SUJET

Chapitre 1

DE L'EMBOLISATION A LA CHIMIOEMBOLISATION avant l'ère des microsphères calibrées chargeables en principe actif

Introduite dans les années 1960, la technique d'embolisation a considérablement progressé avec l'évolution des agents d'embolisation non sphériques vers les microsphères calibrées. Ces agents d'embolisation ont rapidement été associés à des agents chimiques ou médicamenteux afin d'optimiser l'action thérapeutique au niveau local. On parle alors de chimioembolisation.

1.1 L'embolisation

1.1.1 Définition

L'embolisation est une technique médicale mini-invasive réalisée par voie percutanée et pratiquée par un radiologue interventionnel. Elle consiste à déposer localement un agent d'occlusion vasculaire, in situ (cas des spires métalliques par exemple) ou en flux libre (cas des particules), au moyen d'un cathéter ou d'un microcathéter placé par voie endovasculaire, afin d'obtenir l'oblitération d'une ou plusieurs artères alimentant une lésion. Elle est réalisée sous contrôle radioscopique. L'injection d'un produit de contraste iodé permet de visualiser les vaisseaux et de vérifier la réduction du lit vasculaire et l'occlusion des vaisseaux embolisés (Figure 1). Elle s'adresse schématiquement à trois types de processus pathologiques : les hémorragies afin de juguler le saignement, les tumeurs hypervasculaires et les malformations vasculaires afin d'obtenir une nécrose ou une dévascularisation pré-opératoire. Elle concerne généralement des artères de quelques dizaines de micromètres (μm) à quelques millimètres (mm).

1.1.2 Agents d'embolisation

Les agents d'occlusion vasculaire utilisés sont très variés dans leur nature (polymères naturels ou synthétiques, agents chimiques) et leur forme physico-chimique (solution, gel, filament, particules...) (Figure 2). Le choix de l'agent dépend principalement de la

pathologie, de la taille de la lésion à occlure et du type d'occlusion souhaitée (temporaire ou durable, distale ou proximale).

Les premières études cliniques sur l'embolisation thérapeutique ont été publiées dans les années 1960 pour le traitement des malformations artérioveineuses (Speakman 1964 ; Ishimori 1967). A partir de ces années et jusque dans les années 1990, les embolisations ont été majoritairement réalisées avec des particules de gélatine, principalement pour l'embolisation d'hémostase, ou des particules non sphériques de polyvinyl-alcool (PVA), principalement pour l'embolisation des tumeurs.

L'inconvénient majeur de ces particules est l'insuffisance de précision dans leur taille rendant leur calibration réelle impossible et par conséquent un ciblage difficile de l'occlusion. Leur tendance à s'agglomérer peut aboutir à des occlusions de vaisseaux dont le diamètre peut être 5 à 10 fois supérieur à la taille annoncée de la particule (Laurent 2006).

Les concepts d'embolisation ont été repensés avec l'apparition, dans les années 1990, des microsphères calibrées. Leur arrivée a permis d'adapter la taille des microsphères à la taille des vaisseaux à occlure, permettant une embolisation ciblée et précise. Celles qui sont utilisées aujourd'hui en pratique courante sont des microsphères non biodégradables. Elles ont un diamètre compris entre quelques dizaines de μm jusqu'à un mm et sont calibrées par tranche de quelques centaines de μm (40-120, 100-300, 300-500, ..., 900-1200 μm). En ajustant la quantité de microsphères injectées (pourcentage de réseau occlus) et leur taille (distalité de l'occlusion), il est possible de programmer et de contrôler l'étendue et la distalité du lit vasculaire pathologique fermé. On peut par exemple programmer et contrôler l'importance de la nécrose induite dans le cas des tumeurs; fermer sélectivement des vaisseaux pathologiques de gros calibre en respectant les petites branches normales, ou encore fermer proximale des vaisseaux dans une hémorragie, afin d'éviter une nécrose par embolisation distale (Laurent 2004).

Actuellement, les microsphères calibrées sont les agents d'embolisation les plus sûrs et les plus efficaces (Beaujeux 1996 ; Laurent 1996). L'évolution de ces microsphères calibrées, passe par une amélioration de leurs fonctionnalités, leur visualisation pour le suivi en imagerie, la préservation de la fonctionnalité des artères dans les cas d'embolisation d'hémostase et leur capacité à être chargées pour libérer in situ des principes actifs. Les principales particules et microsphères utilisées en embolisation sont représentées dans le Tableau 1.

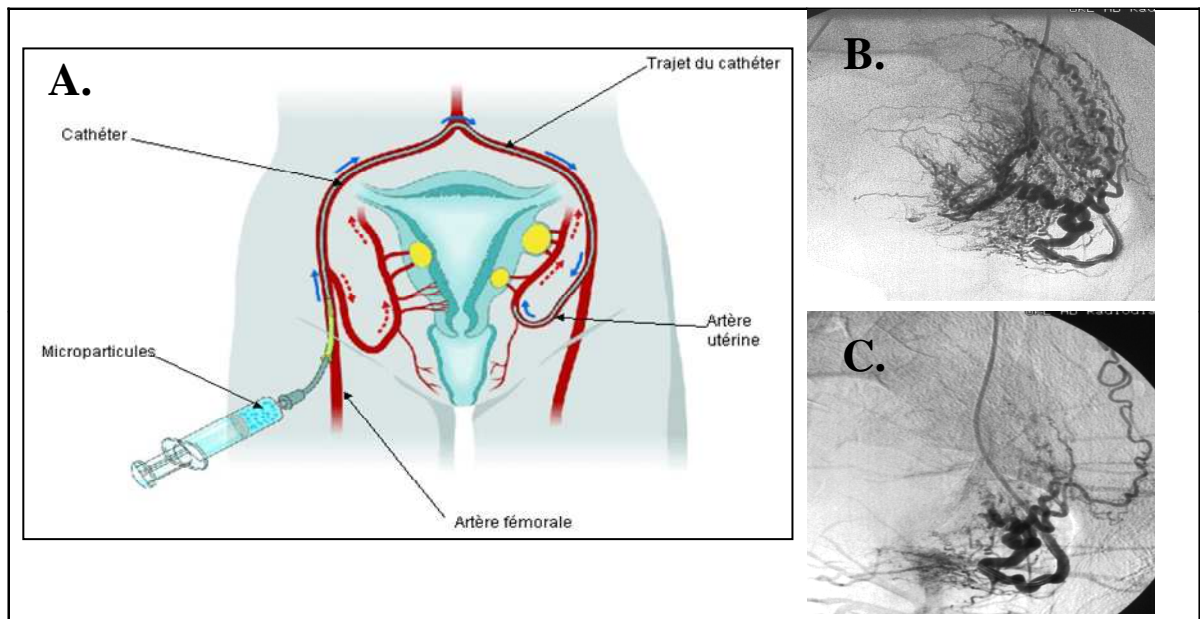


Figure 1- Embolisation d'un fibrome utérin (Canadian Association of Radiologists)

A) technique d'embolisation ; B) angiographie d'un fibrome utérin avant embolisation ; C) angiographie d'un fibrome utérin après embolisation

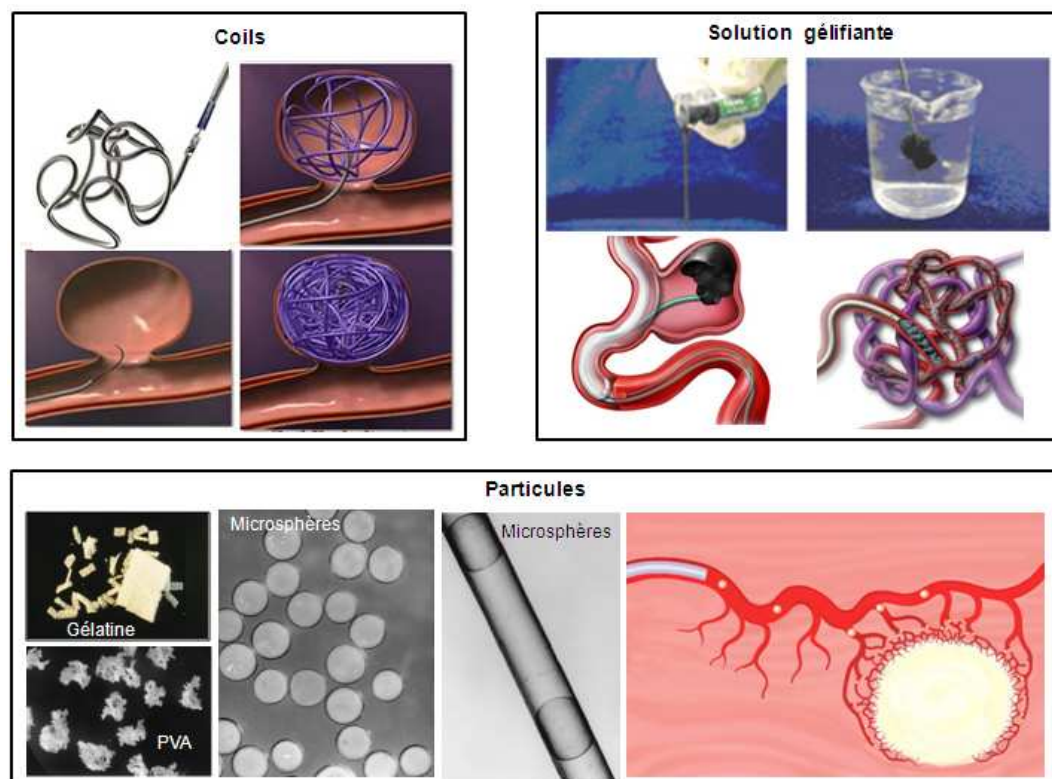

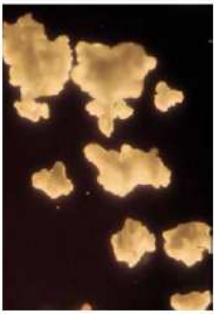

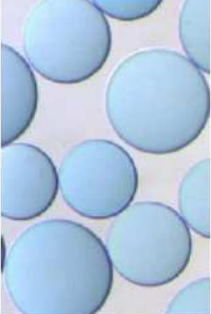
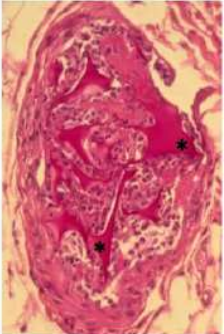
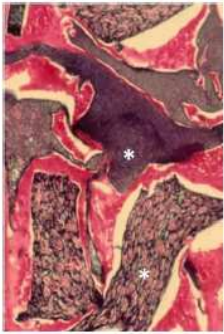

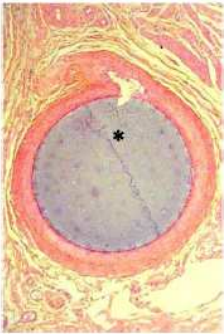


Figure 2- Illustration des trois principaux types d'agents d'embolisation et de leurs applications (Namur 2009 a)

A) coils (spires métalliques) et anévrisme intra-crânien ; B) solution gélifiante et anévrisme aortique, malformation artérioveineuse ; C) particules et tumeur hypervasculaire

Tableau 1- Principales particules et microsphères utilisées pour l'embolisation (Laurent 2006)

Type d'embole	Non sphérique		Sphérique	
Matériaux	Gélatine	PVA	Acrylique	PVA
Noms commerciaux	Spongel® Gelfoam® Curaspon®	Ivalon® Contour®	Embosphere™	Bead Block™
Mise sur le marché	1960s	1975	1993	2003
Principales propriétés	<ul style="list-style-type: none"> • Occlusion proximale • Résorbé jours/sem. 	<ul style="list-style-type: none"> • Occlusion proximale • Résorbé mois 	<ul style="list-style-type: none"> • Occlusion distale • Non résorbable 	<ul style="list-style-type: none"> • Occlusion distale • Non résorbable
Photographies des produits				
Photographies de coupes histologiques avec emboles (*)				

1.2 La chimioembolisation

1.2.1 Principe

La chimioembolisation consiste à injecter successivement ou simultanément un principe actif et un agent d'occlusion vasculaire de manière la plus sélective possible dans les artères nourricières du processus pathologique. Le principe actif peut être vectorisé sous forme d'émulsion avec un agent huileux, le lipiodol ou directement par l'agent d'occlusion vasculaire. L'association du principe actif avec l'agent d'occlusion vasculaire a pour objectif d'une part d'obtenir une ischémie de la zone pathologique et d'autre part d'optimiser l'effet thérapeutique du principe actif en le concentrant et en prolongeant son temps de résidence au niveau du territoire embolisé. La chimioembolisation doit, pour être efficace, satisfaire deux conditions :

- une libération locale du principe actif pour réduire la toxicité systémique de ce dernier,
- une libération contrôlée du principe actif.

La libération locale du principe actif est liée à la technique de chimioembolisation. La libération contrôlée du principe actif est liée aux performances du vecteur du principe actif. Une libération contrôlée doit permettre l'obtention de concentrations thérapeutiques au niveau du tissu cible et maintenir ces concentrations pendant une durée définie en fonction du type du principe actif chargé et de l'effet recherché sur le tissu cible.

1.2.2 Intérêt clinique

La chimioembolisation a historiquement été développée dans les années 80 pour le traitement des tumeurs hépatiques non opérables dont l'apport artériel est en général prédominant. Le traitement du carcinome hépatocellulaire (CHC) et des métastases hépatiques non résécables est encore aujourd'hui sa principale indication. Plusieurs études ont montré un bénéfice de la chimioembolisation dans le traitement des tumeurs hépatiques par rapport à un traitement symptomatique (Llovet 2002 ; Lo 2002) et par rapport à la chimiothérapie seule réalisée par voie intraveineuse (IV) ou intra-artérielle (IA) (Nakamura 1989 ; Raoul 1992 ; Hong 2005).

La chimioembolisation, comparée à la chimiothérapie administrée par voie IV, a permis d'obtenir localement des concentrations plus importantes en médicament et de réduire la toxicité systémique de ces médicaments. Elle a permis l'utilisation de médicaments comme la

doxorubicine et le cisplatine dont l'efficacité est limitée par voie IV en raison de leur toxicité respectivement cardiaque et rénale (Varela 2007 ; Grosso 2008 ; Lammer 2010 ; Seki 2011).

La procédure est en général bien tolérée. Le syndrome post chimioembolisation n'est pas à proprement dit une complication mais un effet quasi attendu de la chimioembolisation hépatique. On l'observe dans 50% à 90% des cas. Il persiste en général de 2 à 4 jours et se manifeste par une fièvre, des douleurs abdominales, des nausées et vomissements. L'altération des fonctions hépatiques est transitoire et se manifeste par des transaminases élevées parfois un ictère ou une ascite. La mortalité est exceptionnelle (0,5% dans une série de plus de 8000 patients) et est liée le plus souvent à une insuffisance hépatique ou au cancer lui-même (Takayasu 2006).

1.2.3 Les différentes techniques

La chimioembolisation, en 30 ans, a considérablement évolué. Initialement réalisée avec du lipiodol ou avec des particules expérimentales préchargées en principe actif, elle utilise aujourd'hui des microsphères calibrées commercialisées qui ont fait leur preuve dans le domaine de l'embolisation et qui ont évolué ces dix dernières années pour devenir des microsphères calibrées chargeables en principe actif.

i. La chimioembolisation lipiodolée

Le lipiodol est un agent huileux iodé utilisé en radiologie depuis les années 80 comme produit de contraste pour l'imagerie diagnostique et interventionnelle. Son utilisation en chimioembolisation repose sur deux de ses propriétés : sa viscosité et sa concentration au niveau du tissu tumoral hépatique (Nakakuma 1985 ; Yumoto 1985). Mélangé à des médicaments et administré via l'artère hépatique pour le traitement de certaines tumeurs, il permet, en raison de sa viscosité, de ralentir le passage du médicament dans les artérioles et d'augmenter ainsi le temps de résidence du médicament dans la tumeur. L'ajout de particules d'embolisation à ce mélange lipiodol-médicament a pour objectif de réduire le flux artériel et d'augmenter davantage l'exposition de la tumeur au médicament (Raoul 1992). Le lipiodol permet également, selon certaines études, une rémanence du médicament dans la tumeur qui peut durer plusieurs mois (Ohishi 1985 ; Sasaki 1987 ; Katagiri 1989 ; Konno 1990 ; Kan 1997).

La chimioembolisation lipiodolée associe l'injection IA d'un principe actif sous forme d'une émulsion avec du lipiodol, utilisé ici comme vecteur du principe actif, à une occlusion artérielle par un agent d'embolisation. Elle est appelée également chimioembolisation conventionnelle. Des études ont montré que la chimioembolisation lipiodolée permettait une réduction de la concentration du principe actif au niveau de la circulation systémique et une augmentation de la concentration de ce dernier dans la tumeur, par comparaison à une injection IA de ce principe actif seul (Nakamura 1989 ; Raoul 1992 ; Hong 2005) (Figure 3). Elle a montré chez l'homme un bénéfice significatif en termes de survie dans le traitement du carcinome hépatocellulaire non opérable (Camma 2002 ; Llovet 2002 ; Lo 2002 ; Llovet 2003).

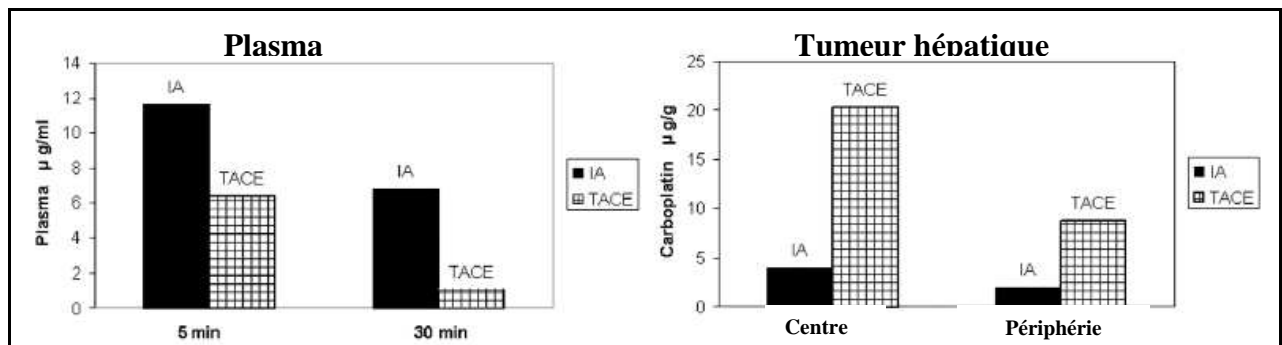


Figure 3- Concentration en carboplatine dans le plasma et dans la tumeur hépatique après injection intra-artérielle (IA) seule versus chimioembolisation lipiodolée (TACE) chez des lapins porteurs de tumeurs hépatiques VX2 (Hong 2005)

Cette technique, bien qu'efficace cliniquement, n'est pas sans risque et présente des limites liées d'une part à l'instabilité et au manque de reproductibilité de l'émulsion du principe actif avec le lipiodol et d'autre part à l'hétérogénéité de la fixation du lipiodol sur le tissu tumoral. L'émulsion du principe actif avec le lipiodol est une émulsion instable qui se dissocie rapidement en une phase huileuse et une phase aqueuse (Konno 1990) entraînant une distribution non contrôlée du principe actif qui dépend davantage de la répartition du lipiodol dans le tissu que de l'emplacement des particules d'embolisation dans le réseau vasculaire. La variabilité dans la nature de l'émulsion (eau dans huile, huile dans eau) et dans la taille des gouttelettes formées (30 à 120µm) participent également à cette distribution non contrôlée du principe actif et du lipiodol dans le réseau vasculaire tumoral (de Baere 1995 ; Cay 1996). Plusieurs études ont en effet montré qu'une fraction importante de la dose injectée de lipiodol pouvait être retrouvée dans le poumon (Raoul 1988 ; Perring 1994 ; de Baere 1996), avec un

risque d'embolie pulmonaire (Czauderna 2005 ; Shiah 2005). Par ailleurs, la fixation du lipiodol sur le tissu tumoral n'est pas toujours homogène et peut être absente dans certaines tumeurs hépatiques pour lesquelles la chimioembolisation lipiodolée n'est pas efficace (Van Beers 1989 ; Poyanli 2001 ; Lee 2002). Appliquée aux métastases pulmonaires non résécables, la chimioembolisation lipiodolée a montré une efficacité limitée en raison d'une faible fixation du lipiodol dans 75% des tumeurs (Vogl 2008). La chimioembolisation lipiodolée ne permet donc pas un ciblage optimal des tumeurs ni une distribution contrôlée du principe actif.

ii. La chimioembolisation par particules préchargées en principe actif

La chimioembolisation par particules préchargées en principe actif a été développée de façon concomitante à la chimioembolisation lipiodolée, dans les années 80 au Japon par l'équipe de Kato. Il s'agissait de microencapsulation d'anticancéreux dans des particules d'éthyl-cellulose (Kato 1981a ; Okamoto 1985).

Les essais *in vitro* puis *in vivo* sur des tumeurs expérimentales ont montré que les particules ainsi préchargées en anticancéreux avaient la propriété de libérer lentement le principe actif qui restait biologiquement actif (Kato 1980 ; Okamoto 1986). Ces microcapsules préchargées, utilisées chez des patients dans le traitement de différents cancers, ont montré par rapport à une injection IA ou IV du principe actif non encapsulé : une diminution du pic plasmatique et une augmentation de la concentration intratumorale du principe actif, un bénéfice en termes de taux de réponse tumorale et de survie (Kato 1981a ; Kato 1981b ; Okamoto 1985 ; Goldberg 1991 ; Kato 1996).

Depuis Kato, de nombreuses études expérimentales sur la chimioembolisation par particules préchargées ont été réalisées (Tableau 2). Les études cliniques sont peu nombreuses et sont souvent réalisées à titre de recherche clinique, évaluant les particules expérimentales et préchargées en principe actif. Elles restent limitées à des séries de cas.

La calibration non précise de ces particules préchargées et leur taille souvent trop petite pour permettre une embolisation efficace (Bastian 1998) ne permettent pas une chimioembolisation contrôlée et ciblée. Aucune de ces particules préchargées à notre connaissance n'a été commercialisée.

Tableau 2- Principales études sur la chimioembolisation par particules préchargées en principe actif (Lewis 2010)

Médicament	Type de microsphère	Taille (μm) / Chargement du médicament (%)	Type d'étude	Reference
Mitomycin C	Albumin	$45 \pm 8 \mu\text{m}$	Clinical, HCC 19 patients vs. infusion	Fujimoto <i>et al.</i> (1985)
5-FU	Carnauba wax		<i>In vitro</i>	Benita <i>et al.</i> (1986)
Cisplatine	Poly(lactic acid)		<i>In vitro</i>	Spentehauer <i>et al.</i> (1986)
Mitomycin C	Albumin	$45 \pm 8 \mu\text{m}$	Preclinical/clinical, VX-2 model, CRCm 19 patients vs. infusion	Endoh (1987)
Doxorubicin	Albumin		Clinical, breast, 5 patients	Asaishi <i>et al.</i> (1988)
Doxorubicin	Albumin	$15\text{--}20 \mu\text{m}$, 1%	Preclinical, renal study	Kerr <i>et al.</i> (1988)
Doxorubicin	Albumin or casein	$15\text{--}30 \mu\text{m}$	Preclinical, ^{125}I radiolabelled study	Willmott <i>et al.</i> (1989)
Aclarubicin	Poly(lactic acid)	$200 \mu\text{m}$, 10%	Clinical, 62 patients, 50–100 mg dose	Ichihara <i>et al.</i> (1989)
CPT	Albumin		Preclinical, rats	Wu (1990)
NA	Poly(lactic acid)		<i>In vitro</i>	Flandroy <i>et al.</i> (1990)
Cisplatine	Ethylcellulose		Preclinical, rats	Wang (1991)
Methotrexate	Gelatin		Preclinical, rats	Chen <i>et al.</i> (1991)
Aclarubicin	Poly(lactic acid)		Clinical, 67 patients + cisplatine/ Lipiodol	Beppu <i>et al.</i> (1991)
Cisplatine	Albumin+chitin/ chitosan		Preclinical, VX-2 model	Kyotani <i>et al.</i> (1992)
Cisplatine	Albumin+chitin/ chitosan		Preclinical, dog PK	Nishioka <i>et al.</i> (1992)
Cisplatine	Ethylcellulose		Preclinical, dog PK	Wei <i>et al.</i> (1992)
Cisplatine	Albumin	$56 \mu\text{m}$, 14%	Preclinical, <i>in vitro</i> + rabbits	Cheng <i>et al.</i> (1993)
Methotrexate	Albumin	$40 \mu\text{m}$	Preclinical, dog	Xu and Zhu (1993)
Cisplatine	Albumin+chitin		Preclinical, VX-2 model	Nishioka <i>et al.</i> (1993)
Doxorubicin	Carboxymethyl dextran		Preclinical, dog PK	He <i>et al.</i> (1993)
Cisplatine	Poly(lactic acid)		Preclinical, <i>in vitro</i> + <i>in vivo</i>	Liu <i>et al.</i> (1993)
Daunomycine	Albumin	$52 \mu\text{m} \pm 16$	Preclinical, mouse ascites model	Wang <i>et al.</i> (1994)
Cisplatine	Albumin+chitin	$20\text{--}37 \mu\text{m}$	Preclinical, VX-2 model	Nishioka <i>et al.</i> (1994)
Cisplatine	Poly(benzyl glutamate)	$100\text{--}200 \mu\text{m}$, 44%	<i>In vitro</i>	Li <i>et al.</i> (1994)
Cisplatine	Albumin	$59\text{--}256 \mu\text{m}$, 51%	Preclinical, <i>in vitro</i> + rabbit PK	Zhang <i>et al.</i> (1995)
Cisplatine	Chitosan		Preclinical, dogs	Wang <i>et al.</i> (1995)
Cisplatine	Ethylcellulose		Preclinical, dog PK	Yang <i>et al.</i> (1995)
Taxol	Ethylene vinyl acetate/ Poly(lactic acid) blend	$10\text{--}30 \mu\text{m}$, $30\text{--}100 \mu\text{m}$, $10\text{--}13\%$	<i>In vitro</i> + CAM assay	Burt <i>et al.</i> (1995)
Mitoxantrone	Ethylcellulose	$110 \mu\text{m} \pm 38$, 12.5%	Preclinical, dogs	Zhang <i>et al.</i> (1996)
Taxol	Poly(lactic/glycolic acid)		<i>In vitro</i>	Wang <i>et al.</i> (1996)
Rifampicine	Poly(hydroxy butyrate)		<i>In vitro</i>	Kassab <i>et al.</i> (1997)
Mitoxantrone	Carboxymethyl starch		Preclinical, rabbit PK	Zhang <i>et al.</i> (1998)
Cisplatine	Albumin		Clinical, 7 patients	Li <i>et al.</i> (1999)
5-FU	Chitosan		<i>In vitro</i>	Denkbass <i>et al.</i> (1999)
Epirubicin	Poly(lactic acid)		Preclinical, rabbit PK	Fujiwara <i>et al.</i> (2000)
Pingyangmycin	Gelatin		Preclinical, <i>in vitro</i> + rabbits	Wu <i>et al.</i> (2003)
Mitomycin C	Poly(lactic/glutamic acid)		Preclinical, rats	Qian <i>et al.</i> (2003)
Mitomycin C	Alginate/chitosan	$100\text{--}400 \mu\text{m}$, 65%	<i>In vitro</i>	Misirli <i>et al.</i> (2005)
Doxorubicin	Alginate		Preclinical, pigs	D. Liu <i>et al.</i> (2006)
NA	Alginate/chitosan	$100\text{--}400 \mu\text{m}$	Preclinical, <i>in vitro</i> + rabbits	Eroglu <i>et al.</i> (2006)
Norcantharidin	Poly(lactic/glycolic acid)/alginate		Preclinical, rats	X. Liu <i>et al.</i> (2006)
Doxorubicin	Chitosan	10%	Preclinical, VX-2 model	Kim <i>et al.</i> (2007)

Chapitre 2

LES MICROSPHERES DE CHIMIOEMBOLISATION CHARGEABLES EN PRINCIPE ACTIF

Les microsphères de chimioembolisation chargeables reprennent les avantages des microsphères calibrées utilisées en embolisation avec une fonctionnalité supplémentaire, celle de pouvoir se charger de façon extemporanée en différentes solutions de principes actifs par un mécanisme le plus souvent ionique. Ces microsphères ont été développées ces dernières années afin d'optimiser la chimioembolisation et permettre une libération ciblée et contrôlée du principe actif au sein du territoire pathologique. Sont commercialisées actuellement des microsphères de chimioembolisation calibrées, non dégradables et chargeables par différents principes actifs dont la doxorubicine et l'irinotécan, médicaments pour lesquels elles ont obtenu le marquage CE dans l'indication des tumeurs hépatiques. Les études précliniques et cliniques ont montré le bénéfice de ces microsphères en termes de rétention du principe actif dans la tumeur, réduction des concentrations systémiques, tolérance et réponse tumorale par rapport à la chimioembolisation lipiodolée (Hong 2006 ; Varela 2007 ; Dhanasekaran 2010). Aujourd'hui, à notre connaissance, ces microsphères de chimioembolisation sont les seuls dispositifs médicaux implantables à proposer un chargement extemporané du principe actif, les autres dispositifs étant tous préchargés en principe actif.

2.1 Caractéristiques des microsphères de chimioembolisation calibrées non dégradables et chargeables en principe actif

2.1.1 Caractéristiques idéales

Les microsphères de chimioembolisation doivent permettre à la fois une embolisation ciblée au niveau du territoire pathologique et une libération locale contrôlée du principe actif. Le principe actif ne doit pas modifier les performances de l'agent d'embolisation lors du chargement et de l'éluion. Le cahier des charges de ces microsphères de chimioembolisation doit contenir à la fois les critères d'un bon agent d'embolisation et ceux d'une libération contrôlée de principe actif. Les caractéristiques idéales de ces microsphères de chimioembolisation sont résumées dans le Tableau 3.

Tableau 3- Caractéristiques idéales des microsphères de chimioembolisation (Lewis 2010 ; Laurent 2006)

Attribut		Caractéristiques idéales
Microsphère	Calibration	Contrôle du niveau d'occlusion et de la répartition dans le réseau vasculaire
	Compressibilité	Passage dans les microcathéters
	Elasticité	Reprise de la forme initiale sphérique lors de la sortie du cathéter
	Hydrophilie	Absence d'adhésion des microsphères au cathéter (hydrophobe) et de formation d'agglomérats Mise en suspension facile dans des solutés injectables (sérum physiologique, produit de contraste...)
	Biocompatibilité	Eviter une réaction inflammatoire chronique ou une immunisation contre la microsphère
Compatibilité microsphère – principe actif		Stabilité du principe actif lors de son chargement et de sa libération Pas d'altération de la microsphère en présence du principe actif
Principe actif	Type de principe actif	Effet thérapeutique local Action si possible sur une population cellulaire cible
	Dose de principe actif	Concentrations thérapeutiques pour l'effet recherché
	Profil de libération du principe actif	Libération du principe actif uniquement au niveau de la cible et de manière contrôlée (maîtrise de la cinétique de libération) Diffusion du principe actif dans le tissu cible

2.1.2 Mécanismes de chargement extemporané du principe actif

Il existe actuellement deux modes de chargement extemporané du principe actif dans les microsphères de chimioembolisation. Un mode passif : l'absorption qui concerne généralement les microsphères sous forme sèche et un mode actif : l'échange ionique qui concerne les microsphères en suspension dans une solution saline. La concentration du principe actif après chargement dans les microsphères est généralement exprimée en quantité de principe actif par mL de microsphères.

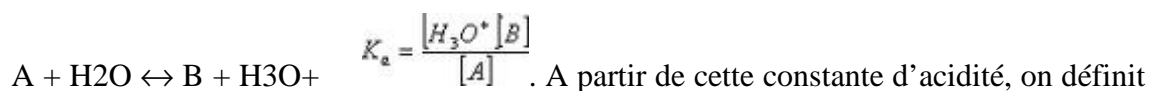
i. Absorption

Le chargement par absorption est un phénomène passif qui ne dépend pas de l'affinité entre la microsphère et le principe actif mais de la limite de solubilité du principe actif dans la solution aqueuse de chargement. La microsphère se comporte comme une « éponge ». La capacité maximale de chargement correspond à la quantité maximale de principe actif pouvant être soluble dans la solution de chargement. La répartition du principe actif est homogène dans la microsphère avec ce type de chargement à condition que le principe actif puisse pénétrer facilement dans la microsphère à travers ses mailles.

ii. Echange ionique

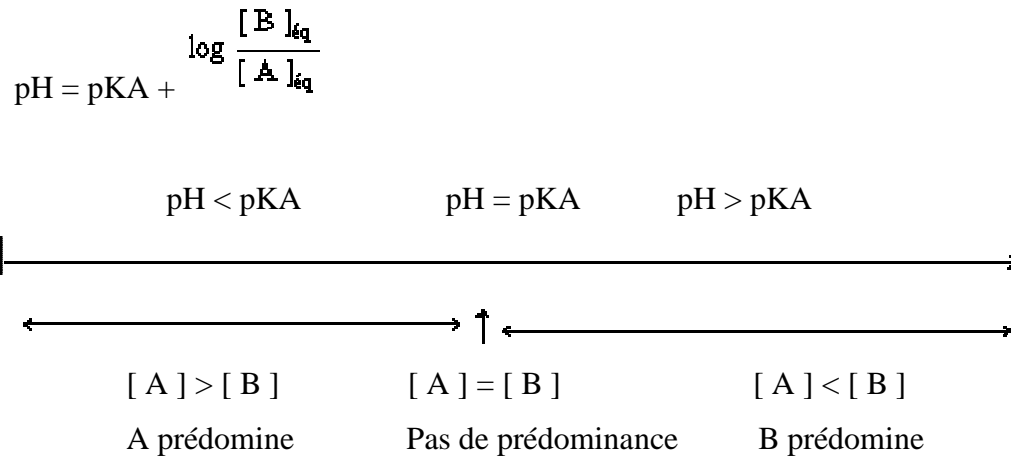
* Potentiel hydrogène (pH) et Constante d'acidité (Ka, pKa)

L'échange ionique est conditionné par deux principaux paramètres : le potentiel hydrogène (pH) et la constante d'acidité exprimée à travers le pKa. Le pH est un indice qui mesure l'activité de l'ion hydrogène dans la solution. C'est un indicateur de l'acidité (pH < 7) ou de l'alcalinité (pH > 7) de la solution. La constante d'acidité Ka permet de caractériser la force relative d'un acide. Elle est définie pour chaque couple acide (A) / base (B) et correspond à la constante d'équilibre de la réaction de l'acide sur l'eau :



A partir de cette constante d'acidité, on définit le pKa (pKa = -log₁₀Ka) pour classer la force d'un acide. Plus le pKa est petit, plus l'acide est fort et sa base conjuguée faible, plus l'acide est fortement ionisé.

A partir du pH et du pKa, on peut prévoir la prédominance de l'acide ou de la base conjuguée en fonction du pH de la solution.



Les principes actifs vont être caractérisés par une ou plusieurs constantes d'acidité selon leur nombre de fonctions acide-base et seront sous des formes ionisées différentes selon le pH de la solution de chargement. Les performances du chargement d'un principe actif par mécanisme ionique vont donc dépendre de la forme ionisée du principe actif qui va prédominer au pH de la solution de chargement. Les solutions de principe actif utilisées pour le chargement des microsphères de chimioembolisation sont le plus souvent des solutions injectables commerciales. La valeur du pH de ces solutions dépend du médicament et est comprise généralement entre 4 et 8.

* [Microsphères fonctionnalisées](#)

Le chargement du principe actif par échange ionique ne peut être réalisé que sur des microsphères d'embolisation « fonctionnalisées ». Les fonctions greffées dans la microsphère vont pouvoir « fixer » le principe actif par interactions ioniques. Ces fonctions greffées sont ionisées et sont « neutralisées » par un contre-ion de la solution. La cinétique de chargement est régie par le déplacement par compétition du contre-ion par le principe actif.

Actuellement, les fonctions greffées sur les microsphères de chimioembolisation sont des groupements chargés négativement dans les conditions de chargement recommandées par le fabricant. Il s'agit soit de groupements sulfonates SO_3^- , soit de groupements carboxylates COO^- (Figure 4). Les principes actifs qui peuvent être chargés dans ces microsphères doivent donc être chargés positivement, cas de la majorité des anticancéreux conventionnels en solution comme par exemple la doxorubicine (Figure 5). Ces microsphères fonctionnalisées permettent de charger une quantité plus importante de principe actif par comparaison avec les microsphères non fonctionnalisées qui chargent le principe actif par absorption. A titre

d'exemple, en présence d'une solution contenant 25 mg de doxorubicine, les microsphères fonctionnalisées peuvent charger la totalité des 25 mg alors que les microsphères non fonctionnalisées ne peuvent en charger qu'entre 2 mg et 13 mg (Lewis 2006).

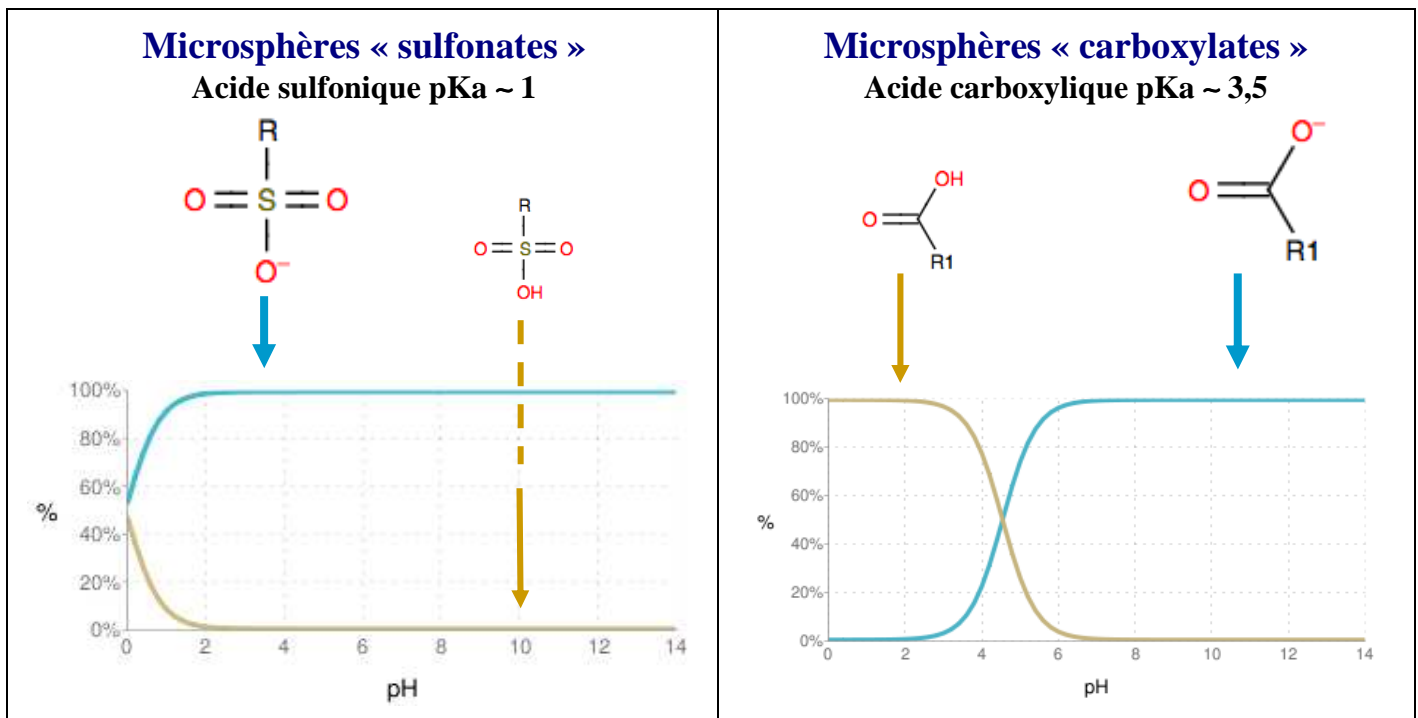


Figure 4- Fonctions anioniques greffées dans les microsphères de chimioembolisation et impliquées dans le chargement du principe actif (Chemicalize). Ces fonctions restent négatives quel que soit le pH de la solution de chargement pour les microsphères porteuses de groupements sulfonates et à partir de pH=4 pour les microsphères porteuses de groupements carboxylates.

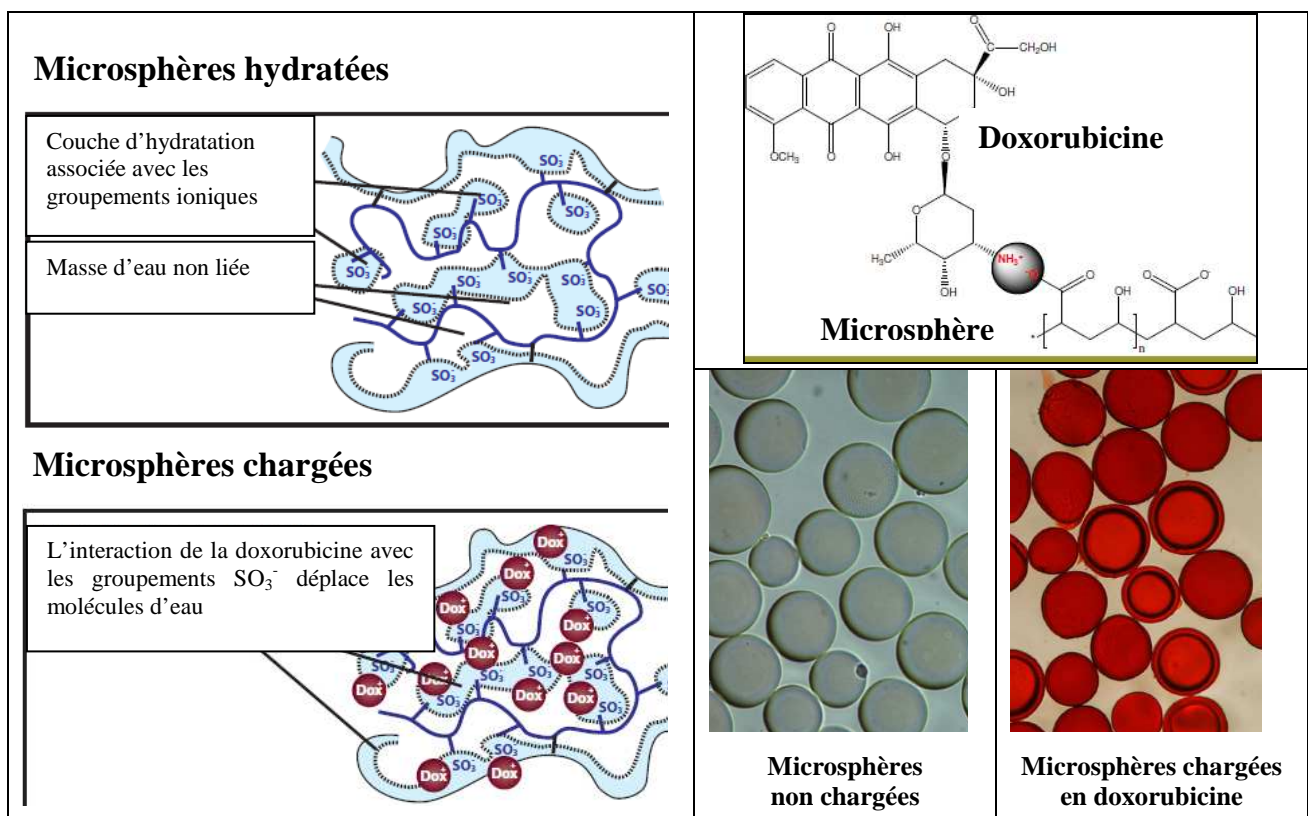


Figure 5- Chargement de la doxorubicine dans les microsphères de chimioembolisation par interactions ioniques (Biocompatibles ; Lewis 2006)

* Mode opératoire du chargement


Le chargement doit se faire dans des conditions aseptiques contrôlées. Un exemple de mode opératoire du chargement extemporané de la doxorubicine par échange ionique dans des microsphères en suspension est présenté dans la Figure 6. En pratique, le chargement du principe actif dans la microsphère dure en moyenne 2 heures.

Chargement de DC Bead® effectué avec de la DOXORUBICINE EN POUDRE

Dose de doxorubicine requise	Nombre de flacons de doxorubicine en poudre (50 mg)	Nombre de flacons de DC Bead
75 mg	2	1
100 mg	2	2
150 mg	3	2

Stabilité physico-chimique

DC Bead chargée avec de la doxorubicine (75 mg/2 ml)	DC Bead 100-700 µm
14 jours (à 2-8 °C)	
DC Bead chargée avec de la doxorubicine, avec produit de contraste non ionique	7 jours (à 2-8 °C)




Après le chargement, la solution dans la seringue conserve en partie sa coloration rouge comme illustré, ce qui est normal et n'indique pas l'échec du chargement de DC Bead®.

Temps de chargement pour 37,5 mg maximum de doxorubicine par ml de DC Bead (75 mg par flacon)			
Assimilation de la doxorubicine	100-300 µm	300-500 µm	500-700 µm
90 %*	30 minutes	45 minutes	60 minutes
98 %*	60 minutes	90 minutes	120 minutes

* Tolérance de ±3 %
Le chargement et la préparation de DC Bead doivent se faire en suivant une procédure aseptique stricte et sous conditions contrôlées.

Étape 1


Retirer le capuchon du (des) flacon(s) de DC Bead sans retirer la partie métallique autour du bouchon. Transférer le contenu de chaque flacon de DC Bead dans une seringue de 20-30 ml à l'aide d'une aiguille de calibre 18 (ou équivalent).



Étape 2

Étape 3

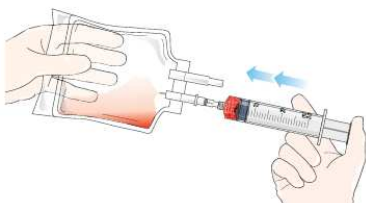
Reconstituer chaque flacon de poudre de doxorubicine à l'aide de 2 ml d'eau stérile pour injection (NE PAS utiliser de chlorure de sodium). Bien mélanger.



Étape 4

Étape 5

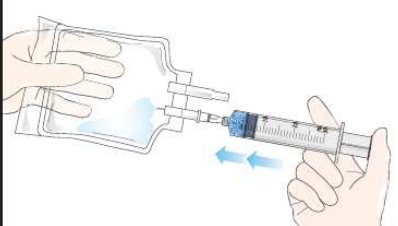
Une fois le temps de chargement écoulé, expulser le liquide en excès de la seringue. Utiliser une aiguille à filtre de 5 microns si nécessaire pour plus de facilité.



Étape 6

Étape 2


Expulser la solution de conditionnement en excès de la seringue. Utiliser une aiguille à filtre de 5 microns si nécessaire pour plus de facilité.



Étape 4

Étape 4


Aspirer dans la seringue contenant la DC Bead la dose requise de doxorubicine. Lors du chargement, agiter délicatement le mélange à plusieurs reprises.



Étape 6

Étape 6

Pour préparer la DC Bead chargée pour l'injection, ajouter 5 à 10 ml de produit de contraste non ionique par ml de DC Bead et mélanger délicatement pour obtenir une bonne suspension. Injecter la solution à une vitesse de 1 ml par minute.



Étape 6

Figure 6- Mode opératoire du chargement de la doxorubicine dans des microsphères de chimioembolisation (Biocompatibles)

Le mode opératoire peut avoir une influence sur les performances de chargement et sur la structure des microsphères de chimioembolisation présentées sous forme sèche selon que les microsphères soient préhydratées ou non avant le chargement, selon la nature des solutions de préhydratation et de dissolution de la doxorubicine lyophilisée (Figure 7)(Liu 2011).

A)	Solution de préhydratation des microsphères SAP	Solution de reconstitution de la doxorubicine lyophilisée	Taux de Chargement de la doxorubicine
	0.9% saline	0.9% saline (10 mL)	88.4%
	None	0.9% saline (10 mL)	83.1%
	Contrast (10 mL)	0.9% saline (10 mL)	59.8%
	14.3% saline (2.5 mL)	0.9% saline (10 mL)	87.6%
	0.9% saline (10 mL)	Sterile water (4 ml)	82.4%
	None	Sterile water (4 ml)	51.3%
	Contrast (10 mL)	Sterile water (4 ml)	88.4%
	14.3% saline (2.5 mL)	Sterile water (4 ml)	***
	0.9% saline (10 mL)	Presolubilized (25 mL)	87.7%
	None	Presolubilized (25 mL)	87.8%
	Contrast (10 mL)	Presolubilized (25 mL)	87.7%
	14.3% saline (2.5 mL)	Presolubilized	***
	0.9% saline (10 mL)	Contrast (5 mL)	***
	None	Contrast (5 mL)	***
	Contrast (10 mL)	Contrast (5 mL)	***
	14.3% saline (2.5 mL)	Contrast (5 mL)	70.0%

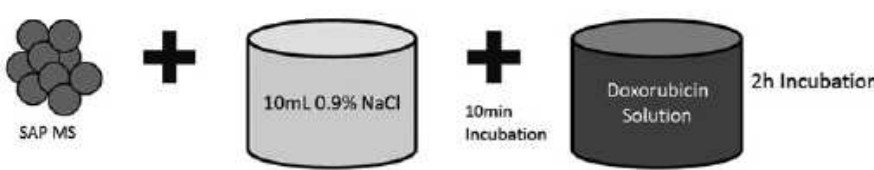
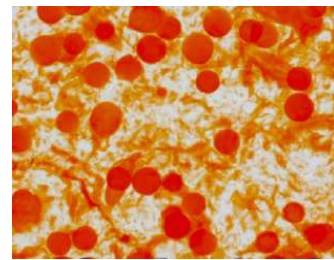

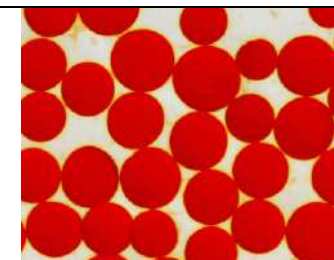
B)		
C)		

Figure 7- Influence du mode opératoire sur le taux de chargement en doxorubicine et sur la structure des microsphères (Liu 2011)

A :Influence de la nature des solutions de préhydratation des microsphères sèches (SAP MS) et des solutions de reconstitution de la doxorubicine lyophilisée sur le taux de chargement de la doxorubicine dans les microsphères. B et C : influence du mode opératoire du chargement sur la structure des microsphères : la micrographie B montre un « émiettement » des microsphères, la micrographie C montre des microsphères intactes.

* Facteurs influençant le chargement

L'efficacité du chargement en principe actif est gouvernée par plusieurs facteurs (Jenke 1989 ; Lewis 2006 ; Taylor 2007 ; Jordan 2010 ; Forster 2010 ; Biondi 2011) :

- le poids moléculaire et la charge ionique du principe actif
- le type et le nombre de fonctions ioniques greffées dans la microsphère et la taille des microsphères
- le pH, la température, la force ionique de la solution de chargement contenant le principe actif
- les modalités d'agitation de la solution de principe actif contenant les microsphères en suspension et le temps de contact entre le principe actif et les microsphères.

La quantité chargée en principe actif peut être modifiée en faisant varier la concentration en principe actif de la solution de chargement ou le temps de chargement (Chen 1992 ; Liu 1999). Le temps nécessaire de chargement augmente avec la taille des microsphères (Lewis 2006). La Figure 8 représente le temps de chargement de la doxorubicine et de l'irinotécan sur les 2 types de microsphères fonctionnalisées (groupements sulfonates ou carboxylates). 80% à 90% de la dose du principe actif sont chargés en une heure sans différence notable entre les 2 types de microsphères pour un principe actif donné et une taille de microsphères donnée (Jordan 2010).

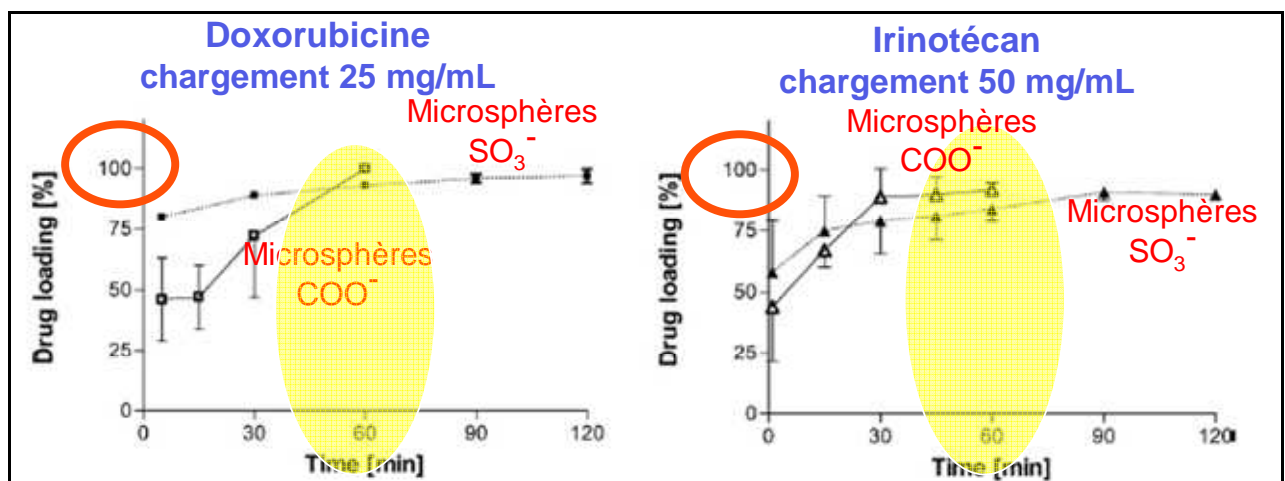


Figure 8- Temps de chargement de la doxorubicine et de l'irinotécan sur les microsphères fonctionnalisées (Jordan 2010)

* Effets du chargement sur la microsphère

Le chargement du principe actif dans la microsphère modifie la taille, l'élasticité et l'hydrophilie de la microsphère. La taille des microsphères diminue après chargement du principe actif. Cette diminution peut atteindre 30% de la taille initiale de la microsphère. Plus la quantité de principe actif chargée est importante, plus cette diminution de taille est importante. Cette information doit être prise en compte lors du choix de la taille des microsphères pour la chimioembolisation. L'élasticité des microsphères diminue également avec le chargement du principe actif. Cette diminution de taille et d'élasticité est due à la perte d'eau lors de l'incorporation du principe actif dans la microsphère, qui condense la structure de la microsphère (Figure 9). Cette perte d'eau rend également la microsphère plus hydrophobe, créant un risque d'adhésion des microsphères au cathéter et d'agglomérats des microsphères entre elles si la quantité de principe actif chargée est trop importante (Lewis 2006 ; Taylor 2007 ; Jordan 2010 ; Biondi 2011 ; Liu 2011). La capacité maximale de chargement du principe actif dans la microsphère tient compte de tous ces changements et correspond à la quantité maximale de principe actif chargeable laissant intactes les qualités d'embolisation de la microsphère.

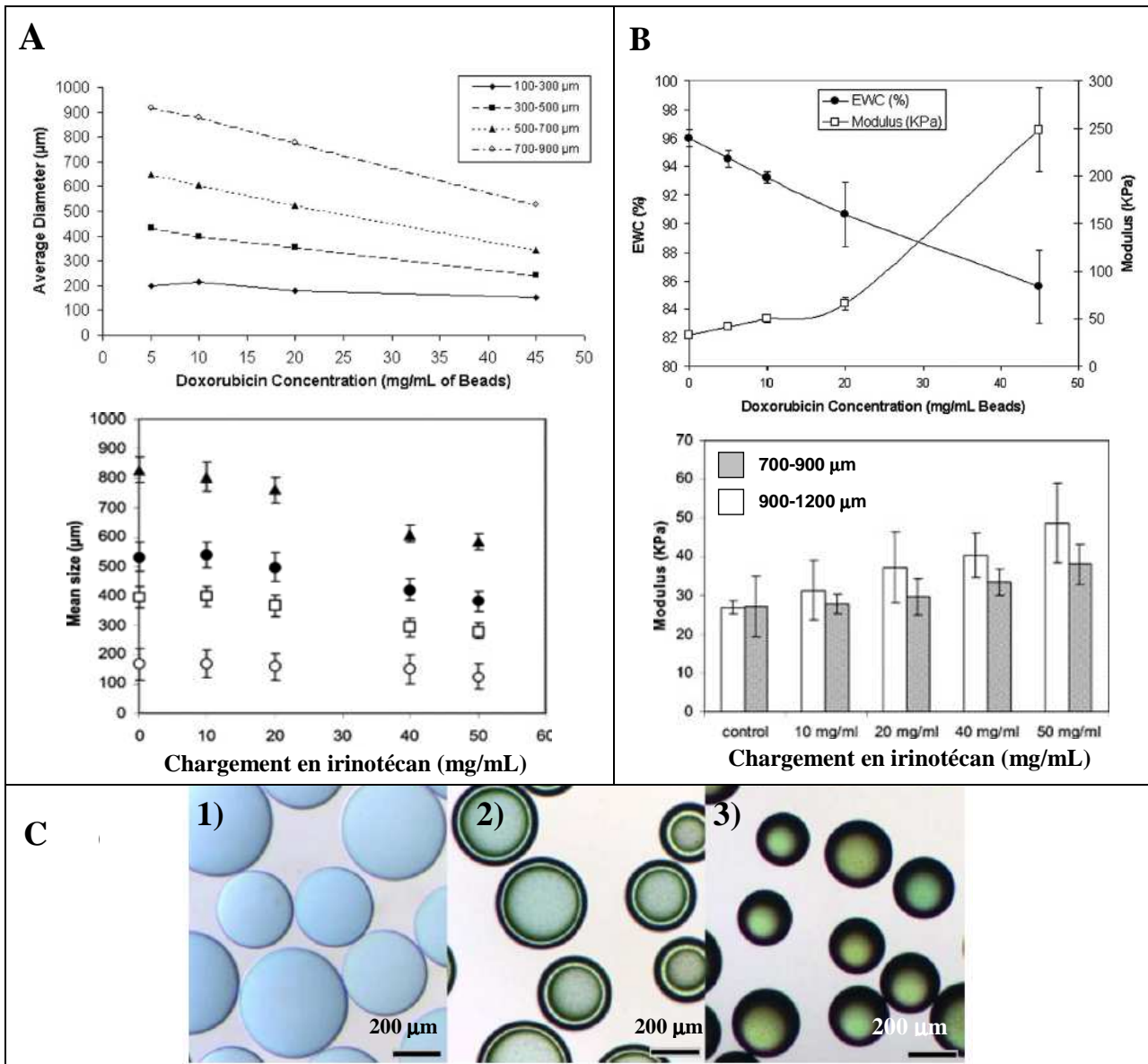


Figure 9- Effet du chargement de la doxorubicine ou de l'irinotécan sur les propriétés physiques des microsphères (Lewis 2006 ; Taylor 2007).

A : effet de la dose sur le diamètre moyen des microsphères. B : effet de la dose sur la quantité d'eau présente dans la microsphère (EWC : equilibrium water content) et sur le module de Young qui mesure l'élasticité. C : micrographies de microsphères 300-500 μm non chargées (1), chargées avec de l'irinotécan 50mg/ml après 7 min (2) après 20 min (3).

* Répartition du principe actif dans la microsphère

Lors du chargement, la répartition du principe actif n'est pas toujours homogène dans la microsphère. Elle dépend notamment des caractères physico-chimiques du principe actif (structure, coefficient de diffusion dans la microsphère, capacité du principe actif à se réarranger (phénomène d'empilement par liaisons hydrogène appelé « stacking »)), de la quantité chargée en principe actif et de la répartition des fonctions ioniques greffées dans la microsphère (Biondi 2011). Biondi et son équipe ont montré que lorsque la doxorubicine était chargée à de faibles doses, elle était répartie de façon homogène dans la microsphère. Lorsque elle était chargée à des doses plus importantes, elle s'accumulait en périphérie créant un gradient de concentration dans la microsphère (Figure 10). Ce phénomène a également été observé avec l'irinotécan (Namur 2009 b). Cette répartition en périphérie du principe actif est liée à la structure de la microsphère qui présente un nombre plus important de fonctions ioniques greffées en périphérie qu'au centre (Lewis 2007 ; Biondi 2011) et peut avoir des conséquences sur la cinétique de libération du principe actif (Kreuter 1994).

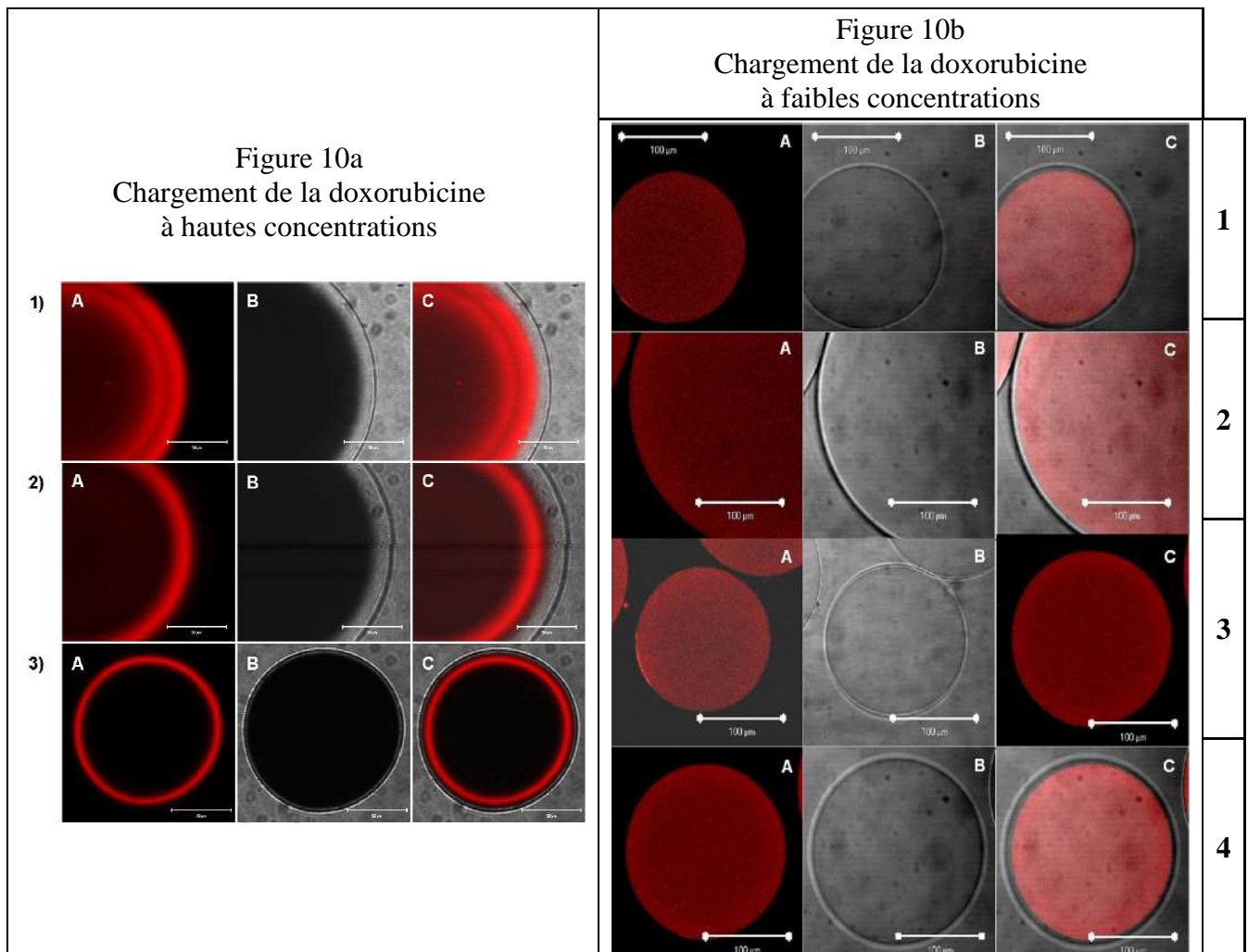


Figure 10- Images obtenues par microscopie confocale à balayage laser de microsphères chargées en doxorubicine (Biondi 2011).

(A) image en fluorescence, (B) image en transmission, (C) superposition des images en fluorescence et en transmission.

Fig 10a Concentration en doxorubicine (1) 5 mg/mL, (2) 10 mg/mL, (3) 25 mg/mL.

Fig 10b Concentration en doxorubicine (1) 5µg/mL, (2) 10µg/mL, (3) 20µg/mL, (4) 50µg/mL

2.1.3 Libération du principe actif

Le mécanisme et les performances de libération du principe actif à partir de la microsphère de chimioembolisation sont liés directement au mécanisme impliqué dans le chargement du principe actif dans la microsphère et au mode opératoire du chargement (Lewis 2006 ; Liu 2011). Le principe actif chargé par absorption dans la microsphère est libéré dans la majorité des cas par diffusion du principe actif dans le milieu. Le principe actif chargé par échange ionique est libéré de la microsphère le plus souvent par échange ionique. La libération par échange ionique permet une libération plus lente du principe actif comparée à une libération par diffusion (Lewis 2006).

i. In vitro

Plusieurs études expérimentales ont montré que les performances de libération de la doxorubicine et de l'irinotécan à partir des microsphères de chimioembolisation, dans un tampon phosphate salin, dépendaient de la taille des microsphères et de la quantité de principe actif chargée (Figure 11).

Plus la taille des microsphères est petite, plus le principe actif est libéré rapidement (Taylor 2007). Lewis et son équipe ont montré que pour une dose de doxorubicine chargée à 25 mg/mL de microsphères, les temps de demi-vie de la doxorubicine libérée à partir de microsphères de taille 700-900 μ m et de taille 100-300 μ m étaient respectivement 1730h et 150h (Lewis 2006).

Plus la quantité de principe actif chargée est importante, plus la libération du principe actif se fait lentement (Gonzalez 2008 ; Taylor 2007 ; Jordan 2010). Gonzalez et son équipe ont montré que pour des microsphères de taille 500-700 μ m, le temps de demi-vie augmentait de 381h à 3658h lorsque la concentration en doxorubicine chargée augmentait de 6,25 à 37,5 mg/mL (Gonzalez 2008).

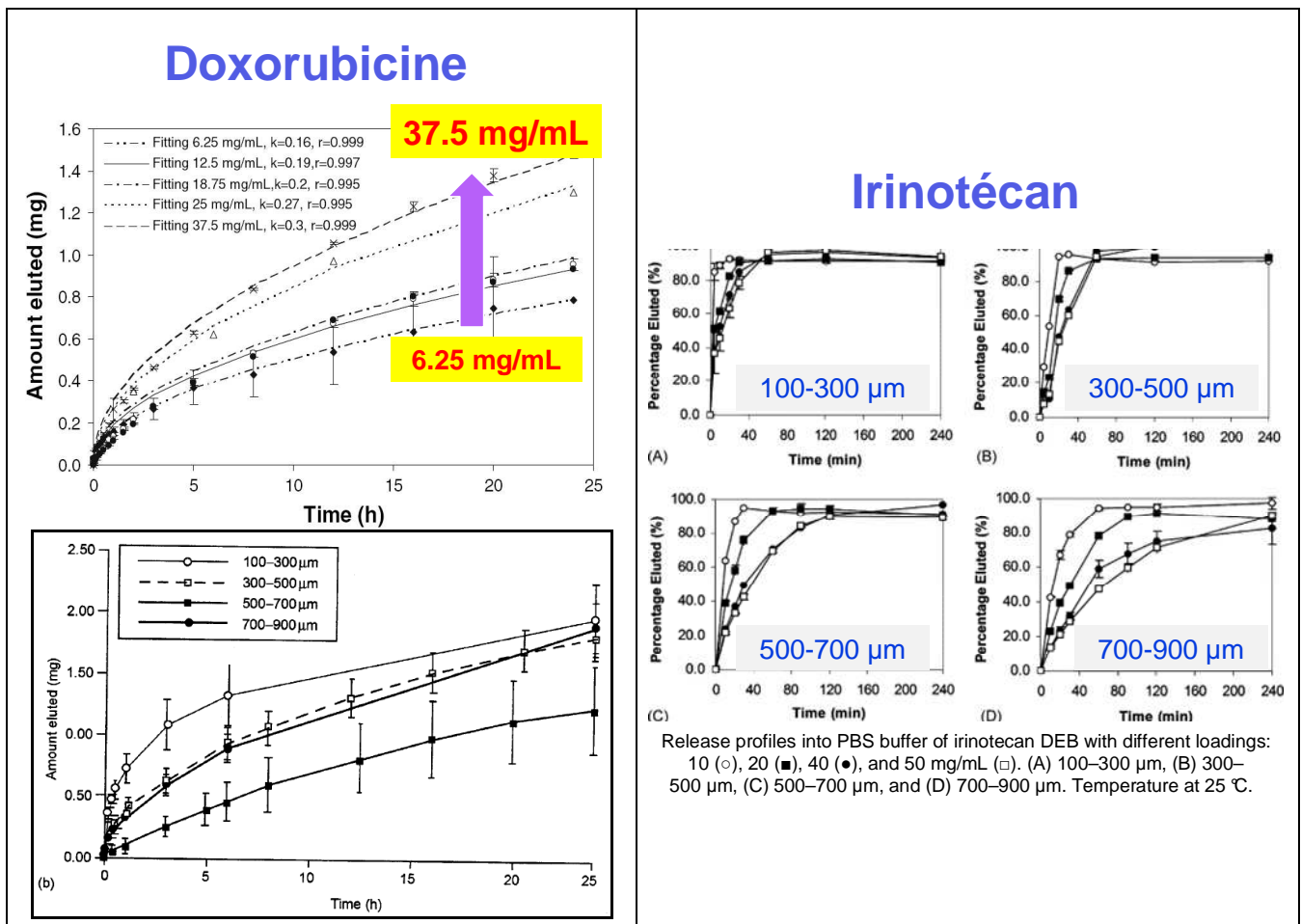


Figure 11- Influence de la quantité de principe actif chargée dans la microsphère et de la taille des microsphères sur la cinétique de libération de la doxorubicine et de l'irinotécan *in vitro* (milieu tampon phosphate salin) (Taylor 2007; Gonzalez 2008; Andy 2010)

La nature et les propriétés physico-chimiques du principe actif chargé et des microsphères utilisées influent également sur les performances de libération. Jordan et son équipe ont montré que les cinétiques de libération in vitro (NaCl 0,9%) entre la doxorubicine et l'irinotécan chargé(e) dans un type donné de microsphère étaient différentes. La libération de la doxorubicine était lente et incomplète, celle de l'irinotécan rapide et totale. Pour un principe actif chargé donné, la cinétique de libération était également différente selon le type de microsphère utilisée. Les microsphères ayant des groupements carboxylates libéraient plus rapidement l'irinotécan et présentaient un taux d'élibération de la doxorubicine plus faible que les microsphères ayant des groupements sulfonates (Figure 12) (Jordan 2010).

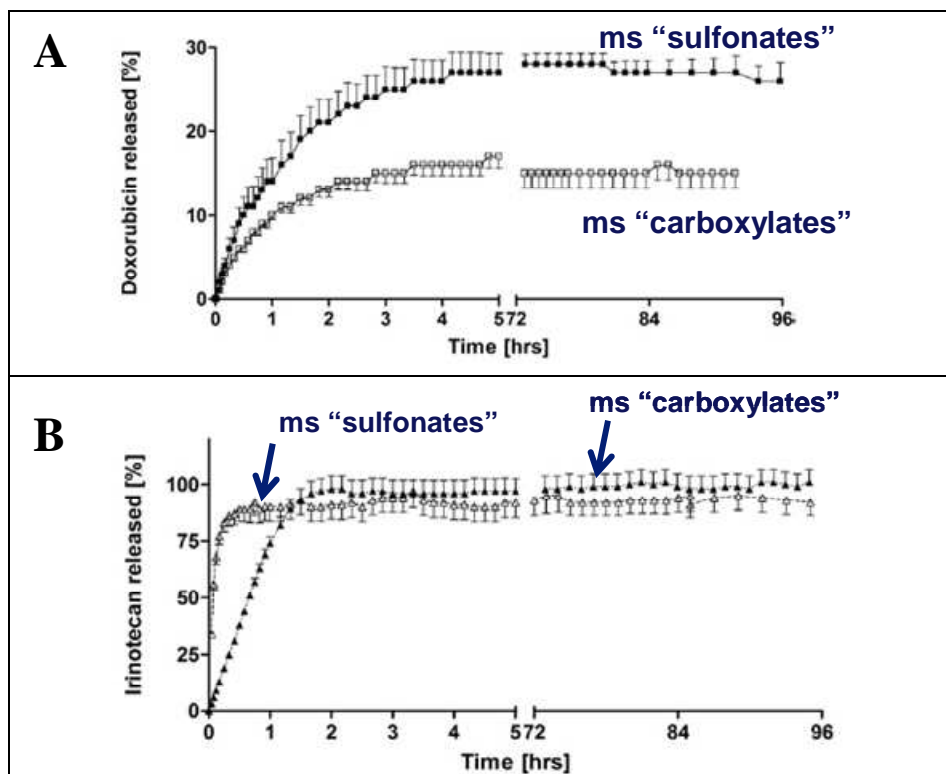


Figure 12- Profils de libération de la doxorubicine (A) et de l'irinotécan (B) à partir de microsphères (ms) porteuses de fonctions sulfonates ou carboxylates dans du NaCl 0,9% (Jordan 2010)

ii. In vivo

*** Libération au niveau systémique**

Les microsphères de chimioembolisation chargées en doxorubicine ou en irinotécan ont montré, dans des études précliniques et cliniques, une réduction significative des concentrations systémiques du principe actif, comparées à une injection IA du principe actif seul ou à une chimioembolisation lipiodolée (Figure 13) (Hong 2006 ; Taylor 2007; Varela 2007). Des études cliniques ont montré que cette réduction des concentrations systémiques du principe actif par la chimioembolisation a permis de diminuer la toxicité liée à ce principe actif, cardiotoxicité et alopecie pour la doxorubicine (Varela 2007 ; Lammer 2010), diarrhées et neutropénie pour l'irinotécan (Martin 2009 ; Martin 2010).

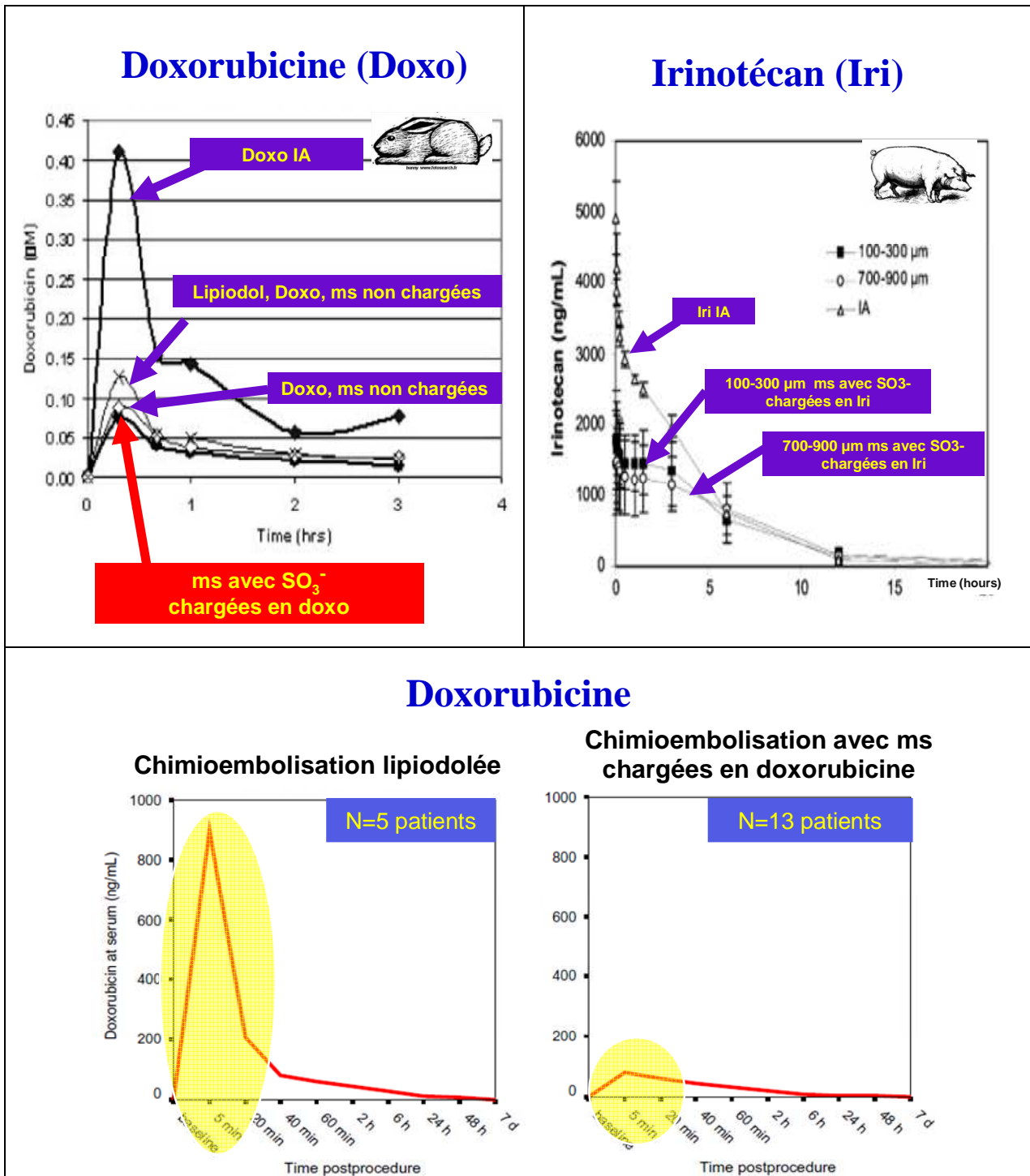


Figure 13- Profil pharmacocinétique plasmatique de la doxorubicine et de l'irinotécan après chimioembolisation par microsphères (ms) chargées, comparée à une injection IA du principe actif seul ou à une chimioembolisation lipiodolée (Hong 2006 ; Taylor 2006 ; Varela 2007)

* Libération au niveau tissulaire

Les performances des microsphères de chimioembolisation au niveau tissulaire ont été étudiées principalement avec la doxorubicine. Hong et son équipe ont montré, chez l'animal, que ces microsphères permettaient une augmentation de la concentration en doxorubicine au niveau du tissu tumoral, par rapport à une injection IA de doxorubicine seule (quantification de la doxorubicine à partir d'homogénats de tissus) (Figure 14) (Hong 2006). L'interprétation de ce résultat doit tenir compte de la technique utilisée pour quantifier la doxorubicine au niveau tissulaire. Nous avons vu précédemment que la doxorubicine in vitro n'était libérée de la microsphère que partiellement.

La quantification tissulaire, majoritairement réalisée dans les études à partir d'homogénats de tissus, ne permet pas de différencier la quantité de doxorubicine libérée dans le tissu de celle encore contenue dans la microsphère. Namur et son équipe, en utilisant les techniques de microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et de microspectrofluorimétrie de fluorescence, ont pu quantifier la doxorubicine au niveau tissulaire à l'intérieur et en dehors des microsphères de chimioembolisation (Namur 2010). Ils ont montré, chez le cochon sain, que 43% et 89% de la dose chargée initialement en doxorubicine étaient libérés de la microsphère, respectivement 28 et 90 jours après chimioembolisation hépatique, démontrant que les microsphères permettaient une libération continue sur plusieurs semaines de la doxorubicine (Figure 15). La doxorubicine était détectée jusqu'à une distance de 600 μm depuis la microsphère et les concentrations autour des microsphères variaient entre 0,55 à 6,80 μM , ces valeurs correspondant à des concentrations d'incubation ayant des effets cytotoxiques sur des cultures d'hépatocytes in vitro (Chuu 2007; Namur 2010).

La libération dans le tissu tumoral de l'irinotécan à partir de microsphères de chimioembolisation a été étudiée chez le lapin. Il a été montré qu'à 24h, la concentration en irinotécan dans la tumeur était 10 fois et 64 fois plus importante que celle obtenue respectivement après injection IA et IV d'irinotécan seul. La concentration en SN38 (métabolite actif de l'irinotécan) dans la tumeur et la nécrose tumorale observée étaient également significativement plus importantes dans le groupe traité par les microsphères chargées en irinotécan que dans les groupes ayant reçu une injection IA ou IV d'irinotécan seul (Figure 16) (Rao 2009).

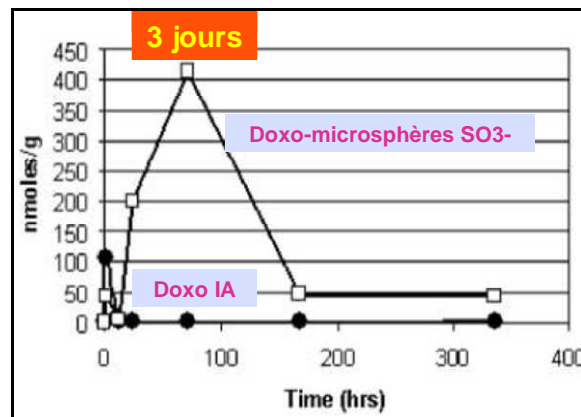


Figure 14- Concentration en doxorubicine dans la tumeur (tumeur hépatique VX2 chez le lapin) après chimioembolisation par microsphères chargées en doxorubicine et injection IA de doxorubicine seule (Hong 2006)

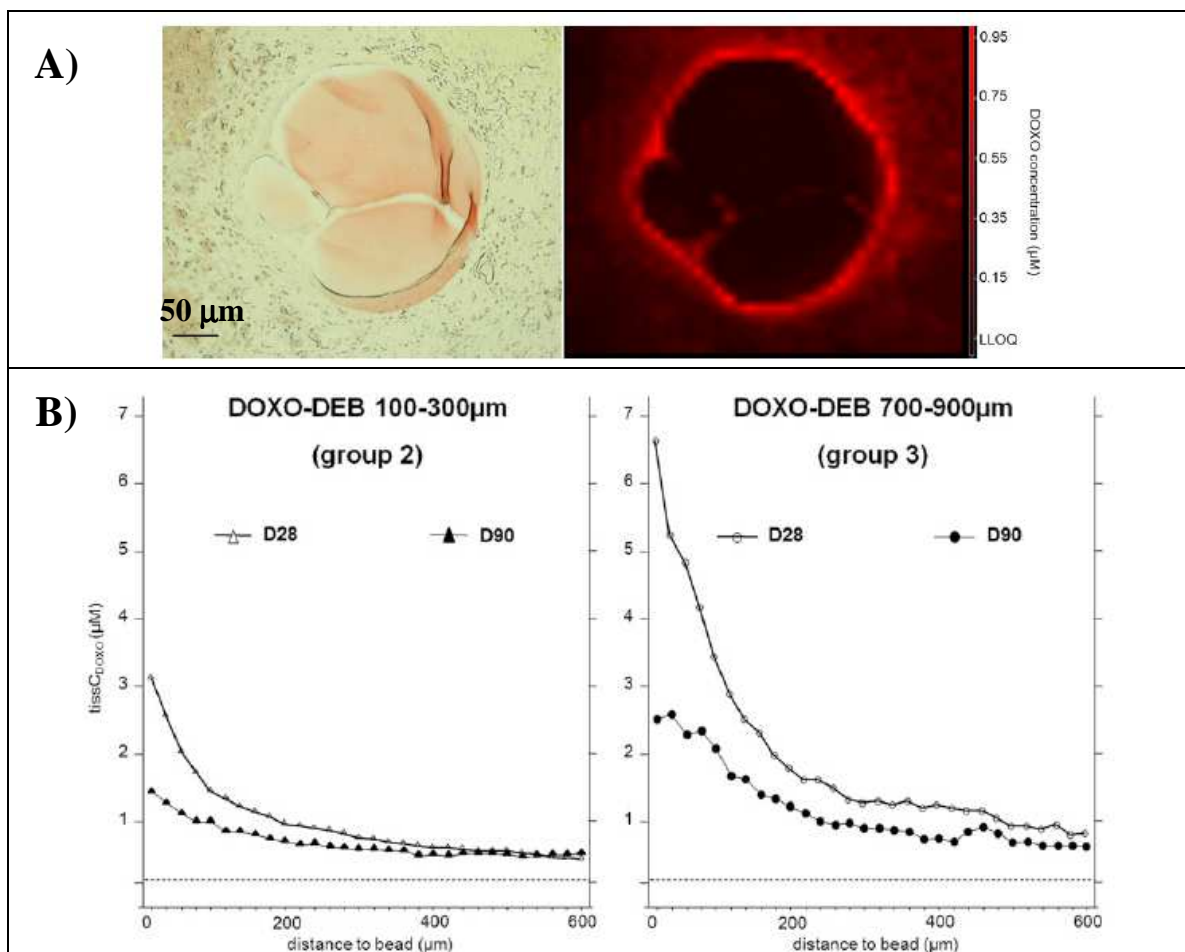


Figure 15- Quantification de la doxorubicine dans le tissu, à l'intérieur et en dehors des microsphères (DEB), après chimioembolisation d'un foie sain de cochon (Namur 2010).

A) image de gauche : section d'un vaisseau occlus par des microsphères de chimioembolisation chargées en doxorubicine ; image de droite : la même section du vaisseau observée par microspectroscopie par fluorescence montrant la distribution de la doxorubicine libre B) Profils de distribution de la doxorubicine dans le tissu à partir des microsphères 28 jours et 90 jours après la chimioembolisation.

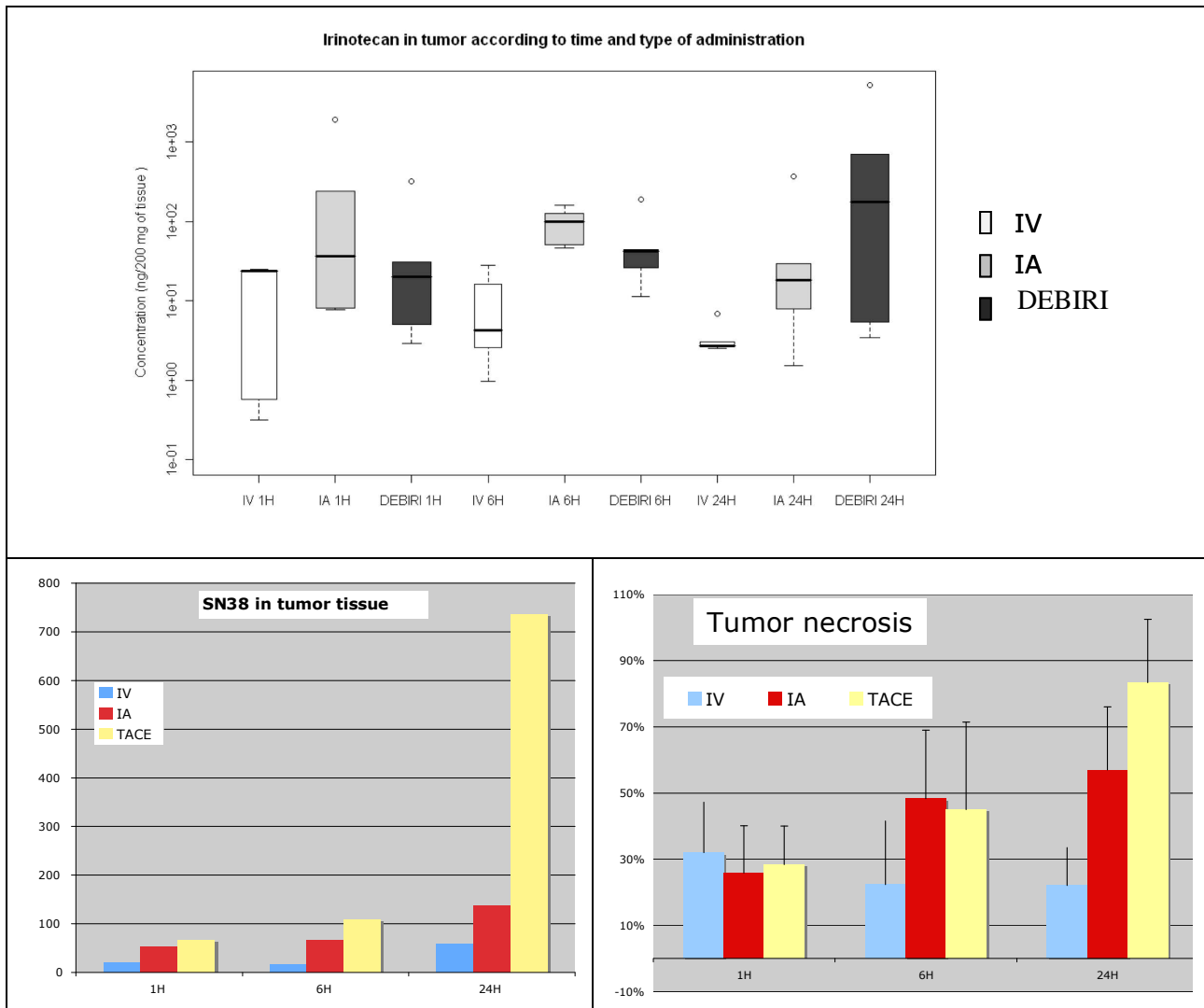


Figure 16- Concentrations dans le tissu tumoral en irinotécan et en SN38 et nécrose tumorale, observées dans un modèle tumoral VX2 chez le lapin, après chimioembolisation (TACE) par microsphères chargées en irinotécan (DEBIRI), injection IA ou IV d'irinotécan seul (De Baere 2009 ; Rao 2009).

Les microsphères de chimioembolisation sont donc à la fois des microsphères d'embolisation calibrées permettant une occlusion vasculaire ciblée mais aussi des vecteurs de principe actif permettant de réduire les concentrations systémiques et la toxicité du principe actif et de délivrer au niveau tumoral une concentration élevée de ce principe actif pendant une durée pouvant aller jusqu'à plusieurs semaines pour la doxorubicine. Ces performances obtenues avec la doxorubicine et l'irinotécan ont amené les cliniciens d'une part à charger ces microsphères avec d'autres principes actifs et d'autre part à étendre le champ d'application de ces microsphères à des indications autres que les tumeurs hépatiques.

2.2 Applications médicales

2.2.1 Microsphères de chimioembolisation utilisées en clinique

Il existe actuellement deux types de microsphère de chimioembolisation commercialisées : les microsphères DC Bead[®] (Biocompatibles UK) présentées sous forme hydratée dans une solution saline (2mL de microsphères par flacon, calibre disponible par tranche de 200 μ m : 100 μ m à 900 μ m) et les microsphères Hepaspheres[®] (Biosphere Medical USA) présentées sous forme sèche (25mg ou 50mg de microsphères par flacon, calibre disponible par tranche de 50 μ m : 50 μ m à 200 μ m, le diamètre est multiplié par 4 dans le serum humain) (Figure 17). Les DC Bead[®] sont composées d'une base de PVA modifiée par des groupements sulfonates SO_3^- et le chargement du principe actif s'effectue par échange ionique. Les Hepaspheres[®] sont composées d'un copolymère PVA/acrylate de sodium (présence de groupements carboxylates COO^-). Le chargement du principe actif dans ces microsphères est réalisé par absorption et par échange ionique.

Les principes actifs chargés dans ces deux types de microsphères ayant fait l'objet d'une ou plusieurs publications sont présentés dans le tableau 4. Ils appartiennent tous à la classe des anticancéreux. La doxorubicine et l'irinotécan sont les principes actifs actuellement les plus utilisés pour le chargement de ces microsphères en pratique clinique.

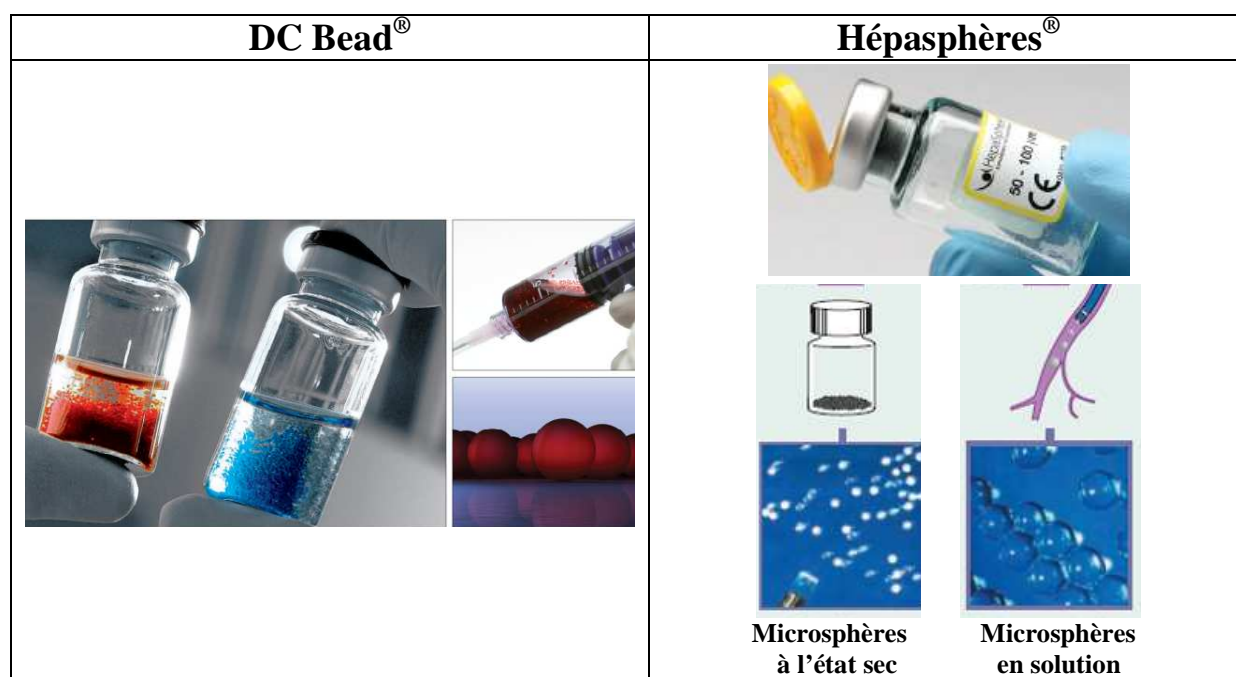


Figure 17- Microsphères de chimioembolisation commercialisées : DC Bead[®] (Biocompatibles) et Hépasphères[®] (Biosphere Médical)

Tableau 4- Principes actifs chargés dans les DC Beads[®] (LC Beads[®] nom commercial aux Etats-Unis) et les Hepaspheres[®] (Quadraspheres[®] nom commercial aux Etats-Unis)

Type de microsphère	Principe actif	Dose maximale de chargement (par mL ou par mg de microsphères)	Type d'évaluation	références
DC Beads [®]	doxorubicine	37,5 mg/mL	clinique	Varela 2007, Lammer 2010
	épirubicine	Dose de chargement non mentionnée	clinique	Nicolini 2010
	mitoxantrone	20 mg/mL	<i>In vitro</i> Préclinique	Keese 2009
	irinotécan	50 mg/mL	clinique	Fiorentini 2007, Martin 2009
	topotécan	30 mg/mL	In vitro Préclinique (voie SC, rat)	Forster 2010
Hepaspheres [®]	doxorubicine	2 mg/mg	clinique	Grosso 2008
	épirubicine	1,2 mg/mg	clinique	Seki 2011a
	cisplatine	1 mg/mg	clinique	Seki 2011b
	oxaliplatine	8 mg/mg	clinique	Poggi 2008
	docétaxel	0,8 mg/mg	clinique	Seki 2011c

2.2.2 Applications cliniques

Les microsphères de chimioembolisation sont utilisées essentiellement dans le traitement du CHC non opérable (Poon 2007; Varela 2007; Malagari 2008; Lammer 2010) et dans le traitement des métastases hépatiques non résécables d'origine colorectale (Aliberti 2006; Fiorentini 2007; Martin 2009) pour lesquels elles ont montré un bénéfice en termes de tolérance et de réponse tumorale. Des études préliminaires ont été réalisées avec ces microsphères dans le traitement des métastases hépatiques de tumeurs endocrines digestives (De Baere 2008 ; Gaur 2011) et dans le traitement des cholangiocarcinomes intrahépatiques (Aliberti 2008). Les résultats de ces études en termes de tolérance et de réponse tumorale sont encourageants et doivent être confirmés dans des études comparatives et sur de plus grands effectifs. Les microsphères de chimioembolisation sont également utilisées en combinaison avec la radiofréquence dans le traitement du CHC (Lencioni 2008)

Chapitre 3

LA CHIMIOEMBOLISATION APPLIQUEE AU POUMON

La chimioembolisation du poumon a été introduite en Allemagne, il y a quelques années, par l'équipe de Vogl, pour le traitement des tumeurs pulmonaires primitives et secondaires non opérables (Vogl 2005 ; Vogl 2007 ; Vogl 2008). Les tumeurs pulmonaires étant peu vascularisées comparées à celles du foie (Koukourakis 2000), l'objectif principal était d'imprégner le lobe pulmonaire par l'anticancéreux pour obtenir une régression tumorale. Les résultats ont été décevants en raison de la faible affinité du lipiodol pour le tissu tumoral pulmonaire. Depuis, à notre connaissance, aucune autre étude clinique n'a été publiée sur la chimioembolisation du poumon. Après quelques rappels anatomiques, nous présenterons l'intérêt clinique que pourrait avoir la chimioembolisation du poumon par microsphères chargées en principe actif.

3.1 Le poumon

3.1.1 Structures pulmonaires

Les poumons sont des organes pairs et asymétriques, contenus chacun dans une cavité pleurale. Ils occupent latéralement la cage thoracique. Le poumon droit pèse en moyenne 700 g, le gauche 600 g. Chaque poumon se divise en lobes puis en segments : 3 lobes du côté droit et 2 lobes du côté gauche. Chaque lobe pulmonaire se subdivise en lobules, unités fonctionnelles du poumon (Figure 18). L'ensemble des éléments du lobule est enveloppé dans un tissu conjonctif riche en fibres élastiques. Chaque lobule reçoit une bronchiole terminale et une branche de l'artère pulmonaire.

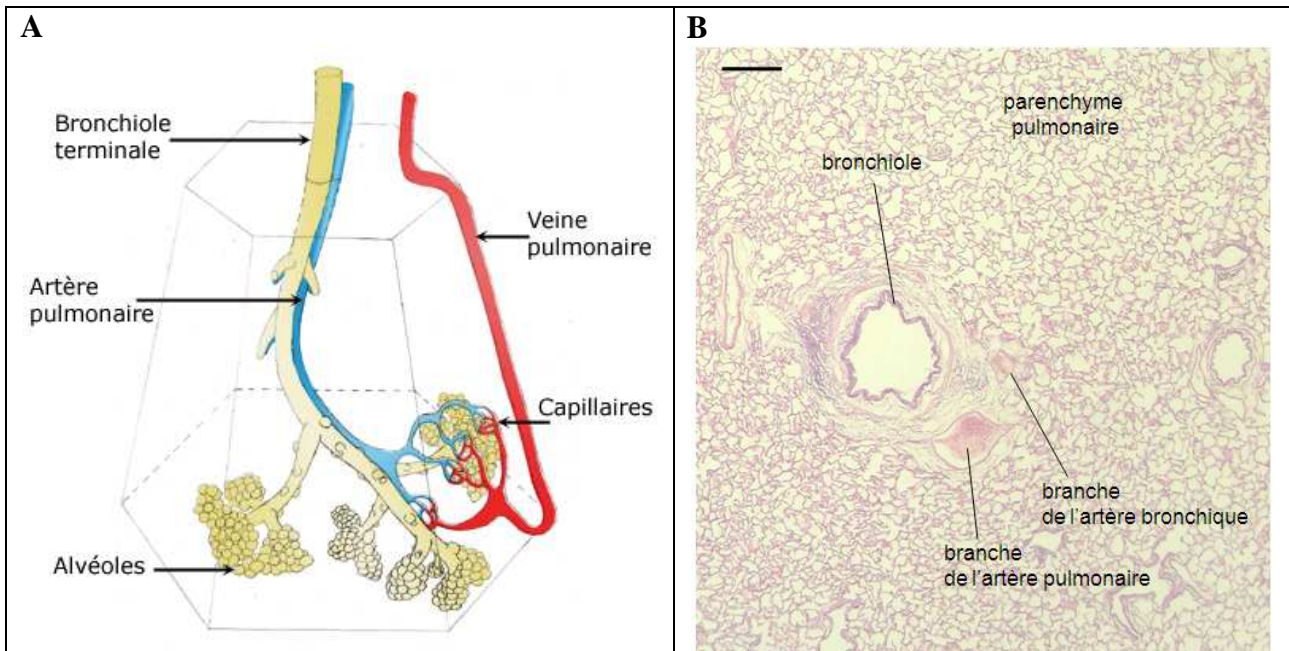


Figure 18- Schéma du lobule pulmonaire chez l'homme (A) (Respir) et Photographie d'une coupe histologique de poumon de brebis (B) (HES, échelle 300µm)

3.1.2 Vascularisation pulmonaire

Le poumon présente une double vascularisation : une vascularisation fonctionnelle assurée par les vaisseaux pulmonaires, une vascularisation nutritive assurée par les vaisseaux bronchiques et lymphatiques. Les artères pulmonaires apportent au poumon du sang désaturé en oxygène provenant du cœur droit, ce sang ayant fourni l'oxygène aux tissus et reçu du gaz carbonique. Les échanges gazeux s'effectuent au niveau des capillaires du système pulmonaire. Le sang enrichi en oxygène est drainé dans les veinules et les veines pulmonaires qui le transportent vers le cœur gauche. Les artères bronchiques assurent la nutrition et l'oxygénation du parenchyme pulmonaire.

Les tumeurs primitives du poumon sont majoritairement vascularisées par l'artère bronchique, les tumeurs secondaires par l'artère pulmonaire dans 48% des cas, par l'artère bronchique dans 16% des cas et par les deux voies dans 36% des cas (Milne 1976 ; Milne 1987).

3.2 Intérêt de la chimioembolisation

Le poumon présente des similitudes avec le foie. Il possède une double vascularisation, il est souvent le siège de métastases et la vascularisation des tumeurs pulmonaires est principalement artérielle. Contrairement au foie, le lipiodol n'a pas une haute affinité pour le tissu pulmonaire limitant l'utilisation de la chimioembolisation lipiodolée dans le poumon. La chimioembolisation par microsphères n'a jamais été étudiée dans le poumon. Deux indications potentielles semblent particulièrement intéressantes : les tumeurs pulmonaires et les hémoptysies massives.

3.2.1 Les tumeurs pulmonaires malignes

Les tumeurs pulmonaires malignes sont des tumeurs de très mauvais pronostic. La chimiothérapie IV occupe une place importante dans la prise en charge des tumeurs pulmonaires malignes et est basée notamment sur l'utilisation des sels de platine. Le cisplatine a une toxicité auditive irréversible dose-dépendante et peut provoquer dans 25% à 75% des cas, une insuffisance rénale par nécrose tubulaire. Cette insuffisance rénale est dose-dépendante (dose par cure et dose totale cumulée). Le carboplatine présente une toxicité médullaire également dose-dépendante. Ces toxicités limitent l'utilisation par voie IV de ces anticancéreux, à fortes doses ou à long terme, malgré leur efficacité.

Pour limiter cette toxicité systémique liée à la chimiothérapie par voie IV et augmenter la concentration intra-tumorale de l'anticancéreux, différentes techniques ont été développées pour permettre une chimiothérapie locorégionale du poumon : la perfusion sur poumon isolé (Weksler 1993 ; Johnston 1995 ; Hendricks 1998), la perfusion d'anticancéreux par voie artérielle pulmonaire ou bronchique (Osaki 1999 ; Van Putte 2009) et la chimioembolisation lipiodolée de l'artère pulmonaire (Vogl 2008). Toutes ces techniques ont montré que la chimiothérapie locorégionale du poumon, comparée à une chimiothérapie systémique, permettait une réduction des concentrations systémiques et une augmentation de la concentration intra-tumorale de l'anticancéreux, mais leur efficacité reste limitée. La perfusion sur poumon isolé nécessite une thoracotomie et la mise en place d'une circulation extra-corporelle. Le taux de réponse est faible et le risque de complications élevé (Ratto 1996 ; Van Putte 2003). La perfusion par voie artérielle pulmonaire ou bronchique d'anticancéreux est bien tolérée mais elle nécessite plusieurs cures pour obtenir une

régression tumorale et n'améliore pas la survie (Ekholm 1983 ; Uchiyama 1988 ; Osaki 1999).

La chimioembolisation de l'artère pulmonaire a été étudiée chez l'animal avec du cisplatine et du carboplatine et semble, comparée aux autres techniques, être celle qui permet d'obtenir la concentration la plus élevée en principe actif au niveau tissulaire, sans toxicité majeure (Figure 19) (Schneider 2002 ; Pohlen 2007). Vogl et son équipe ont été les premiers à réaliser une chimioembolisation de l'artère pulmonaire chez des patients atteints de métastases pulmonaires non résecables. Il s'agissait d'une chimioembolisation lipiodolée avec de la mitomycine C. Elle a été bien tolérée chez les patients mais les résultats ont été décevants en raison d'une faible rétention de la mitomycine « lipiodolée » observée dans 75% des tumeurs (Vogl 2005 ; Vogl 2008). L'utilisation de microsphères de chimioembolisation chargeables directement en anticancéreux permettrait un contrôle plus précis de la distribution du médicament au niveau du tissu pulmonaire et en théorie une meilleure efficacité.

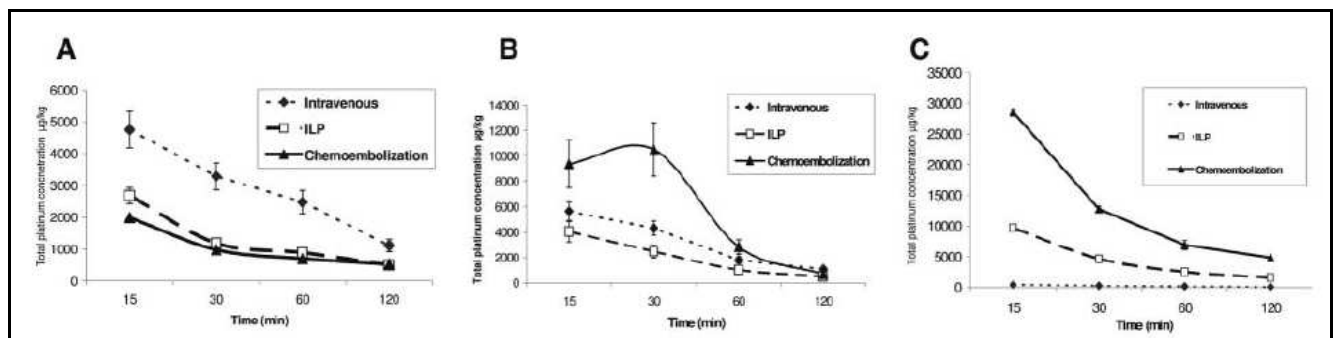


Figure 19- Profils concentration-temps du cisplatine chez le rat après administration intraveineuse, perfusion sur poumon isolé (ILP) ou chimioembolisation (Pohlen 2007)

A) Plasma B) Tissu pulmonaire sain C) Tissu pulmonaire tumoral

3.2.2 Les hémoptysies massives

Les hémoptysies massives constituent une urgence thérapeutique. En l'absence de traitement, le taux de mortalité dépasse 50%. La majorité des hémoptysies massives ayant pour origine une hypervascularisation systémique d'origine artérielle bronchique (Yoon 2002 ; Carette 2004), l'embolisation des artères bronchiques est le traitement de première intention de ces hémoptysies (Remy 1973 ; Remy 1977 ; Uflacker 1983 ; Uflacker 1985 ; Ramakantan 1996). Elle permet un contrôle immédiat de l'hémoptysie dans 75% à 90% des cas mais est généralement suivie d'une recanalisation des artères bronchiques embolisées responsable de récurrences (Keller 1987 ; Katoh 1990).

Cette recanalisation visible en angiographie, se produit en quelques mois avec les particules d'embolisation, quel que soit leur type (particules non calibrées, microsphères d'embolisation...). On distingue schématiquement trois phases 1) le blocage de la particule dans le vaisseau induisant une stase sanguine et une thrombose qui s'observent de quelques heures à quelques jours, 2) la réaction inflammatoire localisée autour de la particule avec remodelage de la paroi vasculaire dans les semaines qui suivent l'occlusion, 3) la recanalisation qui se traduit par l'apparition d'une nouvelle lumière vasculaire fonctionnelle et accompagne la migration transvasculaire de la particule après plusieurs semaines ou plusieurs mois (Figure 20) (Vinters 1986; Tomashefski 1988).

L'utilisation de microsphères de chimioembolisation chargées en inhibiteur du remodelage vasculaire pourrait être intéressante dans la prévention de la recanalisation et donc de la récurrence des hémoptysies.

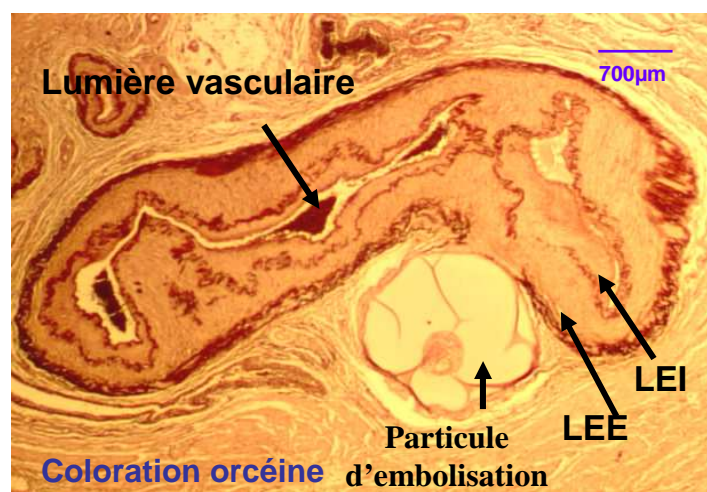


Figure 20- Recanalisation d'un vaisseau embolisé (Laurent 2009)

Apparition d'une nouvelle lumière vasculaire fonctionnelle, migration transvasculaire de la particule avec rupture des limitantes élastiques interne (LEI) et externe (LEE)

TRAVAUX PERSONNELS

Objectifs généraux du travail de thèse

La chimioembolisation pulmonaire a été proposée par Vogl et son équipe en 2005 pour le traitement des métastases pulmonaires non résécables. Les résultats ont été décevants en raison d'une faible rétention du vecteur, le lipiodol, dans la tumeur. L'utilisation de microsphères calibrées directement chargeables ou préchargées en principe actif comme alternative au lipiodol n'a encore jamais été appliquée à la chimioembolisation du poumon. Leur utilisation pourrait être intéressante dans le traitement des tumeurs pulmonaires malignes et dans celui des hémoptysies massives.

L'utilisation de microsphères chargées en anticancéreux permettrait une imprégnation de la tumeur pulmonaire maligne par l'anticancéreux, tout en évitant la toxicité systémique de ce dernier. Dans le cas des hémoptysies massives dont le premier traitement est l'embolisation bronchique, l'utilisation de microsphères chargées en inhibiteur du remodelage vasculaire permettrait d'éviter les récurrences dues à une recanalisation observée après embolisation.

Il doit être prouvé qu'avec cette technique de chimioembolisation appliquée au poumon, les concentrations systémiques du principe actif sont inférieures à celles d'une injection IA du principe actif seul et qu'elles ne génèrent pas de toxicité, que le principe actif est libéré de la microsphère en quantité suffisante dans le tissu, qu'aucun effet secondaire majeur n'apparaît localement ou sur le plan général.

L'objectif général de nos travaux était de valider, à l'étape préclinique, les points suivants avant d'envisager des études chez l'homme :

- 1) la quantification tissulaire du principe actif libéré de la microsphère de chimioembolisation
- 2) la pharmacocinétique systémique de ce principe actif
- 3) la toxicité locale et générale induite par l'injection des microsphères chargées.

Nous avons réalisé successivement plusieurs études, chacune correspondant à une technique différente de chimioembolisation du poumon: chimioembolisation limitée à l'artère pulmonaire seule, chimioembolisation de l'artère pulmonaire combinée à une embolisation bronchique, chimioembolisation de l'artère bronchique dans un modèle d'hypervascularisation pulmonaire. Nous avons travaillé sur un modèle d'embolisation du poumon chez la brebis, modèle expérimental classique en embolisation utérine (Pelage 2001; Pelage 2002; Wassef 2008) et depuis peu en embolisation pulmonaire (travaux non publiés de Pelage). Les similitudes avec l'architecture et la physiologie des poumons entre l'homme et la brebis permettent l'emploi de dispositifs médicaux utilisés chez l'homme dans ce modèle.

Plan des études et objectifs particuliers

Les travaux ont consisté à quantifier deux principes actifs, l'irinotécan et le sirolimus, au niveau systémique et tissulaire après chimioembolisation du poumon, chez la brebis, par des microsphères de PVA modifiées par des groupements sulfonates, chargées en ces principes actifs. Au préalable, nous avons développé et/ou validé les méthodes analytiques nécessaires à ces dosages.

Les microsphères chargées en irinotécan ont été étudiées dans le modèle d'embolisation de poumon sain chez la brebis. La mise au point et la validation d'une méthode de dosage pour quantifier l'irinotécan dans le plasma et dans le tissu pulmonaire chez la brebis ont été, dans un premier temps, appliquées à la pharmacocinétique plasmatique de l'irinotécan, chargé à 3 doses différentes lors de la chimioembolisation de l'artère pulmonaire, afin de sélectionner la dose optimale de chargement. Nous avons ensuite comparé les pharmacocinétiques plasmatiques et les quantifications tissulaires de l'irinotécan, chargé à la dose sélectionnée, après chimioembolisation limitée à l'artère pulmonaire seule ou associée à une embolisation ou à une chimioembolisation de l'artère bronchique, afin de déterminer quelle procédure permettait la meilleure imprégnation du territoire embolisé avec une tolérance acceptable pour l'animal.

L'analyse histologique des vaisseaux et du tissu, réalisée par les anatomopathologistes de notre équipe, a été intégrée aux résultats de notre travail afin de rapprocher les résultats pharmacocinétiques et de quantification tissulaire de ceux obtenus en histologie.

Les microsphères chargées en sirolimus ont été évaluées dans un modèle d'hypervascularisation pulmonaire chez la brebis simulant les conditions d'une hémoptysie. Nous avons appliqué une méthode de dosage du sirolimus dans le sang et validé cette méthode dans le tissu pulmonaire chez la brebis puis analysé les concentrations sanguines et tissulaires après chimioembolisation de l'artère bronchique afin d'évaluer les performances de la microsphère en tant que vecteur de ce principe actif.

Partie 1

MICROSPHERES DE CHIMIOEMBOLISATION CHARGEES EN IRINOTECAN

1.1 Contexte médical : les tumeurs pulmonaires malignes

Le cancer du poumon est une des principales causes de mortalité liée au cancer aux Etats-Unis et en Europe. Les tumeurs primitives correspondent en très grande majorité aux cancers bronchiques. Les tumeurs secondaires correspondent aux métastases pulmonaires.

1.1.1 Les tumeurs primitives

On distingue deux grands types de cancers bronchiques : les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) qui évoluent en général lentement et les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) caractérisés par leur vitesse de propagation. Ils représentent respectivement environ 80% et 20% des cancers bronchiques. Trois types de traitement sont généralement utilisés dans la prise en charge des cancers bronchiques : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie (médicaments anticancéreux et thérapie ciblée). Le schéma de chimiothérapie le plus utilisé pour traiter un cancer bronchique est à base de sels de platine. Le cisplatine ou le carboplatine sont habituellement associés à l'étoposide, le paclitaxel, le docétaxel, la gemcitabine, la vinorelbine ou le pemetrexed. Les principales molécules de thérapies ciblées actuellement utilisées sont l'erlotinib, le bévacizumab et le gefitinib.

i. Cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC)

Il existe trois catégories de CBNPC désignées selon le type de cellules dans lesquelles le cancer se développe : les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes et les carcinomes indifférenciés à grandes cellules. La chirurgie constitue le traitement de référence pour ces cancers lorsqu'elle est envisageable (environ 20% des patients). La chimiothérapie est indiquée pour les CBNPC localement avancés inopérables et métastatiques. Elle permet d'augmenter la durée et la qualité de vie mais le taux de survie à 5 ans reste encore très faible pour les CBNPC de stade IV.

ii. Cancers bronchiques à petites cellules (CBPC)

La chimiothérapie associée ou non à la radiothérapie constitue le traitement de référence. Le traitement des CBPC diffus repose essentiellement sur la chimiothérapie. Il est palliatif, ne permettant qu'exceptionnellement une survie supérieure à 2 ans. Sans traitement, la survie est brève (3 à 6 mois) ; avec un traitement, la médiane de vie est autour de 10-12 mois avec une amélioration nette de la qualité de vie.

1.1.2 Les tumeurs secondaires

Le poumon est une localisation fréquente des métastases. 20% à 30% des patients ayant un cancer développent des métastases pulmonaires (Weiss 1971). La localisation du cancer primitif est souvent le sein, le colon, l'estomac, le pancréas, le rein, la prostate et l'ovaire. Les métastases atteignent les poumons généralement par voie sanguine via l'artère pulmonaire, mais elles peuvent également emprunter la voie lymphatique ou atteindre le poumon par contiguïté directe (sein). A la différence du cancer bronchique, les métastases pulmonaires se localisent généralement à la périphérie du parenchyme pulmonaire et peu dans les zones centrales. Le choix du traitement est fonction de la tumeur primitive. Il s'agit en général d'une chimiothérapie.

1.2 Principe actif étudié : irinotécan

1.2.1 Rationnel

Bien que des études récentes ont montré que le cisplatine ou le docétaxel (médicaments ayant l'AMM pour les tumeurs pulmonaires) pouvaient être chargés dans les microsphères de chimioembolisation porteuses de fonctions carboxylates (Maeda 2010 ; Seki 2011 b ; Seki 2011 c), nous avons choisi pour nos études pilotes sur la chimioembolisation du poumon l'un des deux anticancéreux (doxorubicine ou irinotécan) validés pour le chargement des microsphères de chimioembolisation même s'ils sont peu utilisés dans le traitement des tumeurs pulmonaires en Europe et aux Etats-Unis. Ce choix est justifié par les nombreuses données *in vitro* et *in vivo* disponibles dans la littérature sur ces microsphères chargées en ces anticancéreux, qui constituent une base à partir de laquelle nous pouvons comparer et

interpréter nos premiers résultats issus de nos études préliminaires sur la chimioembolisation du poumon. Notre choix s'est porté sur l'irinotécan de préférence à la doxorubicine, pour son efficacité décrite par certaines études dans le cancer du poumon (Masuda 1992; Masuda 2001; Sandler 2002), sa rétention plus importante au niveau du tissu pulmonaire tumoral et sa meilleure tolérance (Murdter 1997 ; Biancosino 2007; Eyol 2008; Baltes 2010).

1.2.2 Caractéristiques

L'irinotécan est un dérivé semi-synthétique de la camptothécine. Il est indiqué dans le traitement des cancers colorectaux. La posologie recommandée en monothérapie est de 350 mg/m² d'irinotécan administrés en perfusion intraveineuse de 30 à 90 minutes toutes les 3 semaines. En association, la dose recommandée est de 180 mg/m² d'irinotécan en perfusion intraveineuse de 30 à 90 minutes toutes les 2 semaines. Dans le CBPC, l'irinotécan en association avec le cisplatine a montré une amélioration significative de la survie par rapport à l'association cisplatine-étoposide (Noda 2002). Plusieurs études utilisant l'irinotécan ont été menées dans le traitement des CBNPC sans démontrer d'effet significatif sur la survie des patients (Pizzolato 2003).

i. Mécanisme d'action

L'irinotécan agit en inhibant la topoisomérase de type I, enzyme nucléaire impliquée dans le clivage et la ligation de l'ADN pendant la réplication et la transcription. En stabilisant les complexes de clivage, il provoque des cassures simple brin de l'ADN, empêchant sa réplication, la synthèse d'ARN et donc la division cellulaire.

ii. Métabolisme

Après administration chez l'homme, l'irinotécan subit une conversion partielle et rapide en un métabolite actif le SN38. Cette activation est réalisée par des estérases : les carboxylestérases (en particulier la carboxylestérase 2 hépatique) et les butyrylcholinestérases (Morton 1999). Elle a lieu au niveau tissulaire et plasmatique. Le foie est le principal organe responsable de cette activation. L'étude des activités inhibitrices de l'irinotécan et du SN38 à diverses concentrations a révélé que le SN38 avait une activité 100 à 1000 fois plus cytotoxique que l'irinotécan dans plusieurs lignées tumorales humaines (Tanizawa 1994).

L'irinotécan et le SN38 existent sous deux formes en équilibre : la forme carboxylate et la forme lactone (Figure 21). L'interconversion des formes lactone – carboxylate dépend du pH et de la température (Fassberg 1992). La forme lactone de l'irinotécan est convertie spontanément en forme carboxylate à pH neutre et basique. La configuration lactone du SN38 correspond à la forme pharmacologiquement active (Jaxel 1989). Trois autres principaux métabolites, inactifs, ont été identifiés : le SN38G, glucuronide du SN38 formé le plus souvent par l'Uridine 5' diphospho glucuronosyl transferase 1A1 (UGT1A1), l'APC (dérivé de l'acide aminopentanoïque) et le NPC (dérivé de l'amine primaire), dérivés oxydatifs provenant de l'action des cytochromes P450 3A4 sur l'irinotécan. Une réactivation du SN38G en SN38 est possible par la beta glucuronidase.

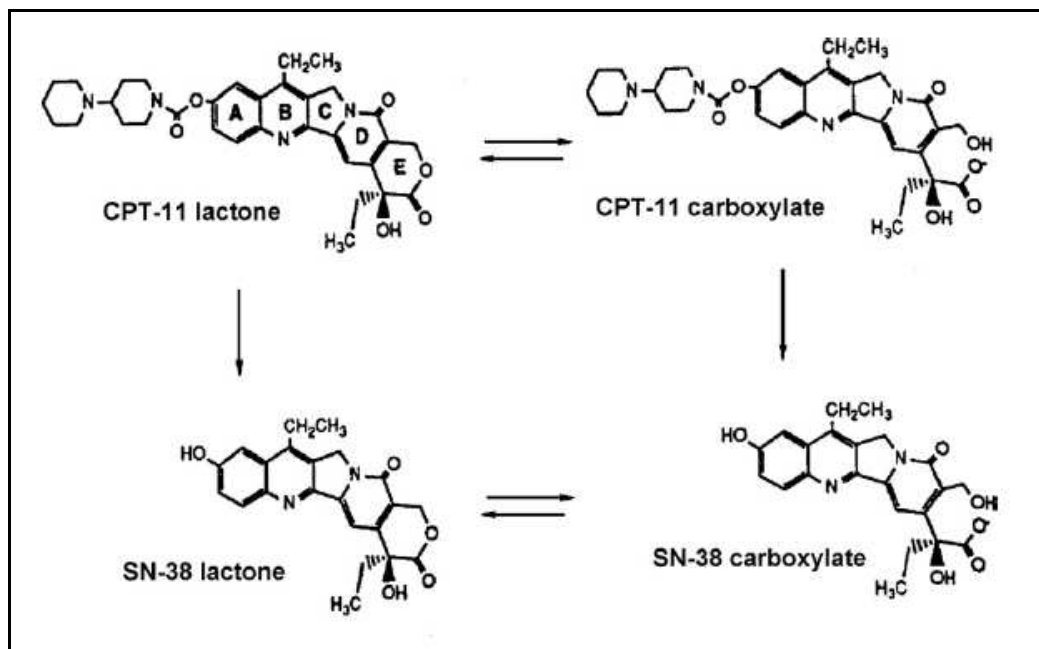


Figure 21- -Structure chimique de l'irinotécan (CPT-11) et du SN38 (Haaz 1997)

iii. Pharmacocinétique (Afssaps)

La cinétique est biphasique ou triphasique, linéaire, sans accumulation. La liaison aux protéines plasmatiques est d'environ 65% pour l'irinotécan et de 95% pour le SN38. La clairance plasmatique moyenne est de 15L/h/m^2 et le volume de distribution à l'état d'équilibre de 157L/m^2 . La demi-vie d'élimination varie entre 8,3h et 14,2 h pour l'irinotécan et entre 7,7h et 13,8h pour le SN38 (Abigeres 1995). 50% de la dose d'irinotécan administrée par voie IV est excrétée sous forme inchangée dont 33% principalement dans les fécès via la bile et 22% dans les urines. L'irinotécan inchangé est l'entité principale dans le plasma, suivi par l'APC, le SN38 glycuconjugué et le SN38. Les concentrations plasmatiques en SN38 sont 10 à 100 fois plus faibles que celles en irinotécan.

iv. Toxicité

La diarrhée et la neutropénie sont les deux toxicités limitantes de l'irinotécan. Les diarrhées sont potentiellement graves, habituellement retardées, parfois accompagnées de fièvre. Elles peuvent engager le pronostic vital. Le retentissement hématologique peut être sévère, à type d'aplasie, parfois compliquée d'infections systémiques. L'intensité des toxicités est en rapport avec l'exposition à l'irinotécan et au SN38 (Innocenti 2004 ; Carlini 2005).

v. Polymorphisme génétique

Il existe une grande variabilité inter- et intra-individuelle cinétique et métabolique liée à des polymorphismes génétiques des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'irinotécan. Le polymorphisme de l'UGT1A1 a été impliqué dans des modifications du métabolisme du SN38 provoquant une augmentation de la toxicité, notamment hématologique (Lyer 1998; Fisher 2000).

1.3 Travaux personnels

1.3.1 Quantification de l'irinotécan dans le plasma et dans le tissu pulmonaire de brebis

i. Irinotécan dans le plasma

Article n° 1: Simple liquid chromatography method for the quantification of irinotecan and SN38 in sheep plasma: application to in vivo pharmacokinetics after pulmonary artery chemoembolization using drug eluting beads.

Baylatry MT, Joly AC, Pelage JP, Bengrine-Lefevre L, Prugnaud JL, Laurent A, Fernandez C. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010 ;878 :738-42.

Intérêt

La quantification de l'irinotécan et de son métabolite actif dans le plasma de brebis est un préliminaire pour évaluer, dans nos études précliniques, les concentrations plasmatiques en irinotécan après chimioembolisation du poumon par microsphères chargées.

Problématique

Le dosage de l'irinotécan et de son métabolite actif (SN38) dans le plasma de brebis n'a jamais été décrit dans la littérature. Les méthodes publiées concernaient la quantification de ces principes actifs dans le plasma chez l'homme, chez le cochon ou chez la souris (Rivory 1994; de Bruijn 1997; Chollet 1998 ; Owens 2003; Taylor 2007; Kaneda 1997; Yang 2005; Bansal 2008). Ces méthodes appliquées au plasma de brebis, avec le matériel qui était à notre disposition, n'ont pas permis une séparation et une quantification satisfaisantes de l'irinotécan et du SN38.

Objectif

L'objectif de ce travail était la mise au point et la validation d'une technique de dosage rapide et simple pour quantifier l'irinotécan et le SN38 dans le plasma de brebis par chromatographie liquide couplée à la fluorescence.

Résumé de l'étude

Une méthode rapide et simple de dosage par chromatographie liquide couplée à un détecteur de fluorescence a été mise au point et validée pour la quantification simultanée de l'irinotécan et de son métabolite actif le SN38 dans le plasma de brebis.

La camptothécine a été utilisée comme étalon interne. Le prétraitement des échantillons consistait en une précipitation des protéines par l'acétonitrile. La séparation était réalisée sur une phase stationnaire greffée de type C18 (colonne de 250 mm x 4,5 mm, 5 μ m). L'élution était réalisée par une phase mobile constituée de phosphate de sodium dihydrogéné dihydraté 36mM et d'heptane sulfonate de sodium 4 mM / acétonitrile (72 :28, v/v), son pH était ajusté à 3 et le débit était fixé à 1,45 mL/min. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour la détection étaient respectivement de 355 nm et 515 nm. Le temps d'analyse total était de 13 min.

La méthode a été validée selon les critères de spécificité, de linéarité, de reproductibilité, de répétabilité, d'exactitude, de limite de quantification. Le rendement d'extraction et la stabilité des solutions ont également été décrits. La limite de quantification était de 5 ng/mL pour l'irinotécan et le SN38. La méthode était linéaire pour des concentrations comprises entre 5 ng/mL et 5000 ng/mL pour l'irinotécan, et 5 ng/mL et 240 ng/mL pour le SN38.

Cette méthode de dosage a été appliquée aux études de pharmacocinétiques plasmatiques de l'irinotécan libéré à partir des microsphères après chimioembolisation du poumon. Elle permet également la quantification de l'irinotécan et du SN38 dans la lymphe de brebis et dans le plasma humain.

L'irinotécan et le SN38 ont été quantifiés par cette méthode sous leur forme totale (forme lactone + forme carboxylate), l'interprétation clinique n'étant pas différente après dosage de la forme totale ou de la forme lactone de ces composés (Sasaki 1995).

Article n°1

Journal of Chromatography B, 878 (2010) 738–742



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb

Simple liquid chromatography method for the quantification of irinotecan and SN38 in sheep plasma: Application to in vivo pharmacokinetics after pulmonary artery chemoembolization using drug eluting beads

Minh-Tâm Baylatry^{a,b}, Anne-Christine Joly^b, Jean-Pierre Pelage^c, Leila Bengrine-Lefevre^d, Jean-Louis Prugnaud^b, Alex Laurent^{e,f}, Christine Fernandez^{a,*}

^a EA 2706, Paris Sud-XI University, Châtenay-Malabry, France

^b Anticancer Drug Unit, Pharmacy, Saint-Antoine Hospital, Paris, France

^c Radiology Unit, Ambroise Paré Hospital, Paris, France

^d Oncology Unit, Saint-Antoine Hospital, Paris, France

^e CR2i, INRA, Jouy en Josas, France

^f Interventional Neuroradiology Unit, Lariboisière Hospital, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2009

Accepted 16 January 2010

Available online 25 January 2010

Keywords:

Irinotecan

SN38

HPLC

Pharmacokinetics

Sheep

Chemoembolization

ABSTRACT

A rapid and simple liquid chromatography–fluorescence detection (LC–FD) method was developed and validated for the simultaneous quantification of irinotecan (CPT11) and SN38 in sheep plasma. Camptothecin (CPT) was used as the internal standard. A single step protein precipitation with acetonitrile was used for sample preparation. The separation was achieved using a 5 µm C18 column (250 mm × 4.5 mm, 5 µm) with a mobile phase composed of 36 mM sodium dihydrogen phosphate dehydrate and 4 mM sodium 1 heptane sulfonate–acetonitrile (72:28), the pH of the mobile phase was adjusted to 3. The flow rate was 1.45 ml/min and the fluorescence detection was operated at 355/515 nm (excitation/emission wavelengths). The run time was 13 min. The method was validated with respect to selectivity, extraction recovery, linearity, intra- and inter-day precision and accuracy, limit of quantification and stability. The method has a limit of quantification of 5 ng/mL for both CPT11 and SN38. The assay was linear over concentrations ranging from 5 to 5000 ng/mL and to 240 ng/mL for CPT11 and SN38, respectively. This method was used successfully to perform plasma pharmacokinetic studies of CPT11 after pulmonary artery embolization (PACE) in a sheep model. It was also validated for CPT11 and SN38 analysis in sheep lymph and human plasma.

© 2010 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Irinotecan (CPT11) is a potent inhibitor of topoisomerase I. It is one of the key drugs of anticancer chemotherapy, especially for the treatment of colorectal and lung tumors [1,2]. CPT11 is a pro-drug converted in vivo in humans by carboxylesterases to an active metabolite SN38 (Fig. 1). Both CPT11 and SN38 are prone to inter-conversion between lactone form and carboxylate form. The closed lactone configuration of SN38 is the pharmacological active form [3].

Drug eluting beads (DEB) are a new generation of embolization beads which behave as a drug delivery system [4]. They are used in chemoembolization which is a promising therapeutic

technique for treating cancers [5–8]. Chemoembolization is an alternative strategy to increase the local drug concentration and reduce systemic toxicity. This non-surgical technique consists of delivering directly to the tumor high concentrations of chemotherapeutic agents which are combined with or loaded in embolization beads. The purpose of embolization beads is to achieve nutrient and oxygen starvation of the tumor and to minimize chemotherapy wash-out with prolonged contact with tumor tissue. DEB can be loaded with CPT11 (DEB–CPT11) and administered intra-arterially [4,8]. This drug device combination may offer the possibility to precisely control the release and the dose of drug into the tumor bed.

DEB–CPT11 have been evaluated successfully in preclinical and clinical studies for hepatic embolization [8–11]. No preclinical or clinical study with DEB–CPT11 was published for lung embolization. For a preclinical study evaluating DEB–CPT11 for pulmonary artery chemoembolization (PACE), we have chosen sheep, a classical model for embolization [12–14]. Sheep is a suitable model for lung embolization because of its similarities with human lung physiology and architecture. Furthermore, the same medical devices and

* Corresponding author at: Groupe Hospitalier Pitie Salpetriere, Service Pharmacie, 47 boulevard de l'hopital, 75013 Paris, France. Tel.: +33 1 42 16 20 12; fax: +33 1 42 16 20 10.

E-mail address: christine.fernandez@psl.aphp.fr (C. Fernandez).

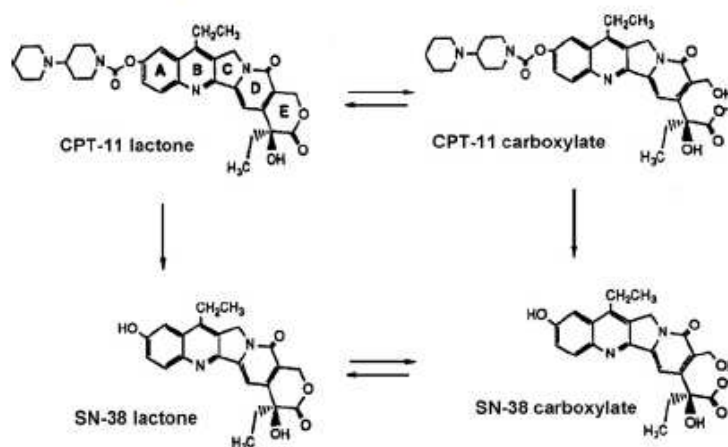


Fig. 1. Chemical structures of irinotecan and SN38 (lactone and carboxylate forms).

DEB size are used for embolization procedures. Hence, with sheep, we are in nearest human situations for PACE.

Our preclinical study purpose is first to evaluate *in vivo* the safety and efficacy of CPT11 release from DEB in a sheep lung embolization model. To the best of our knowledge, no available method is published for the determination of CPT11 and SN38 in sheep plasma.

Liquid chromatography (LC) methods have already been described for the determination of CPT11 and SN38 in plasma. Most of the published methods include long extraction procedures with solid-phase extraction or multi-step liquid–liquid extraction including evaporation step [15–18] or require specific and expensive equipment as mass spectrometer or fluorescence detector with automatically switch wavelengths [19–21]. The aim of this study was to develop and validate a sensitive, rapid and simple LC method for CPT11 and SN38 quantification using standard laboratory equipment, in order to study CPT11 and SN38 pharmacokinetics in sheep plasma after PACE with DEB. The assay was applied to a preclinical study. It was also successfully applied to sheep lymph and human plasma analysis and will be used in further studies.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Irinotecan solution (Campto[®] 20 mg/mL, Pfizer, France) was used to prepare standards. Camptothecin (95% purity) was purchased from Sigma–Aldrich (St Quentin Fallavier, France) and used as the internal standard (IS). SN38 was supplied by Pfizer (USA). HPLC grade acetonitrile was obtained from Sigma–Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Sodium 1 heptane sulfonate and sodium dihydrogen phosphate dehydrate were of analysis grade purchased from Sigma–Aldrich (St Quentin Fallavier, France). HCl 37% (hydrochloric acid) Normapur[®] and H₃PO₄ 85% (orthophosphoric acid) Normapur[®] were obtained from VWR Prolabo (Fontenay sous bois, France). DMSO was obtained from Acros Organics (Geel, Belgium). Deionized water was obtained from Fresenius (Sevres, France). Drug-free sheep plasma was obtained from the CR2i investigation unit (INRA, Jouy en Josas, France).

2.2. Instrumentation and chromatographic conditions

The liquid chromatography equipment consisted of a Dionex ASI 100 T model coupled with a fluorescence detector (RF 2000).

The chromatographic separation was achieved on a Wakosil II C18 RS (250 mm × 4.5 mm, 5 μm, SGE, France) analytical column protected by a C18 Wakosil precolumn (4.0 mm × 4.0 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of 36 mM sodium dihydrogen phosphate dehydrate and 4 mM sodium 1 heptane sulfonate–acetonitrile (72:28). The pH of the mobile phase was adjusted to 3 with 1 M orthophosphoric acid. The flow used was 1.45 mL/min and the column temperature was set at 27 °C. Fluorescence detector excitation and emission wavelength were set at 355 nm and 515 nm, respectively.

2.3. Stock and standard solutions

Individual stock solutions of SN38 (0.5 mg/mL) and IS (1 mg/mL) were prepared in DMSO. After preparation, the stock solution was divided into aliquots and stored at –20 °C. CPT11 (Campto[®] solution 20 mg/mL) was stored at 4 °C after opening [22,23].

Separate stock solutions were prepared for the calibration curve samples and quality controls. Solutions were obtained by serial dilutions of CPT11 and SN38 stock solutions with the mobile phase. Calibration standards and quality controls were prepared by spiking 100 μL of drug-free sheep plasma with 100 μL of these solutions. Plasma calibration standards were in the range of 5–5000 and 5–240 ng/mL for CPT11 and SN38, respectively. Quality control concentrations were 10, 100 and 3500 ng/mL for CPT11, 20 and 150 ng/mL for SN38.

2.4. Sample preparation

Plasma samples were thawed at room temperature and 100 μL of IS solution was added to 100 μL of plasma. Samples were vortex-mixed for 10 s. 400 μL of acetonitrile was added for protein precipitation. Centrifugation was performed at 3000 × *g* for 5 min. 100 μL of HCl (1 M) was added to 100 μL of the supernatant for the conversion of carboxylate to lactone forms. 200 μL of this mixture was injected into the LC system.

2.5. Method validation

2.5.1. Selectivity

The selectivity of the method was assessed by analyzing 9 independent blank plasma samples obtained from drug-free sheep.

2.5.2. Extraction recovery

The extraction recovery of CPT11 and SN38 from plasma was determined at several concentrations: 10, 100 and 3500 ng/mL for CPT11; 20 and 150 ng/mL for SN38. Samples ($n=6$ per day and per concentration over 3 days) were analyzed and the resultant peak areas were compared to those obtained from direct injection of standard solutions of equivalent concentrations. The recovery of IS was determined similarly.

2.5.3. Linearity

The linearity of the method was assessed using the calibration curves ($n=3$) in the range of 5–5000 and 5–240 ng/mL for CPT11 and SN38, respectively. Calibration curves were constructed by plotting peak area ratios of CPT11 or SN38 to IS against concentration with a weight of $1/\chi$.

2.5.4. Accuracy and precision

The intra- and inter-day accuracy and precision were evaluated by the analysis of LLOQ, low and high quality control (QC) samples ($n=6$ samples per concentration) on the same day, over 3 days. The concentration of each sample was determined using calibration standards prepared on the same day. Accuracy was calculated as the relative error (%RE) from the respective nominal concentration. The precision was estimated as percentage relative standard deviation (%RSD).

2.5.5. Stability

To determine the stability of samples stored at room temperature over 24 h, additional sets of samples were stored at ambient temperature. All determinations were conducted in triplicate.

2.6. Application of the method

2.6.1. Pharmacokinetic study after PACE in sheep model

The proposed method was applied to measure the plasmatic release of CPT11 from DEB after PACE on 28 adult sheep, weighing between 70 and 85 kg. Animal housing, handling and experimentation were performed in accordance with the guidelines issued by the European Economic Community (Journal Officiel de la Communauté Européenne, 18/12/86-authorization L3600; animal house licence number A78716). 24 sheep were embolized with 2 mL of 300–500 μm DEB (DC Bead™ Biocompatibles Ltd., UK) preloaded with 0, 20, 50 or 100 mg (DEB maximum capacity). DEB–CPT11 were delivered into the left pulmonary artery by selective catheterisation, under fluoroscopic guidance. In the control group ($n=4$), CPT11 was directly injected in the pulmonary artery without any vector (50 and 100 mg). Sheep sacrifice was performed after 4 days or 4 weeks. Blood was sampled at various times up to sacrifice. Blood samples were collected on heparin and centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min. Plasma was stored at -20°C until analysis. Pharmacokinetic parameters: AUCs of average profiles, C_{max} (maximum plasma concentration) and $t_{1/2}$ (plasma terminal half-life) were used for comparisons between groups. They were determined using WinNonLin® software (v 4.1). Data were compared using a Mann–Whitney test (MW) (Statview®, v 5).

2.6.2. Application to sheep lymph dosage

We applied this method to sheep lymph and proceed to the same validation as in plasma (selectivity, extraction recovery, linearity, accuracy and precision).

2.6.3. Application to human plasma dosage

This method was applied to the determination of CPT11 and SN38 in plasma from one patient who received an intravenous infusion of CPT11.

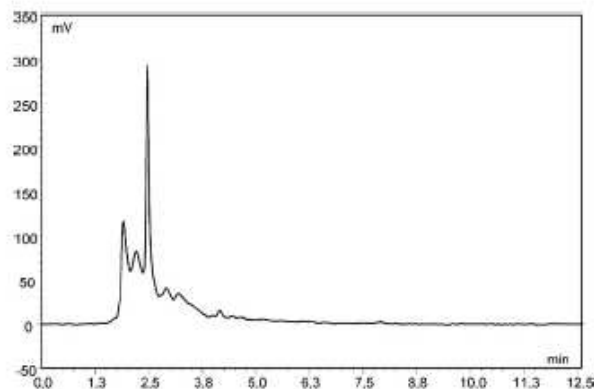


Fig. 2. Chromatogram of blank sheep plasma (for chromatographic conditions, see text).

3. Results and discussion

3.1. Liquid chromatography method

Lactone forms of CPT11 and SN38 were unstable after storage at room temperature [17], requiring a rapid freezing of biological samples after blood collection to prevent continued hydrolysis to the carboxylate forms [24]. Owing to limited clinical applicability of methods based on estimation of lactone levels only, total (lactone plus carboxylate forms) concentrations of CPT11 and SN38 were measured in the present study. Moreover, the monitoring of total CPT11 and SN38 has essentially the same clinical significance as the monitoring of lactone CPT11 and SN38 [25].

Fluorescence detector operated at excitation and emission wavelengths of 355 nm and 515 nm, respectively, which yielded the optimum signal-to-noise ratio for all compounds. The composition and the pH of our mobile phase were selected in order to optimize separation factors and peak shapes of the analytes. The total run time was 13 min. The retention times of CPT11, SN38 and CPT were respectively 4.7, 6.5 and 8 min.

3.2. Sample preparation, selectivity and extraction recovery

We used a simple one-step protein precipitation–extraction with acetonitrile in order to minimize base-line distortion and optimize extraction recovery. As shown in Figs. 2 and 3, analysis of plasma samples prepared using extraction with acetonitrile showed no peak interferences with CPT11, SN38 and IS. The mean extraction recoveries for CPT11 in plasma were $96 \pm 6\%$ at

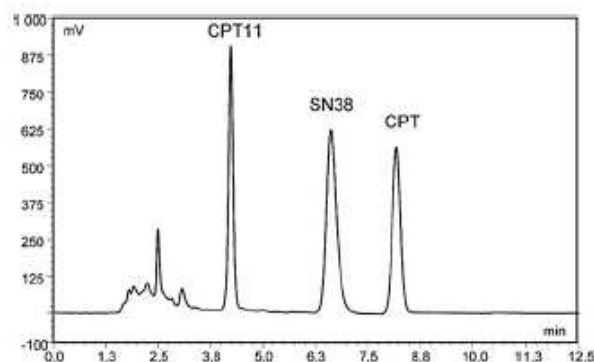


Fig. 3. Chromatogram of plasma spiked with CPT11 (100 ng/mL), SN38 (150 ng/mL) and CPT (65 ng/mL) (for chromatographic conditions, see text).

Table 1
Intra-day ($n=6$) and inter-day ($n=3$) precision and accuracy for CPT11 and SN38 analysis.

		Quality control samples (ng/mL)					
		CPT11			SN38		
		Range 1		Range 2		20	150
		10	100	100	3500		
Accuracy	Mean (%RE)	96.4	104.2	106.1	102.5	96.6	100.4
Precision	Intra-day (%RSD)	5.6	1.6	1.1	0.7	1.6	0.8
	Inter-day (%RSD)	11.1	2.6	3.6	2.9	3.9	5.0

10 ng/mL, $99 \pm 2\%$ at 100 ng/mL and $99.7 \pm 0.3\%$ at 3500 ng/mL and for SN38, $96 \pm 4\%$ at 20 ng/mL and $97 \pm 5\%$ at 150 ng/mL. The mean recovery for IS from plasma was $99.0 \pm 0.4\%$. These results suggest that there is no relevant difference in extraction recovery at different concentrations of CPT11 and SN38 in plasma samples. Our precipitation–extraction method is cheap, simple and has very good extraction recoveries when compared to the previously reported solid-phase extraction methods [15,16].

Acidification of plasma by the addition of HCl (1 M) was achieved in order to shift the equilibrium hydrolysis reaction between the two drug forms (lactone and carboxylate) towards the lactone form.

3.3. Linearity and lower limit of quantification

Because of the large range of concentrations studied (5–5000 ng/mL), two calibration curves were necessary for the quantification of CPT11: one for low (5–100 ng/mL) and the other for high concentrations (100–5000 ng/mL). Both calibration curves were linear in the studied range. Representative linear equations for CPT11 in plasma were $y=2.1305x+4.2509$ in the range of 5–100 ng/mL and $y=0.0447x-0.2742$ in the range of 100–5000 ng/mL. For SN38 in plasma, the linear equation was $y=0.8613x+0.3165$ in the range of 5–240 ng/mL. Coefficients of correlation (r^2) for CPT11 and SN38 in plasma were ≥ 0.998 .

CPT11 and SN38 LLOQ was 5 ng/mL in plasma for an accuracy between 85 and 115% and a $RSD \leq 15\%$. This value is equivalent or slightly higher than those reported in some publications [17,18,21,26] that validated their methods with an accuracy between 80 and 120% and a $RSD \leq 20\%$. Within these limits, our LLOQ would be 2 ng/mL. Improvements in sensitivity could be achieved by increasing the gain of fluorescence detector. However, the sensitivity of our method is acceptable for our preclinical study goal.

3.4. Accuracy and precision

For acceptable intra- and inter-day values, accuracy should be within 85–115% and RSD values should be $\leq 15\%$ over the calibration range. Our method showed good accuracy and precision in plasma samples. The results are presented in Table 1.

3.5. Stability

The results of stability experiments showed that no significant degradation occurred at ambient temperature within 24 h, allowing samples to be prepared during the day with consecutive analysis overnight. All the RSD values were under 10%.

3.6. Application of the method

3.6.1. Pharmacokinetic study after PACE in sheep model

CPT11 eluted from DEB appeared rapidly in plasma after embolization and T_{max} was within the first 5 min. C_{max} and AUC of CPT11 in control groups were significantly higher than those in embolized groups at several times ($p=0.0036$ and $p=0.0393$, respectively) (Fig. 4). Therefore, DEB allowed sustained CPT11 delivery. In embolized groups, C_{max} and AUC of CPT11 increased significantly with loaded CPT11 dose ($p=0.0078$ and $p=0.0008$, respectively) (Fig. 5). The release of CPT11 from DEB in plasma lasted several hours (4–6 h) for groups 20 and 50 mg and 24 h for group 100 mg. Half-life elimination was not significantly different between groups. SN38 was not detected in any sheep plasma sam-

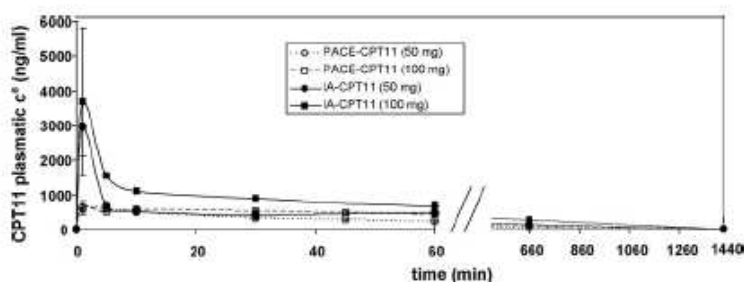


Fig. 4. Mean plasma concentration–time curves of CPT11 after PACE versus direct intra-arterial (IA) injection ($n=16$ animals).

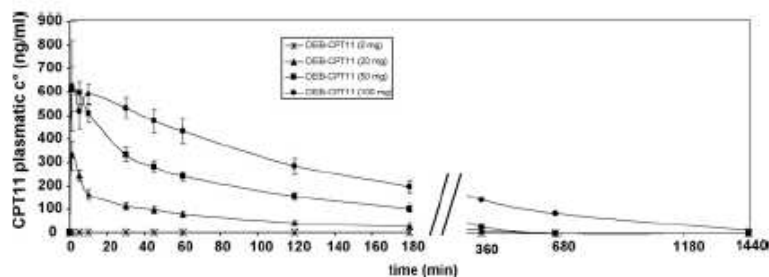


Fig. 5. Mean plasma concentration–time curves of CPT11 after PACE using 0, 20, 50 and 100 mg preloaded DEB–CPT11 ($n=24$ animals).

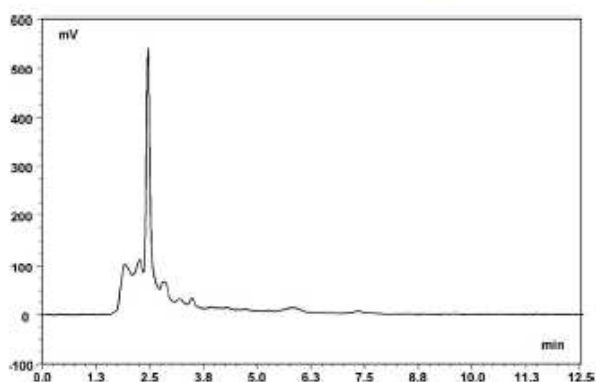


Fig. 6. Chromatogram of blank human plasma of non-treated volunteers (for chromatographic conditions, see text).

ple. This result can be explained by the absence [27] or the very low activity in sheep plasma of the carboxylesterase enzyme responsible for CPT11 activation to SN38. Koizumi et al. reported less than 5 ng/mL for SN38 C_{max} after intravenous administration of CPT11 (100 mg) to sheep weighing 28–32 kg [28].

3.6.2. Application to sheep lymph dosage

The method was successfully applied to sheep lymph for the determination of CPT11. The extraction recoveries were $\geq 99\%$. Calibration curves were linear over a range of 5–3500 ng/mL and correlation coefficients were greater than 0.999. The accuracy was $\geq 95\%$ and the intra- and inter-day precision was $\leq 10\%$. The LLOQ was 5 ng/mL. This assay will be used for the second part of our study on CPT11 distribution in lymph and plasma after PACE using DEB–CPT11 versus IV administration.

3.6.3. Application to human plasma dosage

The analysis of blank plasmas of non-treated volunteers showed no matrix effect on CPT11, SN38, CPT analysis (Figs. 3 and 6). Our method was applied to determine CPT11 and SN38 concentrations in plasma following a 90 min infusion of CPT11 (100 mg/m²) to one patient. CPT11 and SN38 concentrations 30 min after the end of infusion were respectively 2656 and 22 ng/mL. Hence, our method can be easily applied to human plasma to determine CPT11 and SN38 plasmatic concentrations.

4. Conclusion

This paper reports the first analysis of CPT11 and SN38 in sheep plasma. This method is rapid, simple and not expensive. Moreover, it is sensitive, specific, accurate, reproducible and offers significant advantages over the existing methods in terms of chromatographic conditions and sample preparation. Furthermore, our method can also be easily applied to sheep lymph or human plasma analysis and

it was successfully applied to a pharmacokinetic study on plasmatic release of CPT11 from DEB after PACE in a sheep model.

Acknowledgement

The authors would like to thank C. Guntz and the team of CR2i for their technical assistance.

References

- [1] U. Vanhoefer, A. Harstrick, W. Achterath, S. Cao, S. Seeber, Y.M. Rustum, J. Clin. Oncol. 19 (2001) 1501.
- [2] A. Sandler, Oncology 16 (2002) 419.
- [3] R.P. Hertzberg, M.J. Caranfa, K.G. Holden, D.R. Jakas, G. Gallagher, M.R. Mattern, S.M. Mong, J.O. Bartus, R.K. Johnson, W.D. Kinsbury, J. Med. Chem. 32 (1989) 715.
- [4] DC Bead™ Instruction for use, www.biocompatibles.com/pages/dc-bead-instructions-for-use, 2009.
- [5] J. Kettenbach, A. Stadler, I.V. Katzler, R. Scherthaner, M. Blum, J. Lammer, T. Rand, Cardiovasc. Intervent. Radiol. 31 (2008) 468.
- [6] K. Malagari, K. Chatzimichael, E. Alexopoulou, A. Kelekis, B. Hall, S. Dourakis, S. Delis, A. Gouliamos, D. Kelekis, Cardiovasc. Intervent. Radiol. 31 (2008) 269.
- [7] M. Varela, M.I. Real, M. Burrel, A. Forner, M. Sala, M. Brunet, C. Avuso, L. Castells, X. Montana, J.M. Llovet, J. Bruix, J. Hepatol. 46 (2007) 474.
- [8] G. Fiorentini, C. Aliberti, G. Turrisi, A. Del Conte, S. Rossi, G. Benea, P. Giovanis, In Vivo 21 (2007) 1085.
- [9] Y. Tang, R.R. Taylor, M.V. Gonzalez, A.L. Lewis, P.W. Stratford, J. Control. Release 116 (2006) 55.
- [10] R.R. Taylor, Y. Tang, M.V. Gonzalez, P.W. Stratford, A.L. Lewis, Eur. J. Pharm. Sci. 30 (2007) 7.
- [11] E. Eyol, A. Boleij, R.R. Taylor, A.L. Lewis, M.R. Berger, Clin. Exp. Metastasis 25 (2008) 273.
- [12] M. Wassef, J.P. Pelage, E. Velzenberger, J. Namur, I. Schwartz-Cornil, R.R. Taylor, A.L. Lewis, A. Laurent, J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater. 86 (2008) 63.
- [13] J.P. Pelage, A. Laurent, M. Wassef, M. Bonneau, D. Germain, R. Rymer, P. Flaud, J. Martal, J.J. Merland, Radiology 224 (2002) 436.
- [14] J.P. Pelage, A. Laurent, M. Bonneau, M. Wassef, R. Rymer, J.J. Merland, Invest. Radiol. 36 (2001) 721.
- [15] I. Barilero, D. Gandia, J.P. Armand, A. Mathieu-Boué, M. Rê, A. Gouyette, G.G. Chabot, J. Chromatogr. 575 (1992) 275.
- [16] L.P. Rivory, M. Findlay, S. Clarke, J. Bishop, J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 714 (1998) 355.
- [17] P. de Bruijn, J. Verweij, W.J. Loos, K. Nooter, G. Stoter, A. Sparreboom, J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 698 (1997) 277.
- [18] H. Sumiyoshi, Y. Fujiwara, T. Ohune, N. Yamaoka, K. Tamura, M. Yamakido, J. Chromatogr. B: Biomed. Appl. 670 (1995) 309.
- [19] S. Ragot, P. Marquet, F. Lachâtre, A. Rousseau, E. Lacassie, J.M. Gaulier, J.L. Dupuy, G. Lachâtre, J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 736 (1999) 175.
- [20] S. Bardin, W. Guo, J.L. Johnson, S. Khan, A. Ahmad, J.X. Duggan, J. Ayoub, I. Ahmad, J. Chromatogr. A 1073 (2005) 249.
- [21] J. Escoriaza, A. Aldaz, C. Castellanos, E. Calvo, J. Giraldez, J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 740 (2000) 159.
- [22] Notice Campto® 20 mg/mL, solution à diluer pour perfusion (IV), Pfizer France, Date de revision: 22/04/2008.
- [23] Dossier du CNHIM: Anticancéreux utilisation pratique, 6ème ed., 2008, Montry, France, p. 312.
- [24] J.H. Beijnen, B.R. Smith, W.J. Keijzer, R. van Gijn, W.W. ten Bokkel Huinink, L.T. Vlasveld, S. Rodenhuis, W.J. Underberg, J. Pharm. Biomed. Anal. 8 (1990) 789.
- [25] Y. Sasaki, Y. Yoshida, K. Sudoh, H. Hakusui, H. Fujii, T. Ohtsu, H. Wakita, T. Igarashi, K. Itoh, Jpn. J. Cancer Res. 86 (1995) 111.
- [26] T.S. Owens, H. Dodds, K. Fricke, S.K. Hanna, K.R. Crews, J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 788 (2003) 65.
- [27] B. Li, M. Sedlacek, I. Manoharan, R. Boopathy, E.G. Duysen, P. Masson, O. Lockridge, Biochem. Pharmacol. 70 (2005) 1673.
- [28] T. Koizumi, K. Kubo, M. Hanaoka, T. Miyahara, T. Kaneki, H. Yamamoto, R.L. Ge, K. Fujimoto, T. Kobayashi, M. Sekiguchi, Arzneimittelforschung 48 (1998) 1097.

ii. Irinotécan dans le tissu pulmonaire

La quantification de l'irinotécan et du SN38 dans le tissu pulmonaire est essentielle pour vérifier que le principe actif est effectivement libéré des microsphères en quantité suffisante dans le tissu. Namur et son équipe ont validé une technique de microspectroscopie infrarouge qui permet de quantifier de façon distincte l'irinotécan dans les microsphères et l'irinotécan réellement libéré dans le tissu (Namur 2009 a). Cette technique en raison de son seuil de quantification élevée (5 mg/mL) n'a pas été retenue pour nos études. Les études *in vitro* ont montré que les microsphères chargées en irinotécan, contrairement à la doxorubicine, libéraient complètement l'irinotécan contenu dans les microsphères en quelques heures (Taylor 2007; Namur 2009 a). La quantification de l'irinotécan à partir d'homogénats de tissus prélevés quelques jours après la chimioembolisation lors du sacrifice des brebis devrait donc à priori renseigner à elle seule la quantité d'irinotécan libérée dans le tissu pulmonaire (la quantité d'irinotécan contenue dans les microsphères étant à priori négligeable).

Nous avons adapté la méthode de dosage de l'irinotécan et du SN38 décrite précédemment au dosage dans le tissu pulmonaire de brebis. La validation de la méthode a été réalisée à partir de prélèvements de tissu sain pulmonaire non embolisé de brebis surchargés en irinotécan et en SN38. Le rendement d'extraction à partir du tissu pulmonaire était supérieur à 95%. Les coefficients de variation pour la répétabilité, la reproductibilité et l'exactitude étaient inférieurs à 10%. La zone de linéarité se situait entre 5 ng/mL et 3500 ng/mL pour l'irinotécan et entre 5 ng/mL et 100 ng/mL pour le SN38 (le coefficient de corrélation r^2 était supérieur à 0,997 pour l'irinotécan et le SN38). La limite de quantification était de 5 ng/mL pour l'irinotécan et le SN38.

La préparation des échantillons tissulaires avant quantification a comporté plusieurs étapes :

- pesée de l'échantillon tissulaire
- homogénéisation dans du Tris-HCl 1 M (pH 8,1) glacial suivie d'une centrifugation à + 4°C
- ajout de l'étalon interne (la camptothécine) au surnageant puis addition de HCl 0,01N jusqu'à 1 mL
- extraction solide-liquide sur une colonne C18 conditionnée
- évaporation à sec de l'éluat sous azote liquide
- reprise du résidu sec par 1 mL de phase mobile puis centrifugation.

Le surnageant obtenu était injecté dans le système chromatographique (100µL).

1.3.2 Chimioembolisation de l'artère pulmonaire

Article n° 2: Pulmonary artery chemoembolization in a sheep model: evaluation of performance and safety of irinotecan eluting beads (DEB-IRI).

Baylatry MT, Pelage JP, Wassef M, Ghegediban H, Joly AC, Lewis A, Lacombe P, Fernandez C, Laurent A. *J Biomed Mater res B App Biomater* 2011; 98B (2), 351-9.

Problématique

Les microsphères peuvent être chargées par différentes doses en irinotécan. Une faible dose devrait être bien tolérée mais pourrait être insuffisante pour obtenir une efficacité thérapeutique. Au contraire, une forte dose serait probablement efficace mais pourrait induire une toxicité. La détermination de la dose maximale chargeable en irinotécan dans les microsphères de chimioembolisation en termes de performance de libération et de tolérance après chimioembolisation de l'artère pulmonaire est un préalable indispensable pour mener la suite de nos études sur la chimioembolisation du poumon par microsphères chargées en irinotécan.

Objectif

Notre objectif était de comparer les performances (concentrations systémique et tissulaire en irinotécan) et la tolérance (toxicités systémique et locale) des microsphères de chimioembolisation chargées en irinotécan à 3 doses de chargement : 20 mg, 50 mg et 100 mg (capacité maximale de chargement) après chimioembolisation de l'artère pulmonaire dans un modèle pulmonaire sain de brebis.

Résumé de l'étude

La chimioembolisation de l'artère pulmonaire a été réalisée chez 24 brebis avec des microsphères de chimioembolisation (300-500 µm) chargées, ou non, par différentes doses d'irinotécan (0, 20, 50 ou 100 mg) (n=6 brebis par dose). Une injection directe d'irinotécan libre à 50 mg et 100 mg dans l'artère pulmonaire a été réalisée chez 4 brebis (n=2 brebis par dose).

L'irinotécan a été quantifié dans le plasma à différents temps après la chimioembolisation. La quantification tissulaire et l'examen anatomopathologique des poumons ont été réalisés sur des échantillons prélevés lors du sacrifice 4 jours ou 4 semaines après la chimioembolisation.

La chimioembolisation pulmonaire par microsphères chargées en irinotécan a bien été tolérée par les brebis : aucune diarrhée ni infection n'a été observée.

Au niveau systémique, les microsphères chargées en irinotécan ont permis, par comparaison avec une injection IA directe d'irinotécan en solution, une diminution significative des concentrations systémiques en irinotécan (diminution de 80% de la Cmax ($p=0,0036$) et de 50% de l'AUC ($p=0,0393$)). Néanmoins, l'irinotécan était détecté dans le plasma quelques minutes après la chimioembolisation avec un pic plasmatique observé entre 2 et 10 minutes et ce quelle que soit la dose d'irinotécan chargée dans les microsphères. La Cmax et l'AUC plasmatiques ont augmenté significativement avec la dose chargée en irinotécan ($p=0,0078$ et $p=0,0008$ respectivement). La clairance d'élimination de l'irinotécan après chimioembolisation n'est pas significativement différente entre les différentes doses d'irinotécan chargées dans les microsphères suggérant que les capacités d'élimination n'étaient pas saturées dans les conditions expérimentales. La clairance observée après chimioembolisation est significativement plus élevée que celle après injection IA directe d'irinotécan, les concentrations plasmatiques en irinotécan après chimioembolisation étant beaucoup plus faibles que celles après injection IA. Les résultats pharmacocinétiques sont présentés dans le tableau 5.

Au niveau du tissu pulmonaire, 4 jours après la chimioembolisation, ni l'irinotécan, ni le SN38 n'ont été détectés. Une nécrose vasculaire et du parenchyme autour des vaisseaux occlus, liée à la diffusion de l'irinotécan, a été observée 4 jours après la chimioembolisation uniquement pour les microsphères chargées à 100 mg d'irinotécan. Cette nécrose n'a plus été observée après 4 semaines. La réaction inflammatoire a été modérée et était liée à l'implantation d'un corps étranger.

Les microsphères chargées en irinotécan jusqu'à 100 mg (dose maximale de chargement) ont été relativement bien tolérées par les brebis. Les doses de 20 mg et 50 mg sont peut-être insuffisantes pour espérer une action thérapeutique de l'irinotécan. La dose de 100 mg a permis une diffusion locale du principe actif autour des vaisseaux et semble plus intéressante.

Les microsphères ont permis une libération prolongée de l'irinotécan au vu des concentrations plasmatiques. L'absence d'irinotécan détectable dans le tissu pulmonaire suggère qu'il était totalement libéré des microsphères et rapidement éliminé du tissu. Cette élimination rapide pourrait être liée à la vasodilatation réactionnelle des artères bronchiques après occlusion de l'artère pulmonaire.

Le SN38 n'a pas été détecté dans le plasma de brebis. Ce résultat s'explique par l'absence d'esterase convertissant l'irinotécan en SN38 dans le plasma de brebis (Li 2005) et par l'administration IA du médicament qui court-circuite l'activation de l'irinotécan en SN38 lors du premier passage hépatique. Contrairement au plasma, des carboxylesterases activant l'irinotécan en SN38 sont exprimées dans le tissu pulmonaire de brebis (Koizumi 1998). Une étude ultérieure montrera que dans certaines conditions expérimentales, le SN38 était détectable dans le tissu pulmonaire de brebis.

Tableau 5– Paramètres pharmacocinétiques de l'irinotécan après chimioembolisation de l'artère pulmonaire par microsphères chargées en irinotécan et après injection directe dans l'artère pulmonaire d'irinotécan libre (KW : Kruskal Wallis ; MW : Mann Whitney)

	Microsphères 20 mg irinotécan	Microsphères 50 mg irinotécan	Microsphères 100 mg irinotécan	KW test
Cmax (ng/ml)	349 ± 129	663 ± 159	767 ± 264	p=0.0078
Tmax (min)	2 ± 0	2 ± 0	10 ± 2	p=0.2415
T1/2 (min)	73 ± 8	100 ± 37	215 ± 113	p=0.0451
AUC_{0-∞} (ng.min/ml)	16 156 ± 5 657	56 862 ± 14 621	134 627 ± 54 020	p=0.0008
Clairance (ml/min)	1387 ± 90	937 ± 47	879 ± 71	p=0.0970
	-	Injection IA 50 mg irinotécan	Injection IA 100 mg irinotécan	MW test (vs chimioembolisation par microsphères chargées à 50 et 100 mg d' irinotécan)
Cmax (ng/ml)	-	2 952 ± 583	3 686 ± 1 498	p=0.0036
Tmax (min)	-	1 ± 0	3 ± 1	p=0.3631
T1/2 (min)	-	220 ± 1	200 ± 6	p=0.3320
AUC_{0-∞} (ng.min/ml)	-	138 652 ± 3 148	221 675 ± 18 455	p=0.0393
Clairance (ml/min)	-	361 ± 8	457 ± 38	p=0.0053

Article n°2**Pulmonary artery chemoembolization in a sheep model: Evaluation of performance and safety of irinotecan eluting beads (DEB-IRI)****Minh-Tâm Baylatry,^{1,2} Jean-Pierre Pelage,³ Michel Wassef,⁴ Homayra Ghegediban,⁴ Anne-Christine Joly,² Andrew Lewis,⁵ Pascal Lacombe,³ Christine Fernandez,¹ Alex Laurent^{6,7}**¹UPRES EA 2706 Department, Paris Sud-XI University, Châtenay-Malabry, France²Anticancer drug unit, Pharmacy Department, AP-HP, Saint-Antoine Hospital, Paris, France³Radiology Department, AP-HP, Ambroise Pare Hospital, Boulogne, France⁴Anatomo-Pathology Department, AP-HP, Lariboisiere Hospital, Paris, France⁵Research and Technology Department, Biocompatibles UK Ltd., Farnham Business Park, Farnham, Surrey, UK⁶CR2i Department, INRA, Jouy en Josas, France⁷Interventional Neuroradiology Department, AP-HP, Lariboisiere Hospital, Paris, France

Received 24 October 2010; accepted 24 February 2011

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.b.31858

Abstract: The purpose of this study was to evaluate and compare plasma pharmacokinetics, lung tissue concentration, and the potential toxicity of drug eluting beads loaded with irinotecan (DEB-IRI) in a sheep pulmonary artery chemoembolization (PACE) model. Sheep ($n = 24$) were embolized with DEB-IRI loaded with different doses (0, 20, 50, or 100 mg). Direct pulmonary artery (PA) injections of irinotecan were also performed at two doses (50 or 100 mg; $n = 4$ sheep). Irinotecan was quantified in plasma and lung tissue (liquid chromatography-fluorescence detection); pathological examination of lungs was performed 4 days or 4 weeks after PACE. Irinotecan was detected in the systemic circulation within a few minutes after PACE, for several hours in DEB-IRI 20 and DEB-IRI 50 groups, and for 24 hours for DEB-IRI 100. Both C_{max} and AUC values increased significantly with dose ($p = 0.0078$ and $p = 0.0008$,

respectively) after PACE. C_{max} and AUC values were significantly reduced (by 80%, $p = 0.0036$, and by 50%, $p = 0.0393$, respectively) after PACE than after direct PA injection. Irinotecan was not detected in tissue 4 days after PACE. No sign of lung toxicity was observed, except a limited hemorrhagic angioneurosis seen 4 days after PACE with DEB-IRI 100. Inflammatory response on beads was moderate in all DEB-IRI groups. Compared to other routes of administration, DEB loaded with irinotecan at doses up to 100 mg was well tolerated. DEB loaded with 100 mg irinotecan seem a promising candidate for future PACE trials in patients. © 2011 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 00B:000-000, 2011.

Key Words: chemoembolization, drug eluting beads, irinotecan, lung, pulmonary artery

INTRODUCTION

Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality worldwide. Current available treatments include surgical resection feasible in very few patients and systemic chemotherapy, which has no major impact on survival.¹⁻³ The high-dose systemic chemotherapy to reach effective antitumor concentrations in the lung has dose-limiting side effects.⁴

To achieve high local drug levels with minimal systemic toxicity, regional chemotherapy approaches have been developed, such as isolated lung perfusion (ILP), pulmonary or bronchial arterial infusion, and pulmonary artery (PA) chemoembolization (PACE) with an emulsion of chemotherapy and ethiodized oil.⁵⁻⁹ Despite significant higher drug concentrations in lung tissue compared to intravenous (IV) infusion,^{7,9-11} these techniques only provided limited success. ILP requires thoracotomy and the use of an extracorporeal cardiovascular circulation and the response rate is low with a potentially increased morbidity.^{12,13} Infusion of

anticancer drugs by a selective catheterization of the bronchial or pulmonary arteries feeding the tumor is less invasive than ILP, and tumor regression has been reported, without severe complications but survival time was not prolonged.^{6,14,15} As a rapid drug washout at the end of the infusion may decrease local antitumor efficacy,⁷ PACE with ethiodized oil has been recently proposed for the treatment of unresectable lung metastases.^{8,16} This transcatheter technique consists of the local delivery of high concentrations of chemotherapeutic agents emulsified in ethiodized oil, associated with vessel occlusion with an embolic material. When performed using mitomycin C and starch microspheres, this technique was associated with a limited efficacy, partly due to a low uptake of mitomycin C-ethiodized oil mixture.⁸

A novel therapeutic approach to chemoembolization has been recently introduced using drug eluting beads (DEB), which are calibrated embolization beads with the ability to carry and deliver locally high drug concentrations over a long period of time.¹⁷ DEB are made of poly(vinyl alcohol)

Correspondence to: M.-T. Baylatry; e-mail: minhtam.baylatry@sat.aphp.fr

TABLE I. Study Groups

Embolization Group	<i>n</i> Sheep	Irinotecan <i>c</i> ^o (mg/mL DEB)	Volume injected (mL)	Irinotecan injected dose (mg)
DEB-IRI 0	6	0	2	0
DEB-IRI 20	6	10	2	20
DEB-IRI 50	6	25	2	50
DEB-IRI 100	6	50	2	100
Bolus injection group	<i>n</i> sheep	Irinotecan <i>c</i> ^o (mg/mL solution)	Volume injected (mL)	Irinotecan injected dose (mg)
PA-IRI 50	2	20	2.5	50
PA-IRI 100	2	20	5	100

n, Number.

hydrogel modified with sulfonate groups (DC Bead®, Biocompatibles UK). The recommended anticancer drugs for DEB loading are doxorubicin and irinotecan, which can be loaded in DEB by ionic interaction mechanism.^{18,19} DEB loaded with both doxorubicin and irinotecan has received CE Mark approval in Europe but is FDA cleared in United States (as LC Bead®, for hepatic transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma) without drug loading. DC Bead with doxorubicin (DEB-DOX) have provided prolonged survival with reduced liver toxicity and systemic side effects over conventional chemoembolization.²⁰ Doxorubicin and irinotecan-loaded DEB are also promising candidates for the treatment of liver metastases and gliomas.²¹⁻²⁵

To date, there is no preclinical or clinical investigation of lung chemoembolization with DEB. Irinotecan is the drug of choice for DEB loading, as it offers some advantages over doxorubicin for lung chemoembolization. Thus, its notable antitumor activity in lung cancer^{26,27} is associated with a higher uptake in lung tumor tissue and a better tolerability than doxorubicin.^{22,25,28,29} The sheep PACE model can be chosen as a model of lung chemoembolization, for two main reasons. First, this species shares many similarities with human lung physiology and vasculature and allows investigation of devices of similar sizes to those used in humans. Second, drug-specific reason is that sheep express carboxylesterase in the lung tissue, as do humans³⁰⁻³²; this is the key enzyme for irinotecan activation into its cytotoxic metabolite SN38.³³ Both irinotecan and SN38 can be detected and quantified in sheep plasma³⁴ and lung tissue.

This pilot study compares the performance and safety of DEB loaded with irinotecan (DEB-IRI) at three different doses (20, 50, and 100 mg of irinotecan) in a sheep PACE model. The plasma pharmacokinetics (PK), lung tissue concentration and toxicity of irinotecan released from DEB-IRI have been examined. Additionally, a direct PA injection of irinotecan solution (50 and 100 mg) was performed to compare plasma PK of irinotecan after PACE and PA injection.

MATERIALS AND METHODS

Materials

DC-Bead®(Biocompatibles UK) with nominal size 300–500 µm were loaded with irinotecan solution (Campto® 20 mg/mL, Pfizer, France) 24 hours before the embolization, following the procedure according to the manufacturer's

instructions for use¹⁹ under aseptic conditions in a laminar flow hood. The DEB-IRI were prepared with three different concentrations of irinotecan: 10, 25, and 50 mg (maximum capacity of irinotecan loading) per mL hydrated bead. The irinotecan solution (20 mg/mL) was also used for a direct PA injection.

Animals, follow-up and sacrifice

Twenty-eight adult Pre-Alpes sheep (70–85 kg) were supplied by the INRA (Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France). All experiments were approved by the institutional animal care and use committee of INRA and were conducted according to European community rules for animal care (Directive EC 86/609).

During the study, the overall health and well being of each animal was monitored daily (food, water intake, and posture). Euthanasia was performed in sheep according to veterinary regulatory rules.

Study groups

Twenty-four animals were randomized for PACE into four groups (*n* = 6 sheep/group) according to injected irinotecan dose: DEB-IRI 0 (saline DEB), DEB-IRI 20, DEB-IRI 50, and DEB-IRI 100 (Table I). Three animals per group were sacrificed 4 days after the embolization and three animals 4 weeks after the embolization.

Additionally, four sheep received a direct PA injection of either 50 mg (PA-IRI 50, *n* = 2 sheep) or 100 mg (PA-IRI 100, *n* = 2 sheep) free irinotecan.

PACE procedure

Sheep were not fed for 24 hours prior to the procedure. Anesthesia was induced by intramuscular injection of 15 mg/kg of body weight of thiopental sodium. CO₂ levels and peripheral arterial oxygen saturation were monitored. An electrocardiogram was used to monitor continuously each animal during the procedure.

A right femoral vein puncture was performed and a 5-French vascular sheath was placed. Selective catheterization of the PA and superselective catheterization of the descending right PA were performed by using a 5-French Judkins Right 4 catheter (Performa, Merit Medical Systems) and a 0.035 hydrophilic wire (Radiofocus guide wire M, Terumo, Tokyo, Japan). DEB were diluted in a mixture of nonionic

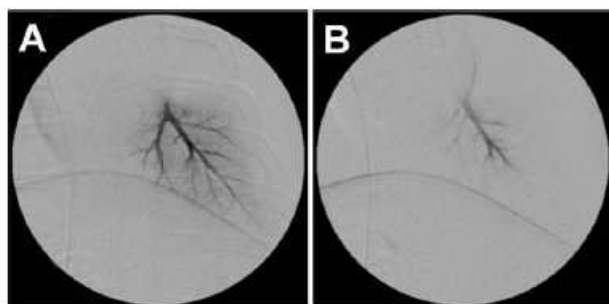


FIGURE 1. Angiographies of a sheep PA before (A) and after (B) embolization with DEB-IRI. These angiographies showed a devascularization of the embolized area.

isomolar contrast medium and (0.9%) saline solution prior to embolization as per the manufacturer's instructions. A bead sediment volume of 2 mL was injected slowly in the PA under fluoroscopic control.

The Figure 1 shows angiographies of a sheep PA before and after embolization with DEB-IRI.

Direct injection into PA

Irinotecan solution was mixed with contrast medium and saline solution, and then was injected within 1–2 min into the PA.

Plasmatic pharmacokinetics and lung tissue concentration of irinotecan

Blood sampling and preparation. Heparinized blood samples were collected from the jugular vein before PACE (T0) and after PACE at 1 mn (T1mn), 5 mn (T5mn), 10 mn (T10mn), 45 mn (T45mn), 60 mn (T60mn), 2 hours (T2H), 3 hours (T3H), 24 hours (T24H), 2 days (T2D), and at the time of sacrifice at 4 days (T4D) or 28 days (T28D). For direct PA injection of free irinotecan, blood samples were taken at T1mn, T5mn, T10mn, T30mn, T60mn, T3H, and T24H after injection. Plasma was separated from the collected blood samples by centrifugation at 3000g for 10 min and stored at -20°C until analysis.

Plasma samples were thawed and mixed with the internal standard (camptothecin). Acetonitrile was added for protein precipitation and HCl for the conversion of carboxylate to lactone forms. After centrifugation, the supernatant was injected into the liquid chromatography (LC) system.

Tissue samples and preparation. Lung tissue samples obtained at the time of sacrifice (4 days) were frozen, embedded in OCT (TissueTek®, Sakura), and stored at -80°C until analysis.

An aliquot of tissue was weighed and homogenized in ice-cold Tris-HCl 1M (pH 8.1), then centrifuged at $+4^{\circ}\text{C}$. The supernatant was spiked with camptothecin and adjusted to 1 mL with 0.01N HCl. The above solution was extracted on a conditioned Bond Elut C18 column. The eluate (1.5 mL of acidic methanol) was evaporated to dryness under a nitro-

gen stream. The residue was dissolved in 1 mL of mobile phase, centrifuged, and injected into the LC system.

A total of 27 lung samples were analyzed ($n = 3$ samples/sheep for nine sheep embolized with DEB-IRI and sacrificed at 4 days, three sheep for each irinotecan loading dose).

Liquid Chromatography-Fluorescence detection procedure. Free irinotecan and SN38 were quantified in plasma by mean of a validated liquid chromatography-fluorescence detection method.³⁴

The same quantification method was applied to lung samples. The selectivity of the method was validated in drug free samples of sheep lung tissue for irinotecan and SN38. The extraction recovery from lung tissue was superior to 95%. The linearity of the method was assessed using lung tissue calibration curves in the range of 5–3500 ng/mL and 5–100 ng/mL for irinotecan and SN38, respectively. Calibration curves were linear over the studied range. Coefficients of correlation for irinotecan and SN38 in lung tissue were superior to 0.997. The lower limit of quantification for irinotecan and SN38 in plasma and lung tissue was 5 ng/mL.

PK parameters. Plasma AUCs profiles, maximum plasma concentration (C_{max}), time of maximal plasma concentration (T_{max}), and plasma terminal half-life ($T_{1/2}$) were determined using WinNonLin® software (v 4.1).

Histopathology

Sampling. Lung samples were collected at the time of sacrifice from fresh lungs, embedded in OCT (TissueTek®, Sakura) and snap frozen. They were fixed in 10% neutral buffered formalin for at least 24 hours. Four to five levels of slicing were made. Samples were taken from each slice in region of interests. Animals were sacrificed 4 days and 4 weeks after PACE to assess histopathological changes.

Techniques and staining. Samples were dehydrated in a series of alcohols, set in xylene and embedded in paraffin. Four to five micrometers-thick sections were cut with a microtome, mounted on a microscopic slide, and stained with hematoxylin-eosin-saffron or May Grunwald Giemsa or orcein stainings.

Assessment of tissue changes. Necrosis of all embolized vessels (i.e., vessels containing embolic agent) and parenchyma was examined on each slide. The inflammatory response was assessed by the number of neutrophils layers, density of lymphocytes around embolized vessel and presence/absence of macrophages and giant cells in contact with bead occluding vessel.

Statistical analysis

PK data were compared using a Mann-Whitney test (MW) or a Kruskal-Wallis test (KW) (Statview®, v5). Nonparametric tests (MW, KW, and Chi2 comparison) were applied to

TABLE II. Mean Plasma Concentrations of Irinotecan at Each Sampling Time After PACE with DEB-IRI and Direct PA Injection of Free Irinotecan (Mean ± Standard Deviation)

Sampling time	Mean plasma concentrations of irinotecan (ng/mL)				
	DEB-IRI 20	DEB-IRI 50	DEB-IRI 100	PA-IRI 50	PA-IRI 100
T0	ND	ND	ND	ND	ND
T 1mn	330 ± 60	612 ± 93	626 ± 192	2952 ± 825	3671 ± 2133
T 5 mn	243 ± 25	595 ± 48	518 ± 75	682 ± 14	1545 ± 23
T 10 mn	164 ± 23	508 ± 38	590 ± 40	538 ± 79	1106 ± 75
T 30 mn	112 ± 14	332 ± 30	531 ± 43	407 ± 21	891 ± 8
T 45 mn	96 ± 15	281 ± 25	476 ± 49	–	–
T 60 mn	78 ± 12	241 ± 19	433 ± 52	480 ± 46	674 ± 126
T 2H	43 ± 7	155 ± 15	283 ± 33	–	–
T 3H	26 ± 4	101 ± 13	196 ± 26	197 ± 4	343 ± 43
T 24H	ND	ND	12 ± 3	ND	ND
T 2D	ND	ND	ND	–	–
T 4D	ND	ND	ND	–	–
T 28D	ND	ND	ND	–	–

ND, Not detectable.

compare histological data between dose groups or time points. Results were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

PACE procedure

Superselective catheterization and embolization of the PA was achieved and was well tolerated in all animals. The angiographies taken before and after embolization (Figure 1) showed a devascularization of the embolized area. During the procedure, end-tidal CO₂, peripheral arterial oxygen saturation, and electrocardiogram were normal in all animals and no major change of these parameters was noted.

Animal follow up

No event on overall health and well being of animals was observed during the entire observation period of 4 weeks.

Plasma PK of irinotecan

The results are presented in Tables II and III. Following PACE with DEB-IRI, irinotecan was detected in plasma within the first minutes post-embolization, regardless the dose loaded. C_{max} was reached between 2 and 10 min in all DEB-IRI groups. C_{max} and AUC_{0-∞} of irinotecan

increased significantly with dose ($p = 0.0078$, $p = 0.0008$, respectively, KW; Figure 2). A trend for dose dependent-increase was seen for T_{1/2} ($p = 0.0451$, KW).

Following a direct PA injection, C_{max} was reached within the first minutes after administration and values for both C_{max} and AUC_{0-∞} of irinotecan increased with the injected dose. T_{1/2} was not different between groups.

C_{max} and AUC_{0-∞} of irinotecan were significantly lower after PACE than after direct PA injection (by 80%, $p = 0.0036$, and by 50%, $p = 0.0393$, respectively, MW). T_{max} was slightly higher in DEB-IRI groups than in PA-IRI groups. The concentration-time curves of irinotecan after PACE with DEB-IRI versus direct PA injection during the first hour after procedure are shown in Figure 3.

Plasma PK of SN38

SN38 was not detected in any plasma sample collected up to 4 weeks after PACE with DEB-IRI or up to 24 hours after a direct PA injection of irinotecan, and thus at any dose.

Tissue quantification of irinotecan and SN38

Four days after PACE, neither irinotecan nor SN38 were detected in lung samples.

TABLE III. Pharmacokinetic Parameters of Irinotecan After PACE with DEB-IRI and After Direct PA Injection of Free Irinotecan (Mean ± Standard Deviation)

	DEB-IRI 20	DEB-IRI 50	DEB-IRI 100	KW test
C _{max} (ng/mL)	349 ± 129	663 ± 159	767 ± 264	$p = 0.0078$
T _{max} (min)	2 ± 0	2 ± 0	10 ± 2	$p = 0.2415$
T _{1/2} (min)	73 ± 8	100 ± 37	215 ± 113	$p = 0.0451$
AUC _{0-∞} (ng.h/mL)	16 156 ± 5 657	56 862 ± 14 621	134 627 ± 54 020	$p = 0.0008$
	–	PA-IRI 50	PA-IRI 100	MW test (vs. DEB-IRI 50/100)
C _{max} (ng/mL)	–	2 952 ± 583	3 686 ± 1 498	$p = 0.0036$
T _{max} (min)	–	1 ± 0	3 ± 1	$p = 0.3631$
T _{1/2} (min)	–	220 ± 1	200 ± 6	$p = 0.3320$
AUC _{0-∞} (ng.h/mL)	–	138 652 ± 3 148	221 675 ± 18 455	$p = 0.0393$

NS, Not significant.

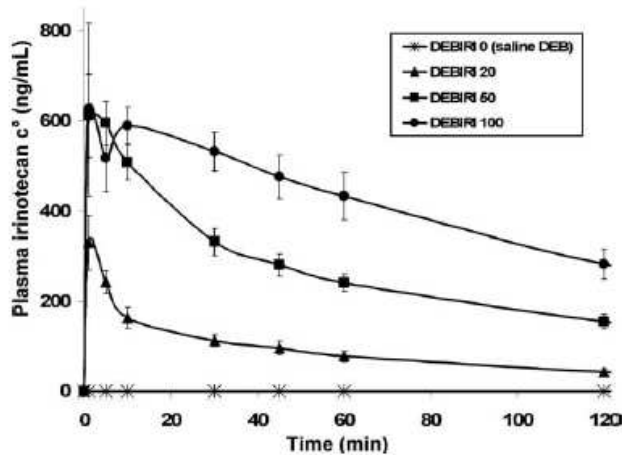


FIGURE 2. Mean plasma concentration-time curves of irinotecan from DEB-IRI during the first 2 hours after PACE. Following PACE, irinotecan was detected in plasma within the first minutes post-embolization with DEB-IRI, regardless the dose of the drug loaded. C_{max} of irinotecan was reached in the first 10 min in all DEB-IRI groups. Both C_{max} and AUC_{0-∞} increased with dose.

Histopathology

Macroscopic examination and necrosis. The results are presented in Table IV. No abnormality was noticed at gross examination of lungs in all groups. Compared to saline DEB, a significant vascular and parenchymal necrosis was observed on day 4 when PACE was performed with DEB-IRI 100 (34.7% and 36.2% of occluded vessels, respectively, $p < 0.0001$, Chi²). At 4 weeks, no necrosis was seen in any group (Figure 4).

Inflammatory response

Polynuclear neutrophils. Four days after PACE, the number of neutrophil layers around beads occluding vessels was significantly lower in DEB-IRI 20 and 50 groups versus saline DEB ($p < 0.0001$, Chi²; Table V). However, the number of neutrophil layers was significantly higher around DEB-IRI 100 than around saline DEB ($p = 0.0076$, Chi²).

Four weeks after PACE, the number of tissular neutrophils around beads was low in all groups. No significant difference was observed between saline DEB and DEB-IRI 50 ($p = 0.7615$, Chi²) or DEB-IRI 100 ($p = 0.0789$, Chi²), while a significant reduction in the density of tissular neutrophils was seen for DEB-IRI 20 when compared to saline DEB ($p = 0.0028$, Chi²).

Lymphocytes. Four days and 4 weeks after PACE, compared to saline DEB, lymphocyte density around occluded vessels was low in all groups (Table VI). No difference was observed between DEB-IRI and saline DEB.

Macrophages and Giant cells. Four days after PACE, the occurrence of macrophages around the beads was not significantly different around DEB-IRI (any dose) and saline DEB (Table VII). By comparison, macrophages were significantly more often detected after 4 weeks in all groups ($p < 0.0001$, Chi²).

Giant cells were only detected 4 weeks after PACE, and significantly more frequently around DEB-IRI than saline DEB ($p < 0.0001$ for all groups, Chi²), regardless of the dose of loaded drug.

DISCUSSION

Irinotecan release from DEB-IRI in plasma and lung tissue

This study provides evidence that the use of DEB-IRI for PACE allows a significant reduction of systemic drug concentrations when compared with a direct PA injection of an equivalent dose of irinotecan (plasmatic C_{max} was reduced by 80% and AUC_{0-∞} by 50%). This can be explained by the fact that DEB, by blocking the PA flow, reduces the washout of irinotecan from lung tissue into the systemic circulation. Furthermore, the elevated T_{max} noted with DEB-IRI 100 group indicates that irinotecan is delivered in a sustained manner from the beads.

Even though the release of irinotecan was sustained, the drug was present in significant amount in the systemic circulation within the first minutes after PACE. Such early release of large amounts of irinotecan from DEB-IRI has been previously described after liver chemoembolization using DEB-IRI in a porcine model.³⁵ We assume that both the rapid release and the initial burst of irinotecan observed in plasma are intrinsic to the DEB delivery system and do not depend on the embolized organ. Ionic interactions between irinotecan and DEB involve protonated tertiary amino group of irinotecan piperidine and DEB sulfonate group.³⁵ The positive charge of this irinotecan tertiary amino group forms weak interactions with DEB, that are easily dissociated by ionic exchange.^{35,36} The weak interactions between DEB and irinotecan probably explain the systemic release of high amounts of irinotecan observed in the first minutes after PACE. We can also not rule out the hypothesis that free irinotecan coexists with DEB-IRI in the injected dose. The irinotecan loading in DEB is inhomogeneous, which increases the likelihood of free irinotecan to be found in the DEB-IRI suspension.³⁶ Thus, the injection of

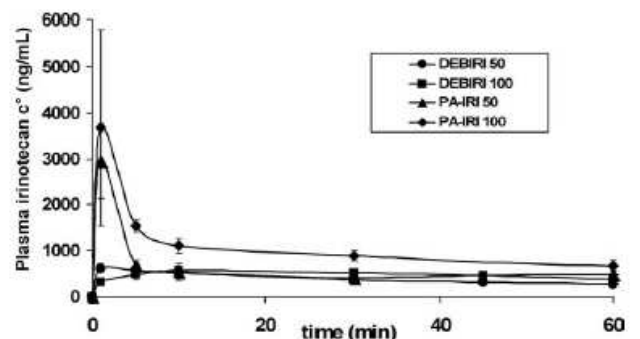


FIGURE 3. Mean plasma concentration-time curves of irinotecan after PACE with DEB-IRI or direct PA injection, during the first hour after procedure. Following a direct PA injection, C_{max} was observed within the first minutes after administration and values for both C_{max} and AUC_{0-∞} of irinotecan increased with the injected dose. C_{max} and AUC_{0-∞} of irinotecan obtained after PACE were substantially reduced when compared to a direct PA injection.

TABLE IV. Vascular and Parenchyma Necrosis 4 Days After PACE

	Saline DEB	DEB-IRI 20	DEB-IRI 50	DEB-IRI 100
Vascular necrosis	0%	0%	0%	34.7%
No vascular necrosis	100%	100%	100%	65.3%
Samples	<i>n</i> = 99	<i>n</i> = 135	<i>n</i> = 109	<i>n</i> = 127
Chi ² (vs saline DEB)	NA	NA	NA	<i>p</i> < 0.0001
Parenchyma necrosis	0%	0%	0%	36.2%
No parenchyma necrosis	100%	100%	100%	63.8%
Samples	<i>n</i> = 99	<i>n</i> = 135	<i>n</i> = 109	<i>n</i> = 127
Chi ² (vs saline DEB)	NA	NA	NA	<i>p</i> < 0.0001

NA, Not applicable.

free irinotecan during PACE may account for the early peak of irinotecan plasma levels.

Increasing the dose of loaded irinotecan from 20 or 50 mg to 100 mg decreased the rate of plasma release. When DEB-IRI 20 were compared with DEB-IRI 50, the mean plasma T_{max} of irinotecan were similar and mean plasma irinotecan concentrations were dose-dependent over time. When DEB-IRI 50 were compared with DEB-IRI 100, T_{max} was 4.5 higher when PACE was performed with DEB-IRI 100, and plasma concentrations of the drug were not dose-dependent within the first 10 min after PACE. At 24 hours after PACE, plasma irinotecan was detected only in DEB-IRI 100 group. These findings support the hypothesis that DEB-IRI 100 release irinotecan slower than DEB-IRI 20 and 50 within the first 10 min and allow a reservoir effect over 24 hours. This result is in agreement with the demonstration that the elution rate of irinotecan can be delayed when high doses of irinotecan are loaded in DEB.³⁵ In these conditions,

DEB become particularly hydrophobic, which reduces the ion-exchange and diffusion rates of both salt and drug ions. The loss of water, which is expelled from DEB during irinotecan loading, results in a denser DEB structure after irinotecan loading which significantly retards the drug elution rate.

Four days and 4 weeks after PACE, neither irinotecan nor its main metabolite SN38 can be detected in lung tissue, for all doses of irinotecan loaded in DEB. We hypothesize that irinotecan is rapidly released from DEB-IRI (as the interactions between irinotecan and the polymer constituting DEB are weak), and rapidly eliminated by a lung tissue washout (as bronchial arteries substantially enlarge and blood flow increases after PA occlusion).^{37,38}

Systemic and local safety of DEB-IRI

The occurrence of irinotecan systemic side effects remains largely unexplained and is unpredictable for most of the

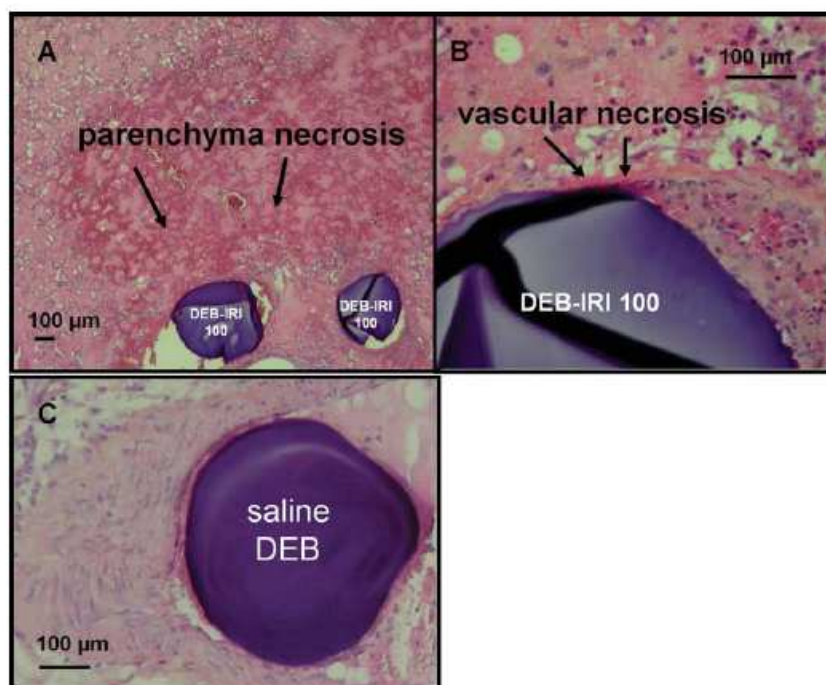


FIGURE 4. Parenchyma and vascular necrosis at 4 days after PACE with DEB-IRI 100. A: Parenchyma necrosis (arrow) around DEB-IRI 100. B: Vascular necrosis (arrow) around DEB-IRI 100. C: With saline loaded DEB, neither vascular nor parenchyma necrosis was observed at 4 days. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

TABLE V. Number of Neutrophil Layers Around Bead Occluding Vessel 4 Days and 4 Weeks After PACE

		Saline DEB	DEB-IRI 20	DEB-IRI 50	DEB-IRI 100
4 days	Low (0-3)	48.5%	74.0%	89.0%	28.3%
	Moderate (3-10)	16.2%	26.0%	7.3%	24.5%
	Many (>10)	35.3%	0%	3.7%	47.2%
	Samples	<i>n</i> = 99	<i>n</i> = 135	<i>n</i> = 109	<i>n</i> = 127
Chi ² (vs. saline DEB)		-	<i>p</i> < 0.0001	<i>p</i> < 0.0001	<i>p</i> = 0.0076
4 weeks	Low (0-3)	94.4%	100%	93.5%	98.5%
	Moderate (3-10)	5.5%	0%	6.5%	1.4%
	Many (>10)	0%	0%	0%	0%
	Samples	<i>n</i> = 90	<i>n</i> = 157	<i>n</i> = 169	<i>n</i> = 138
Chi ² (vs saline DEB)		-	<i>p</i> = 0.0028	<i>p</i> = 0.7615	<i>p</i> = 0.0789

patients.³⁹ However, there is a major influence of the route of irinotecan administration on the occurrence of side effects. In our experimental conditions, no systemic side effects were seen after embolization with DEB-IRI. Neither diarrhoea nor neutropenia-induced infection, the two major adverse effects associated with irinotecan, was observed. This finding is in good agreement with the fact that, in our experimental conditions, the metabolite responsible for these toxicities, SN38, was not detected in plasma samples. SN38 was undetectable in plasma because the intraarterial route of irinotecan administration circumvents the hepatic

first-pass during which irinotecan is converted into SN38 by liver carboxylesterases.³³ By comparison, after hepatic transarterial embolization using DEB-IRI loaded with 100 mg irinotecan, no severe systemic side effect due to SN38 has been reported in humans.^{24,40,41} In contrast, irinotecan administered by IV route (60-100 mg) in patients with lung tumors has been associated with severe and sometimes fatal diarrhoea and neutropenia driven by intestinal and hepatic first-pass effects.⁴²⁻⁴⁴

No sign of toxicity was seen in lung tissue after PACE with saline DEB, DEB-IRI 20, and 50. In contrast, local

TABLE VI. Density of Lymphocytes Around the Embolized Vessel 4 Days and 4 Weeks After PACE

		Saline DEB	DEB-IRI 20	DEB-IRI 50	DEB-IRI 100
4 days	Low (0-3)	91.9%	97.1%	89.0%	85.8%
	Moderate (3-10)	8.1%	2.9%	10.1%	12.7%
	Many (>10)	0%	0%	0.9%	1.5%
	Samples	<i>n</i> = 99	<i>n</i> = 135	<i>n</i> = 109	<i>n</i> = 127
Chi ² (vs saline DEB)		-	<i>p</i> = 0.0795	<i>p</i> = 0.5523	<i>p</i> = 0.2391
4 weeks	Low (0-3)	100%	98.7%	100%	96.4%
	Moderate (3-10)	0%	1.3%	0%	3.6%
	Many (>10)	0%	0%	0%	0%
	Samples	<i>n</i> = 90	<i>n</i> = 157	<i>n</i> = 169	<i>n</i> = 138
Chi ² (vs saline DEB)		-	<i>p</i> = 0.2823	NA	<i>p</i> = 0.0679

TABLE VII. Presence of Macrophages and Giant Cells 4 Days and 4 Weeks After PACE

		Saline DEB	DEB-IRI 20	DEB-IRI 50	DEB-IRI 100
4 days	Macrophages	65.7%	52.6%	68.8%	64.5%
	No macrophages	34.3%	47.4%	31.2%	35.5%
	Samples	<i>n</i> = 99	<i>n</i> = 135	<i>n</i> = 109	<i>n</i> = 127
	Chi ² (vs saline DEB)	-	<i>p</i> = 0.0454	<i>p</i> = 0.6285	<i>p</i> = 0.8647
4 weeks	Macrophages	96.7%	98.7%	100%	100%
	No macrophages	3.3%	1.3%	0%	0%
	Samples	<i>n</i> = 90	<i>n</i> = 157	<i>n</i> = 169	<i>n</i> = 138
	Chi ² (vs saline DEB)	-	<i>p</i> = 0.2687	<i>p</i> = 0.0170	<i>p</i> = 0.0308
4 days	Giant cells	Absent			
	Samples	<i>n</i> = 99	<i>n</i> = 135	<i>n</i> = 109	<i>n</i> = 127
4 weeks	Giant cells	20%	50.3%	50.3%	48.5%
	No giant cells	80%	49.7%	49.7%	51.5%
	Samples	<i>n</i> = 90	<i>n</i> = 157	<i>n</i> = 169	<i>n</i> = 138
	Chi ² (vs saline DEB)	-	<i>p</i> < 0.0001	<i>p</i> < 0.0001	<i>p</i> < 0.0001

necrosis of occluded vessel and surrounding parenchyma was observed 4 days after PACE with DEB-IRI loaded with the highest dose of irinotecan tested. It can be reasonably assumed that these lesions are due to the cytotoxic action of such a high dose of irinotecan, which is released from DEB over time, and diffused locally into the parenchymal tissue around the beads. However, such necrosis was transient as it was no longer detected after 4 weeks, and was circumscribed to sites of vessel occlusion since no lung tissue necrosis was noted at distance from DEB-IRI 100.

Local inflammatory response associated with DEB was moderate in all groups and was generally not different between DEB-IRI and saline DEB, at both time points. These inflammatory profiles are not related to irinotecan toxicity, as they have the overall characteristics of a classical foreign body reaction to implant, that is, the presence of neutrophilic cells in acute phase, then replaced by macrophages/giant cells within 24 hours.⁴⁵

Study limits

Our findings should be interpreted within the limits of this study. For example, irinotecan metabolism differs between sheep and humans. While only one metabolite (SN38) has been identified in sheep,^{30,46} four metabolites have been described in humans: the active SN38 and three inactive metabolites: a glucuronide derivative (SN38G) and two carbonyloxycamptothecin derivatives (APC and NPC).^{33,47} Such different metabolite ratios between the two species suggest that, for a given dose of irinotecan, the amount of SN38, and so the related toxicity should be lower in humans than in sheep. However, these species difference should not interfere with our other results. For instance, it can be reasonably assumed that the rapid release of irinotecan from DEB-IRI within the first minutes after PACE will be similarly observed in humans as irinotecan is not metabolized in such a short period.³³

The toxicity of irinotecan in humans depends on various parameters, including PK (plasma AUC and C_{max}),^{33,48} clinical determinants (age, performance status, transaminase level, etc), pharmacogenetic factors^{39,49,50} or genetic polymorphisms in enzymes involved in SN38 detoxification or irinotecan transport.³³ Notwithstanding that all these parameters in humans may be of strong influence, our findings suggest that DEB-IRI should be well tolerated after PACE in humans.

From a methodological point of view, a larger number of sheep and samples could strengthen the statistical power; but PK and histological results were particularly reproducible within each group, with no contradictory data. Additional sample time points between 3 and 24 hours after PACE could increase the precision of PK curves, but would presumably not change their aspect.

CONCLUSION

This study in a sheep model of PACE provides the evidence that DEB loaded with irinotecan at doses up to 100 mg are well tolerated compared to other routes of administration, and can carry and deliver the drug in the lung tissue.

While 20 and 50 mg loading doses of irinotecan may be too low for any therapeutic benefit, the use of DEB loaded with 100 mg irinotecan seems of interest for future PACE trials in patients, as this form may be adequate to provide a sustained release and diffusion of the drug in occluded vessels and surrounding parenchyma.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank C. Guntz and the team at CR2i for their assistance.

REFERENCES

1. Vogt-Moykopf I, Krysa S, Bulzebruck H, Schirren J. Surgery for pulmonary metastases. The Heidelberg experience. *Chest Surg Clin N Am* 1994;4:85-112.
2. Abecasis N, Cortez F, Bettencourt A, Costa CS, Orvalho F, de Almeida JM. Surgical treatment of lung metastases: prognostic factors for long-term survival. *J Surg Oncol* 1999;72:193-198.
3. Van Schil PE. Surgical treatment for pulmonary metastases. *Acta Clin Belg* 2002;57:333-339.
4. Fukuoka M, Niitani H, Suzuki A, Motomiya M, Hasegawa K, Nishiwaki Y, Kuriyama T, Ariyoshi Y, Negoro S, Masuda N. A phase II study of CPT-11, a new derivative of camptothecin, for previously untreated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1992;10:16-20.
5. Johnston MR, Minchen RF, Dawson CA. Lung perfusion with chemotherapy in patients with unresectable metastatic sarcoma to the lung or diffuse bronchioloalveolar carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:368-373.
6. Osaki T, Hanagiri T, Nakanishi R, Yoshino I, Taga S, Yasumoto K. Bronchial arterial infusion is an effective therapeutic modality for centrally located early-stage lung cancer: Results of a pilot study. *Chest* 1999;115:1424-1428.
7. Muller H, Guadagni S. Regional chemotherapy for carcinoma of the lung. *Surg Oncol Clin N Am* 2008;17:895-917, xi.
8. Vogl TJ, Lehnert T, Zangos S, Eichler K, Hammerstingl R, Korkusuz H, Lindemayr S. Transpulmonary chemoembolization (TPCE) as a treatment for unresectable lung metastases. *Eur Radiol* 2008;18:2449-2455.
9. Van Putte BP, Grootenboers M, van Boven WJ, van Oosterhout M, Pasterkamp G, Folkerts G, Schramel F. Selective pulmonary artery perfusion for the treatment of primary lung cancer: Improved drug exposure of the lung. *Lung Cancer* 2009;65:208-213.
10. Weksler B, Ng B, Lenert JT, Burt ME. Isolated single-lung perfusion with doxorubicin is pharmacokinetically superior to intravenous injection. *Ann Thorac Surg* 1993;56:209-214.
11. Hendriks JM, Van Schil PE. Isolated lung perfusion for the treatment of pulmonary metastases. *Surg Oncol* 1998;7:59-63.
12. Ratto GB, Toma S, Civalieri D, Passerone GC, Esposito M, Zaccaro D, Canepa M, Romano P, Palumbo R, De Cian F, Scarano F, Vannozzi M, Spessa E, Fantino G. Isolated lung perfusion with platinum in the treatment of pulmonary metastases from soft tissue sarcomas. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:614-622.
13. Van Putte BP, Hendriks JM, Romijn S, Van Schil PE. Isolated lung perfusion for the treatment of pulmonary metastases current mini-review of work in progress. *Surg Oncol* 2003;12:187-193.
14. Ekholm S, Albrechtsson U, Tylen U. Bronchial artery infusion of mitomycin C in carcinoma of the lung. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1983;6:86-96.
15. Uchiyama N, Kobayashi H, Nakajo M, Shinohara S. Treatment of lung cancer with bronchial artery infusion of cisplatin and intravenous sodium thiosulfate rescue. *Acta Oncol* 1988;27:57-61.
16. Vogl TJ, Wetter A, Lindemayr S, Zangos S. Treatment of unresectable lung metastases with transpulmonary chemoembolization: Preliminary experience. *Radiology* 2005;234:917-922.
17. Namur J, Wassef M, Millot JM, Lewis AL, Manfait M, Laurent A. Drug-eluting beads for liver embolization: Concentration of doxorubicin in tissue and in beads in a pig model. *J Vasc Interv Radiol* 2010;21:259-267.
18. Information Brochure: Greater Tolerability, Increased efficacy, More Safely for more patients (April 2009). Available at

- www.biocompatiblesoncology.com/pages/dc-bead-brochure. Accessed on 2010.
19. DC Bead™ with irinotecan, CE approved for loading with irinotecan, offering the benefits of DC Bead to more patients (April 2009). Available at: www.biocompatiblesoncology.com/pages/dc-bead-brochure. Accessed on 2010
 20. Lammer J, Malagari K, Vogl T, Pilleul F, Denys A, Watkinson A, Pitton M, Sergent G, Pfammatter T, Terraz S, Benhamou Y, Avajon Y, Gruenberger T, Pomoni M, Langenberger H, Schuchmann M, Dumortier J, Mueller C, Chevallier P, Lencioni R; PRECISION V investigators. Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: Results of the PRECISION V study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2010;33:41–52.
 21. Fiorentini G, Aliberti C, Turrisi G, Del Conte A, Rossi S, Benea G, Giovanis P. Intraarterial hepatic chemoembolization of liver metastases from colorectal cancer adopting irinotecan-eluting beads: Results of a phase II clinical study. *In Vivo* 2007;21:1085–1091.
 22. Eyo E, Boleij A, Taylor RR, Lewis AL, Berger MR. Chemoembolization of rat colorectal liver metastases with drug eluting beads loaded with irinotecan or doxorubicin. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25:273–282.
 23. Fiorentini G, Aliberti C, Del Conte A, Tilli M, Rossi S, Ballardini P, Turrisi G, Benea G. Intra-arterial hepatic chemoembolization (TACE) of liver metastases from ocular melanoma with slow-release irinotecan-eluting beads. Early results of a phase II clinical study. *In Vivo* 2009;23:131–137.
 24. Martin RC, Robbins K, Tomalty D, O'Hara R, Bosnjakovic P, Padr R, Rocak M, Slauf F, Scupchenko A, Tatum C. Transarterial chemoembolisation (TACE) using irinotecan-loaded beads for the treatment of unresectable metastases to the liver in patients with colorectal cancer: an interim report. *World J Surg Oncol* 2009;7:80.
 25. Baltes S, Freund I, Lewis AL, Nolte I, Brinker T. Doxorubicin and irinotecan drug-eluting beads for treatment of glioma: A pilot study in a rat model. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21:1393–1402.
 26. Masuda N, Fukuoka M, Kusunoki Y, Matsui K, Takifuji N, Kudoh S, Negoro S, Nishioka M, Nakagawa K, Takada M. CPT-11: A new derivative of camptothecin for the treatment of refractory or relapsed small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1992;10:1225–1229.
 27. Sandler A. Irinotecan therapy for small-cell lung cancer. *Oncology (Williston Park)* 2002;16:419–425, 428, 433; discussion 433–434, 437–438.
 28. Murdter TE, Sperker B, Kivisto KT, McClellan M, Fritz P, Friedel G, Linder A, Bosslet K, Toomes H, Dierkesmann R, Kroemer HK. Enhanced uptake of doxorubicin into bronchial carcinoma: beta-glucuronidase mediates release of doxorubicin from a glucuronide pro-drug (HMR 1826) at the tumor site. *Cancer Res* 1997;57:2440–2445.
 29. Biancosino C, Albert M, Linder A. Acute toxicity of irinotecan in the ex-vivo isolated perfused human lung model—high-dose therapy during isolated perfusion without acute toxic lung edema. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2007;6:583–587.
 30. Koizumi T, Kubo K, Hanaoka M, Miyahara T, Kaneki T, Yamamoto H, Ge RL, Fujimoto K, Kobayashi T, Sekiguchi M. Pharmacokinetic characteristics of the novel anticancer agent CPT-11 and its active metabolite in plasma and lung lymph fluid following intravenous administration to sheep. *Arzneimittelforschung* 1998;48:1097–1100.
 31. Van Ark-Otte J, Kedde MA, van der Vijgh WJ, Dingemans AM, Jansen WJ, Pinedo HM, Boven E, Giaccone G. Determinants of CPT-11 and SN-38 activities in human lung cancer cells. *Br J Cancer* 1998;77:2171–2176.
 32. Ohtsuka K, Inoue S, Kameyama M, Kanetoshi A, Fujimoto T, Takaoka K, Araya Y, Shida A. Intracellular conversion of irinotecan to its active form, SN-38, by native carboxylesterase in human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2003;41:187–198.
 33. Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 2001;7:2182–2194.
 34. Baylary MT, Joly AC, Pelage JP, Bengrine-Lefevre L, Prugnaud JL, Laurent A, Fernandez C. Simple liquid chromatography method for the quantification of irinotecan and SN38 in sheep plasma: Application to in vivo pharmacokinetics after pulmonary artery chemoembolization using drug eluting beads. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878:738–742.
 35. Taylor RR, Tang Y, Gonzalez MV, Stratford PW, Lewis AL. Irinotecan drug eluting beads for use in chemoembolization: In vitro and in vivo evaluation of drug release properties. *Eur J Pharm Sci* 2007;30:7–14.
 36. Jordan O, Denys A, De Baere T, Boulens N, Doelker E. Comparative study of chemoembolization loadable beads: In vitro drug release and physical properties of DC bead and hepasphere loaded with doxorubicin and irinotecan. *J Vasc Interv Radiol* 2010;21:1084–1090.
 37. Charan NB, Carvalho P. Angiogenesis in bronchial circulatory system after unilateral pulmonary artery obstruction. *J Appl Physiol* 1997;82:284–291.
 38. Fadel E, Wijtenburg E, Michel R, Mazoit JX, Bernatchez R, Decante B, Sage E, Mazmanian M, Herve P. Regression of the systemic vasculature to the lung after removal of pulmonary artery obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:345–349.
 39. Kwekel D, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Clinical and pharmacogenetic factors associated with irinotecan toxicity. *Cancer Treat Rev* 2008;34:656–669.
 40. Martin RC, Joshi J, Robbins K, Tomalty D, O'Hara R, Tatum C. Transarterial chemoembolization of metastatic colorectal carcinoma with drug-eluting beads. Irinotecan (DEBIRI): Multi-institutional registry. *J Oncol* 2009;2009:539795.
 41. Martin RC, Howard J, Tomalty D, Robbins K, Padr R, Bosnjakovic PM, Tatum C. Toxicity of irinotecan-eluting beads in the treatment of hepatic malignancies: Results of a multi-institutional registry. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2010;33:960–966.
 42. Naka N, Kawahara M, Okishio K, Hosoe S, Ogawara M, Atagi S, Takemoto Y, Ueno K, Kawaguchi T, Tsuchiyama T, Furuse K. Phase II study of weekly irinotecan and carboplatin for refractory or relapsed small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 37:319–323.
 43. Fukuda M, Oka M, Soda H, Kinoshita A, Fukuda M, Nagashima S, Kuba M, Takatani H, Tsurutani J, Nakamura Y, Kasai T, Inoue Y, Soejima Y, Kohno S; Nagasaki Thoracic Oncology Group. Phase II study of irinotecan combined with carboplatin in previously untreated non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54:573–577.
 44. Kim YS, Park SH, Kyung SY, Sym SJ, Lee SP, Park JW, Jung SH, Park J, Cho EK, Lee JH, Shin DB. Irinotecan plus carboplatin in patients with extensive-disease small-cell lung cancer. *Med Oncol* 2011;28:342–350.
 45. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008;20:86–100.
 46. Li B, Sedlacek M, Manoharan I, Boopathy R, Duysen EG, Masson P, Lockridge O. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem Pharmacol* 2005;70:1673–1684.
 47. Smith NF, Figg WD, Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: An update. *Toxicol In Vitro* 2006; 20:163–175.
 48. Kudoh S, Fukuoka M, Masuda N, Yoshikawa A, Kusunoki Y, Matsui K, Negoro S, Takifuji N, Nakagawa K, Hirashima T. Relationship between the pharmacokinetics of irinotecan and diarrhea during combination chemotherapy with cisplatin. *Jpn J Cancer Res* 1995;86:406–413.
 49. Rouits E, Charasson V, Petain A, Boisdron-Celle M, Delord JP, Fonck M, Laurand A, Poirier AL, Morel A, Chatelut E, Robert J, Gamelin E. Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2008;99:1239–1245.
 50. Han JY, Lim HS, Park YH, Lee SY, Lee JS. Integrated pharmacogenetic prediction of irinotecan pharmacokinetics and toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009;63:115–120.

1.3.3 Chimioembolisation des artères pulmonaire et bronchique

Article n° 3 (en cours de rédaction): **Can additional embolization of bronchial artery enhance the performance of pulmonary artery chemoembolization with irinotecan eluting beads?**

Baylatry MT, Pelage JP, Wassef M, Ghegediban H, Joly AC, Lewis A, Lacombe P, Fernandez C, Laurent A.

Problématique

La chimioembolisation de l'artère pulmonaire par microsphères chargées en irinotécan dans un modèle pulmonaire sain de brebis permet une réduction importante des concentrations systémiques en irinotécan, comparée à une injection IA directe, mais ne permet pas une imprégnation suffisante du tissu pulmonaire par l'irinotécan. Quatre jours après la chimioembolisation pulmonaire, ni l'irinotécan, ni le SN38 n'ont été détectés dans le tissu pulmonaire. L'hypothèse qui nous semble la plus probable pour expliquer ce résultat est l'élimination rapide de l'irinotécan au niveau pulmonaire, due à une vasodilatation réactionnelle des artères bronchiques après occlusion de l'artère pulmonaire. L'embolisation des artères bronchiques est une procédure bien tolérée et utilisée depuis plusieurs années dans le traitement des hémoptysies massives. Appliquée en complément d'une chimioembolisation pulmonaire, elle pourrait permettre une meilleure imprégnation du tissu pulmonaire par l'irinotécan.

Objectif

Ce travail avait un double objectif :

- évaluer la faisabilité et la tolérance d'une chimioembolisation de l'artère pulmonaire par microsphères chargées en irinotécan combinée à une embolisation de l'artère bronchique par microsphères chargées, ou non, en irinotécan, dans un modèle pulmonaire sain de brebis
- évaluer sur ce même modèle, l'impact de l'embolisation additionnelle de l'artère bronchique, comparée à une chimioembolisation limitée à l'artère pulmonaire seule, sur la pharmacocinétique plasmatique et les concentrations tissulaires en irinotécan.

Résumé de l'étude

La chimioembolisation de l'artère pulmonaire a été réalisée avec des microsphères de taille 300-500 μm , chargées en irinotécan à la dose de 100 mg (concentration en irinotécan = 50 mg/mL de microsphères, injection de 2 mL de microsphères). L'embolisation de l'artère bronchique a été réalisée 10 minutes après la chimioembolisation de l'artère pulmonaire, avec des microsphères de taille 100-300 μm soit non chargées, soit chargées en irinotécan à la dose de 100 mg. Douze brebis ont été randomisées en 4 groupes (n=3/groupe) : embolisation de l'artère pulmonaire avec des microsphères non chargées (EAP0) ou chargées en irinotécan (EAP100), chimioembolisation de l'artère pulmonaire combinée à une embolisation de l'artère bronchique avec des microsphères non chargées (EAP100+EAB0) ou chargées en irinotécan (EAP100+EAB100).

L'irinotécan a été quantifié dans le plasma à différents temps après la chimioembolisation. La quantification tissulaire et l'examen anatomopathologique des poumons ont été réalisés sur des échantillons prélevés 4 jours après la chimioembolisation lors du sacrifice de l'animal.

La chimioembolisation pulmonaire combinée à l'embolisation bronchique par des microsphères chargées ou non a été bien tolérée. Le profil pharmacocinétique de l'irinotécan n'était pas différent après une EAP100 ou une EAP100+EAB0. La C_{max} et l'AUC plasmatiques de l'irinotécan étaient plus élevées après une EAP100+EAB100 où la dose injectée d'irinotécan était doublée. Au niveau tissulaire, l'irinotécan n'a été détecté dans aucun des échantillons prélevés chez les brebis ayant reçu une EAP100. Chez les brebis ayant reçu une EAP100+EAB0 ou une EAP100+EAB100, l'irinotécan a été détecté dans tous les échantillons tissulaires à des concentrations variables, le SN38 dans les échantillons où la concentration en irinotécan était élevée. La concentration moyenne en irinotécan dans le tissu était plus élevée dans le groupe ayant reçu une EAP100+EAB0 que dans le groupe ayant reçu une EAP100+EAB100. Comparée à l'EAP100 seule, l'addition d'une EAB0 ou d'une EAB100 n'a pas induit de nécrose supplémentaire autour de l'artère pulmonaire. L'EAB0 n'a pas provoqué de nécrose vasculaire de l'artère bronchique contrairement à l'EAB100.

L'embolisation de l'artère bronchique en complément d'une chimioembolisation de l'artère pulmonaire par microsphères chargées en irinotécan a permis une imprégnation du tissu pulmonaire par l'irinotécan sur au moins 4 jours. L'utilisation de microsphères chargées en irinotécan pour l'embolisation additionnelle de l'artère bronchique n'a pas augmenté la concentration tissulaire en irinotécan et a induit une nécrose vasculaire de l'artère bronchique,

comparée à une embolisation additionnelle de l'artère bronchique avec des microsphères non chargées.

Article n° 3 (en cours de rédaction)**Can additional embolization of bronchial artery enhance the performance of pulmonary artery chemoembolization with irinotecan eluting beads?****Abstract**

Purpose: To study performance and tolerance of an additional bronchial artery embolization (BAE) after a pulmonary artery embolization (PAE) using drug eluting beads (DEB) loaded with irinotecan (DEB-IRI) in a sheep model.

Materials and Methods: Twelve sheep were randomized into four embolization groups (n=3 sheep/group): PAE with bland DEB (PAE-0) or DEB-IRI (PAE-50), PAE-50+BAE with bland DEB (PAE-50+BAE-0) or DEB-IRI (PAE-50+BAE-50). 2 sheep received a direct PA injection of free irinotecan. Irinotecan was quantified by liquid chromatography-fluorescence detection in plasma during 4 days and in tissue at day 4. Pathological examination of lungs was performed at day 4.

Results: PAE-50+BAE was technically successful and well tolerated in all animals. Compared to a direct PA injection, the use of DEB-IRI for PAE or PAE+BAE significantly reduced plasmatic Cmax (p=0.0243, KW). Irinotecan was not detected in lung tissue in PAE-50 group but was present in PAE+BAE groups (p=0.0002, KW). Concentrations of drug in lung tissue were higher in PAE-50+BAE-0 group than in PAE-50+BAE-50 group (p=0.0305, MW). When observed, necrosis was generally circumscribed to sites of vessel occlusion. An additional BAE-0 did not provoke more necrosis in PA or BA than after a single PAE-50. Additional BAE-50 didn't induce more necrosis in PA but induced more damage in BA.

Conclusion: An additional BAE to PAE allows the impregnation of lung with irinotecan over 4 days and decreases irinotecan washout in lung tissue. PAE+BAE-50 resulted in a significant toxicity for BA without increasing irinotecan lung concentration when compared to a double embolization PAE+BAE-0. From our findings, a double embolization PAE+BAE-0 may be recommended to increase the performances of lung chemoembolization with DEB-IRI.

1. Introduction

Local chemotherapy for the treatment of lung cancers is better tolerated than systemic chemotherapy and allows increasing the drug concentration delivered in tissue compared to the intravenous route (Lammer 2010; van Putte 2009; Muller 2008; Hendriks 1998; Weksler 1993). Among available techniques, such as isolated lung perfusion (Johnston 1995), pulmonary or bronchial arterial infusion (van Putte 2009; Osaki 1999) and pulmonary artery chemoembolization (PACE)(Vogl 2008), the latter certainly is the most promising as it is well-tolerated, minimally invasive and allows a significant reduction of systemic drug concentrations compared to a direct pulmonary artery (PA) injection of free drug (Baylatry 2010; Baylatry 2011; Lindemayr 2007).

PACE can be performed with chemotherapeutic agents emulsified in ethiodized oil, associated with vessel occlusion with an embolic material (Vogl 2005), but its efficacy is limited by the low uptake of drug-ethiodized oil mixture in lung tumor (Vogl 2008). As an alternative, calibrated drug eluting beads (DEB) have been proposed to carry and deliver locally high drug concentrations (Namur 2010). Irinotecan-loaded DEB (DEB-IRI) have been previously performed in a sheep model of lung embolization (Baylatry 2011). PACE with DEB-IRI was well tolerated and irinotecan diffused locally into the parenchyma surrounding the beads. However, no irinotecan was detected in lung tissue as early as four days after PACE (Baylatry 2011), which was presumably related to the rapid elimination of the drug by a lung tissue washout. The latter phenomenon, classically observed after pulmonary artery occlusion, is due to a strong enlargement of bronchial arteries with a blood flow that can be increased up to 5-fold the normal level (Charan 1997; Cockett 1951; Fadel 2006). As the reduction of the lung washout should facilitate lengthening the contact time of a drug delivered in tissue after chemoembolization, a reasonable option could be the embolization of bronchial arteries (BAE) (Kalva 2009; Swanson 2002; Wang 2009; Yu-Tang Goh 2002).

Up to date, no experimental investigation of a “double” embolization of both bronchial and pulmonary arteries has ever been performed. In the present study, we have examined in a sheep model 1) the feasibility and safety of performing a double embolization (BAE after PAE using DEB-IRI), and 2) whether, compared to a single embolization (PAE with DEB-IRI), a double embolization would modify the lung washout, and tissular concentration and plasma pharmacokinetics (PK) of irinotecan.

2. Material and Method

2.1. Materials

DC-Bead® (Biocompatibles UK Ltd) size was 300-500 µm for PAE and 100-300 µm for BAE. The DEB size was chosen with respect to the size of pulmonary and bronchial distal arteries in sheep, and taking into account that an occlusion of distal vessels is needed for an accurate drug impregnation in tissue. DEB loading was performed with irinotecan solution (Campto® 20mg/mL, Pfizer, France) 24 hours prior to the embolization, according to the manufacturer's instructions (Biocompatibles site), under aseptic conditions in a laminar flow hood. The DEB were loaded with irinotecan at 50 mg per mL hydrated bead, i.e. at the highest dose of the drug to be safely loaded in DEB (Baylatry 2011). The irinotecan solution (20mg/mL) was also used for a direct PA injection.

2.2. Animals, follow-up and sacrifice

Adult Pre-Alpes sheep (70-90 kg) were supplied by the INRA (Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France). All experiments were approved by the institutional animal care and use committee of INRA and were conducted according to European community rules for animal care (Directive EC 86/609).

During the study, the overall health and well being of each animal was monitored daily (food, water intake, posture). Four days after embolization, animals were sacrificed according to veterinary regulatory rules.

2.3. Study groups

Twelve animals were randomized in four embolization groups (n=3 sheep per group) as follows:

- PAE-0 group: PAE with bland DEB (saline DEB).
- PAE-50 group: PAE with DEB-IRI.
- PAE-50 + BAE-0 group: PAE with DEB-IRI with an additional BAE with bland DEB.
- PAE-50 + BAE-50 group: PAE with DEB-IRI with an additional BAE with DEB-IRI.

A volume of 2mL bead sediment was injected in the pulmonary artery (PA) and in the bronchial artery (BA). The injected doses of irinotecan were 100 mg for PAE-50 and PAE-50+BAE-0 and 200 mg for the double embolization with DEB-IRI.

Two additional sheep received a direct PA injection of 100 mg free irinotecan.

2.4. Embolization procedure

Sheep were not fed for 24 hours prior to the procedure. Anaesthesia was induced by intramuscular injection of 15mg/kg of body weight of thiopental sodium. CO₂ levels and peripheral arterial oxygen saturation were monitored. An electrocardiogram was used to monitor continuously each animal during the procedure.

2.4.1. PAE (Figure 1)

A right femoral vein puncture was performed and a 5-French vascular sheath was placed. Selective catheterization of the PA and superselective catheterisation of the descending right PA were performed by using a 5-French Judkins Right 4 catheter (Performa, Merit Medical Systems) and a 0.035 hydrophilic wire (Radiofocus guide wire M, Terumo, Tokyo, Japan). DEB were diluted in a mixture of non-ionic isomolar contrast medium and (0.9%) saline solution prior to embolization, following manufacturer's instructions (Biocompatibles site). A bead sediment volume of 2 mL was injected slowly in the PA under fluoroscopic control.

2.4.2. BAE (Figure 2)

BAE was performed 10 minutes after PAE, i.e. at a time when a reactive enlargement of bronchial arteries was observed under angiography. BAE was performed using 5-French catheter placed at the periphery of the bronchial arteries. A microcatheter was placed within the bronchial circulation to achieve a superselective catheterization under fluoroscopic guidance. The bronchial arteries were embolized with 2 mL of DEB.

2.5. Direct injection into pulmonary artery

Irinotecan solution was mixed with contrast medium and saline solution, then injected within 1-2 minutes into the PA.

2.6. Plasmatic pharmacokinetics and lung tissue concentration of irinotecan

2.6.1. Blood samples

Heparinized blood samples were collected from the jugular vein before PAE (T0) and after PAE at 1 min (T1min), 5 min (T5min), 10 min (T10mn), 45 min (T45min), 60 min (T60min), 2 hours (T2H), 3 hours (T3H), 24 hours (T24H) and at the time of sacrifice at 4 days (T4D).

For the double embolization (PAE+BAE), sampling was performed at 20 min (T20min) and 30 min (T30min) after PAE. Those two time points correspond to sampling times at 10 min and 20 min after the additional BAE. Others blood samples were collected between 3 hours and 24 hours after PAE:

- T4H, T5H, T6H for PAE-50 + BAE-0 group
- T7H, T8H for PAE-50 + BAE-50 group.

For direct PA injection of free irinotecan, blood samples were taken at T1min, T5min, T10min, T30min, T60min, T3H and T24H after injection.

Plasma was separated from blood samples by centrifugation (at 3000g for 10 min), then stored at -20°C until analysis. Plasma samples were prepared for analysis as previously described (Baylatry 2010).

2.6.2. Tissue samples

At the time of sacrifice (4 days), lung tissue samples were taken in embolized areas, frozen, embedded in OCT (TissueTek[®], Sakura) and stored at - 80°C until analysis. Lung tissue samples were prepared for analysis as previously described (Baylatry 2011)

A total of 27 lung samples were analyzed (corresponding to 3 samples per sheep embolized with DEB-IRI).

2.6.3. Liquid chromatography-fluorescence detection procedure

Free irinotecan and SN38 were quantified in plasma and lung tissue by mean of a validated liquid chromatography-fluorescence detection (LC-FD) method (Baylatry 2010). The lower limit of quantification for irinotecan and SN38 in plasma and lung tissue was 5ng/mL.

2.6.4. PK parameters

Plasma AUCs profiles, maximum plasma concentration (C_{max}), time of maximal plasma concentration (T_{max}) and plasma terminal half-life (T_{1/2}) were determined using WinNonLin[®] software (V 4.1).

2.7. Histopathology

2.7.1. Sampling

Lung samples were collected at the time of sacrifice from fresh lungs, embedded in OCT ((TissueTek[®], Sakura) and snap frozen. They were fixed in 10% neutral buffered formalin for at least 24 hours. Four to five levels of slicing were made. Samples were taken from each slice in region of interests.

2.7.2. Techniques and staining

Samples were dehydrated in a series of alcohols, set in xylene and embedded in paraffin. Four to five micrometers-thick sections were cut with a microtome, mounted on a microscopic slide and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES), or May Grunwald Giemsa or orcein stainings.

2.7.3. Assessment of tissue changes

Necrosis of embolized vessels and surrounding parenchyma was examined on each slide.

2.8. Statistical analysis

PK data were compared using a Mann-Whitney test (MW) or a Kruskal-Wallis test (KW) (Statview[®], v5). Non-parametric tests (MW, KW, Chi2 comparison) were applied to compare histological data between dose groups or time points. Results were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Embolization procedure

Superselektive catheterization and embolization of PA alone or PA and BA were achieved in all animals. No adverse effect was noted at the time of embolization.

3.2. Animal follow-up

No event on overall health and well being of animals was observed during the entire observation period of 4 days.

3.3. Plasma PK of irinotecan (Figure 3 and Table 1)

3.3.1. Embolization with DEB-IRI versus direct PA injection of free irinotecan

In all groups, irinotecan was measured in systemic circulation within minutes after the procedure, up to 24 hours. The mean plasmatic C_{max} of irinotecan observed after direct PA injection (3686 ± 2118 ng/ml) was significantly higher than mean plasmatic C_{max} in DEB-IRI groups (PAE-50: 609 ± 74 ng/mL; PAE-50+BAE-0: 1072 ± 223 ng/mL; PAE-50+BAE-50: 1528 ± 155 ng/mL) ($p = 0.0243$, KW). Mean plasmatic AUC_{0-∞} of irinotecan was not different between direct PA injection (221675 ± 26100 ng.min/mL) and PAE-50+BAE-50 (274692 ± 32284 ng.min/mL) groups ($p = 0.2482$, MW). Plasma elimination half life (T_{1/2}) was not different between groups ($p = 0.4255$, KW) (Table 1).

3.3.2. DEB-IRI embolization groups (PAE-50, PAE-50+BAE-0, PAE-50+BAE-50)

The mean plasmatic C_{max} and AUC of irinotecan were not statistically different in embolization groups ($p=0.0582$ and $p=0.0608$, respectively, KW), although mean C_{max} and AUC values in PAE-50+BAE-50 group were higher than ones in other embolization groups (Figure 3 and Table 1). Plasma irinotecan C_{max} was reached 1 min after PAE in PAE-50 and PAE-50+BAE-0 groups and at 20 min after BAE in PAE-50+BAE-50 group. T_{1/2} was not different between groups ($p=0.6703$, KW). No significant differences in mean C_{max} and AUC were observed between PAE-50 and PAE-50+BAE-0 groups ($p=0.1266$, $p=0.5127$ respectively, MW).

3.4. Plasma PK of SN38

SN38 was not detected in plasma sample, either collected up to 4 days after embolization with DEB-IRI, or up to 24 hours after a direct PA injection of irinotecan.

3.5. Quantification of irinotecan and SN38 in lung tissue (Figure 4)

In lung tissue, at 4 days, irinotecan was not detected in any of the samples of PAE-50 group. On the other hand, irinotecan was detected in all samples after a double embolization (PAE-50+BAE-0 or PAE-50+BAE-50). The concentrations of irinotecan in lung tissue were homogeneous for a given animal but variable across different animals.. The mean irinotecan concentration in PAE-50+BAE-0 group (1122 ± 237 ng/mL of lung homogenate) was significantly higher than the mean concentration measured in animals of the PAE-50+BAE-50 group (16 ± 1 ng/mL) ($p=0.0305$, MW).

SN38 was detected in one out of the three animals of the PAE-50+BAE-0 group (mean concentration= 35 ± 21 ng/mL of lung homogenate). In this animal, high concentrations of irinotecan were measured in lung samples (mean concentration= 3286 ± 2769 ng/mL of lung homogenate).

3.6. Histopathology (Tables 2 and 3)

No abnormality was noticed at gross examination of lungs in PAE-50 group. In PAE-50+BAE-0 and PAE-50+BAE-50 groups, embolized lungs showed small areas of acute infarction.

Four days after the simple and double embolization, vessel and parenchyma necrosis was significantly more frequent in PA when occluded with DEB-IRI than when occluded with bland DEB ($p < 0.0001$) (Table 2). Percentages of vessel and parenchyma necrosis of occluded PA were in the same range (around 30%) in DEB-IRI embolization groups (simple or double embolization).

Compared to PAE-50+BAE-0, additional BAE with DEB-IRI did not provoke more damage of PA vessel wall and surrounding parenchyma but induced significantly more vessel necrosis of BA ($p < 0.0001$, Chi2) (Table 3). A low necrosis of the parenchyma around BA was noted for both PAE-50+BAE-0 and PAE-50+BAE-50 (Table 3).

4. Discussion

The present study provides evidence that a double embolization of bronchial and pulmonary sheep arteries with DEB-IRI is a feasible procedure, with no systemic side effects, diarrhoea or neutropenia-induced infection. The absence of the two latter adverse effects that are typically associated with irinotecan likely relate to the fact that no metabolite SN38 was detected in plasma, presumably because the intra-arterial route of irinotecan administration circumvents the drug hepatic first-pass during which irinotecan is mainly converted into SN38 by liver carboxylesterases (Mathijssen 2001).

4.1. Irinotecan in lung tissue

In contrast to a single embolization, the combination of PAE with DEB-IRI with a BAE with unloaded or loaded DEB lead to significantly increased irinotecan concentration that can be detected in lung tissue up to 4 days after the double embolization. This finding demonstrates the interest of such a dual procedure for improving the impregnation of tissue with the drug after lung chemoembolization with DEB-IRI.

Clearly, variable irinotecan concentrations were measured in lung tissue across animals. This finding probably relates to the heterogeneity of DEB-IRI distribution in our samples. In fact, the DEB-IRI distribution in lung tissue after a double embolization is particularly difficult to control for at least three reasons: 1) beads are not visible under angiography, 2) different calibres ranges of DEB have to be used for pulmonary and bronchial arteries and 3) dilatation of bronchial arteries subsequent to PAE triggers a secondary displacement of beads in vessels.

Very elevated irinotecan concentrations were measured in lung tissue after a double embolization. Values are in the range of active irinotecan concentrations reported in literature for different human lung cancer cell lines after a drug exposure time of 4 days (IC50: 205-1761 ng/mL) (van Ark-Otte 1998). For a same injected dose of irinotecan (100 mg), our higher values are close to irinotecan concentration found ex-vivo in human lung parenchyma (Biancosino 2007). Surprisingly, the higher irinotecan concentrations were measured after the double embolization using BAE bland DEB. Though this result needs to be cautiously interpreted due to the limited sample size, it suggests that the use of DEB-IRI to perform BAE does not enhance the amount of the drug present in lung tissue at 4 days. We assume that the elevated concentration of the drug over time is mainly the consequence of the mechanical occlusion of BA and the subsequent reduction of lung washout.

The necrosis observed at 4 days after embolization was circumscribed to sites of vessel occlusion since no lung tissue necrosis was noted at distance from DEB-IRI. Additional BAE-0 didn't induce more necrosis in PA or BA compared to PAE-50 alone. Compared to PAE-50+BAE-0, additional BAE-50 did not induce more necrosis in PA but induced more damage in BA, which were limited to vessel wall (nearly the half of occluded vessel had a vascular wall necrosis). Almost no parenchyma necrosis was observed around occluded BA. These findings suggest that the diffusion of irinotecan from DEB-IRI occluding BA remained confined to a small area and did not provoke an extended necrosis. It is possible that the gradual dilatation of bronchial arteries after PAE favours the displacement of beads over time so that the local release of irinotecan is not sufficient to induce necrosis of the parenchyma.

4.2. Plasmatic profile of irinotecan

As expected, by using DEB-IRI for lung embolization (simple PAE or combined with BAE) a significant reduction of irinotecan concentration is noted in plasma when compared with a direct PA injection of the drug.

Interestingly, the plasmatic profile (Cmax and AUC) of irinotecan was not different when a double embolization (PAE-50+BAE-0) or a simple PAE-50 was performed. Thus, the reduction of lung washout by the additional BAE does increase the levels of irinotecan in tissue but not in plasma.

As already described in a previous study (Baylatry 2011), irinotecan was detected in significant amounts in the systemic circulation within the first minutes after PAE with DEB-IRI. Further, we observed a second plasmatic peak within the first minutes after BAE with DEB-IRI. It is well-known that the interactions between irinotecan and the polymer constituting DEB are weak (Taylor 2007) and the irinotecan loading in DEB is often inhomogenous (Jordan 2010) two features that increased the likelihood of free irinotecan to be found in the DEB-IRI suspension. Thus, it can reasonably be hypothesized that free irinotecan coexists with DEB-IRI during the injection into the artery, which may explain the two early plasmatic peaks in our experimental conditions.

4.3. Study limits and perspectives

Our findings should be interpreted within certain limits of our experimental conditions, experiments were performed over a period of 4 days and therefore do not preclude of findings obtained over longer period of time. In addition, findings are obtained in a rather limited number of animals and samples, so their replication on a larger scale could strengthen the statistical power of certain data.

From a methodological point of view, several modifications could be envisaged. For example, it could be useful to improve the sampling technique and therefore decrease statistical variability by using beads visible under fluoroscopic guidance. Tissue quantification of irinotecan could be performed by spectroscopy, which had the advantage to avoid the destruction of the tissue and to allow to localize the beads. However, the limit of quantification for irinotecan by this method remains too high (5mg/mL) (Namur 2009).

Finally, the DEB size chosen for BAE (100-300 μm) in the present study is the smallest DEB size available but it may be too large for embolization of bronchial distal arteries in “normal conditions”. Future studies could usefully measure over time the dilatation of bronchial arteries after PAE, so that, in a course of a double embolization one could adapt the calibre of beads to be injected for BAE at a given time point. In such conditions, one should theoretically perform distal embolization of beads, with a limited secondary displacement, and an optimized reduction of lung washout.

5. Conclusion

To our knowledge, this experimental work is the first study of double arterial embolization of the lung in a large animal model. It was technically successful and well tolerated in all animals. Compared to PAE alone, additional BAE allowed irinotecan lung impregnation over 4 days and probably decreased irinotecan washout in lung tissue. PAE+BAE-50 resulted in a significant toxicity for BA without increasing irinotecan lung concentration compared to PAE+BAE-0. We recommend for a double embolization of lung to combine PAE-50 with a BAE using saline DEB.

References

Baylatry MT, Joly AC, Pelage JP, Bengrine-Lefevre L, Prugnaud JL, Laurent A, Fernandez C. Simple liquid chromatography method for the quantification of irinotecan and SN38 in sheep plasma: application to in vivo pharmacokinetics after pulmonary artery chemoembolization using drug eluting beads. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878 (9-10): 738-42, 2010.

Baylatry MT, Pelage JP, Wassef M, Ghegediban H, Joly AC, Lewis A, Lacombe P, Fernandez C, Laurent A. Pulmonary artery chemoembolization in a sheep model: Evaluation of performance and safety of irinotecan eluting beads (DEB-IRI). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 98B (2):351-9, 2011.

Biancosino C, Albert M, Linder A. Acute toxicity of irinotecan in the ex-vivo isolated perfused human lung model--high-dose therapy during isolated perfusion without acute toxic lung edema. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 6 (5): 583-7, 2007.

Biocompatibles site:www.biocompatiblesoncology.com/pages/dcbead-brochure Accessed on 2010. DC Bead™ with irinotecan, CE approved for loading with irinotecan, offering the benefits of DC Bead to more patients (April 2009)

Boushy SF, North LB, Trice JA. The bronchial arteries in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med* 46 (4): 506-15, 1969.

Charan NB, Carvalho P. Angiogenesis in bronchial circulatory system after unilateral pulmonary artery obstruction. *J Appl Physiol* 82 (1): 284-91, 1997.

Cockett FB, Vass CC. A comparison of the role of the bronchial arteries in bronchiectasis and in experimental ligation of the pulmonary artery. *Thorax* 6 (3): 268-75, 1951.

de Gregorio MA, Medrano J, Mainar A, Alfonso ER, Rengel M. [Endovascular treatment of massive hemoptysis by bronchial artery embolization: short-term and long-term follow-up over a 15-year period]. *Arch Bronconeumol* 42 (2): 49-56, 2006.

Fadel E, Wijtenburg E, Michel R, Mazoit JX, Bernatchez R, Decante B, Sage E, Mazmanian M, Herve P. Regression of the systemic vasculature to the lung after removal of pulmonary artery obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 173 (3): 345-9, 2006.

Hendriks JM, Van Schil PE. Isolated lung perfusion for the treatment of pulmonary metastases. *Surg Oncol* 7 (1-2): 59-63, 1998.

Johnston MR, Minchen RF, Dawson CA. Lung perfusion with chemotherapy in patients with unresectable metastatic sarcoma to the lung or diffuse bronchioloalveolar carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (2): 368-73, 1995.

Jordan O, Denys A, De Baere T, Boulens N, Doelker E. Comparative study of chemoembolization loadable beads: in vitro drug release and physical properties of DC bead and hepasphere loaded with doxorubicin and irinotecan. *J Vasc Interv Radiol* 21 (7): 1084-90, 2010.

Kalva SP. Bronchial artery embolization. *Tech Vasc Interv Radiol* 12 (2): 130-8, 2009.

Lammer J, Malagari K, Vogl T, Pilleul F, Denys A, Watkinson A, Pitton M, Sergent G, Pfammatter T, Terraz S, Benhamou Y, Avajon Y, Gruenberger T, Pomoni M, Langenberger H, Schuchmann M, Dumortier J, Mueller C, Chevallier P, Lencioni R. Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 33 (1): 41-52, 2010.

Lindemayr S, Lehnert T, Korkusuz H, Hammerstingl R, Vogl TJ. Transpulmonary chemoembolization: a novel approach for the treatment of unresectable lung tumors. *Tech Vasc Interv Radiol* 10 (2): 114-9, 2007.

Masuda N, Fukuoka M, Kusunoki Y, Matsui K, Takifuji N, Kudoh S, Negoro S, Nishioka M, Nakagawa K, Takada M. CPT-11: a new derivative of camptothecin for the treatment of refractory or relapsed small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 10 (8): 1225-9, 1992.

Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 7 (8): 2182-94, 2001.

Muller H, Guadagni S. Regional chemotherapy for carcinoma of the lung. *Surg Oncol Clin N Am* 17 (4): 895-917, 2008.

Namur J, D'Inca H, Heaysman C, Manfait M, Lewis AL, Laurent A. Drug eluting beads analyzed with infrared imaging : concentration, distribution and interactions. 36th Annual Meeting and Exposition of Controlled Release Society, Copenhagen, denmark, 18-22 July 2009.

Namur J, Wassef M, Millot JM, Lewis AL, Manfait M, Laurent A. Drug-eluting beads for liver embolization: concentration of doxorubicin in tissue and in beads in a pig model. *J Vasc Interv Radiol* 21 (2): 259-67, 2010.

Osaki T, Hanagiri T, Nakanishi R, Yoshino I, Taga S, Yasumoto K. Bronchial arterial infusion is an effective therapeutic modality for centrally located early-stage lung cancer: results of a pilot study. *Chest* 115 (5): 1424-8, 1999.

Sandler A. Irinotecan therapy for small-cell lung cancer. *Oncology (Williston Park)* 16 (4): 419-25, 428, 433; discussion 433-4, 437-8, 2002.

Swanson KL, Johnson CM, Prakash UB, McKusick MA, Andrews JC, Stanson AW. Bronchial artery embolization : experience with 54 patients. *Chest* 121 (3): 789-95, 2002.

Taylor RR, Tang Y, Gonzalez MV, Stratford PW, Lewis AL. Irinotecan drug eluting beads for use in chemoembolization: in vitro and in vivo evaluation of drug release properties. *Eur J Pharm Sci* 30 (1): 7-14, 2007.

van Ark-Otte J, Kedde MA, van der Vijgh WJ, Dingemans AM, Jansen WJ, Pinedo HM, Boven E, Giaccone G. Determinants of CPT-11 and SN-38 activities in human lung cancer cells. *Br J Cancer* 77 (12): 2171-6, 1998.

van Putte BP, Grootenboers M, van Boven WJ, van Oosterhout M, Pasterkamp G, Folkerts G, Schramel F. Selective pulmonary artery perfusion for the treatment of primary lung cancer: Improved drug exposure of the lung. *Lung Cancer* 65 (2): 208-13, 2009.

Vogl TJ, Herzog C, Zangos S, Lindemayr S. [Palliative treatment of primary lung tumors with transpulmonary chemoembolization (TPCE)]. *Rofo* 179 (3): 300-7, 2007.

Vogl TJ, Lehnert T, Zangos S, Eichler K, Hammerstingl R, Korkusuz H, Lindemayr S. Transpulmonary chemoembolization (TPCE) as a treatment for unresectable lung metastases. *Eur Radiol* 18 (11): 2449-55, 2008.

Vogl TJ, Wetter A, Lindemayr S, Zangos S. Treatment of unresectable lung metastases with transpulmonary chemoembolization: preliminary experience. *Radiology* 234 (3): 917-22, 2005.

Wang GR, Ensor JE, Gupta S, Hicks ME, Tam AL. Bronchial artery embolization for the management of hemoptysis in oncology patients: utility and prognostic factors. *J Vasc Interv Radiol* 20 (6): 722-9, 2009.

Weksler B, Ng B, Lenert JT, Burt ME. Isolated single-lung perfusion with doxorubicin is pharmacokinetically superior to intravenous injection. *Ann Thorac Surg* 56 (2): 209-14, 1993.

Yu-Tang Goh P, Lin M, Teo N, En Shen Wong D. Embolization for hemoptysis: a six -year review. *Cardiovasc Intervent Radiol* 25 (1): 17-25, 2002.

Figure legends:

Figure 1: Angiography of a sheep pulmonary artery before (A) and after (B) embolisation with DEB-IRI

Figure 2: Angiography of a sheep bronchial artery before (A) and after (B) embolisation with DEB-IRI

Figure 3: Mean plasma concentration-time curves of irinotecan after embolisation with DEB-IRI or direct pulmonary artery (PA) injection, during the first hour after procedure.

C_{max} was higher after direct PA injection than after embolisation with DEB-IRI. Following the double embolisation with DEB-IRI, C_{max} was lower and AUC_{0-∞} was not different from those after a direct PA injection whereas a double dose of irinotecan was injected.

Figure 4: Irinotecan lung tissue levels at 4 days after embolisation

In lung tissue, at 4 days, irinotecan was not detected in any of the samples of PAE-50 group but was present in all of the samples of PAE-50+BAE-0 and PAE-50+BAE-50 groups (p=0.0002, KW). Each spot symbolised a concentration of irinotecan detected in one lung tissue sample. 3 lung tissue samples have been analysed for each animal. There were 3 sheep for each embolization group (PAE-50, PAE-50+BAE-0, PAE-50+BAE-50).

Table legends:

Table 1: Pharmacokinetic parameters (mean ± standard deviation) of plasmatic irinotecan after embolization with DEB-IRI (PAE-50, PAE-50+BAE-0, PAE-50+BAE-50; n=3 sheep for each embolization group) and after direct pulmonary artery injection of free irinotecan (n=2 sheep)

Table 2: Vessel and parenchyma necrosis of occluded pulmonary artery 4 days after the procedure

Table 3: Vessel and parenchyma necrosis of occluded bronchial artery 4 days after the procedure

Figure 1: Angiography of a sheep pulmonary artery before (A) and after (B) embolisation with DEB-IRI

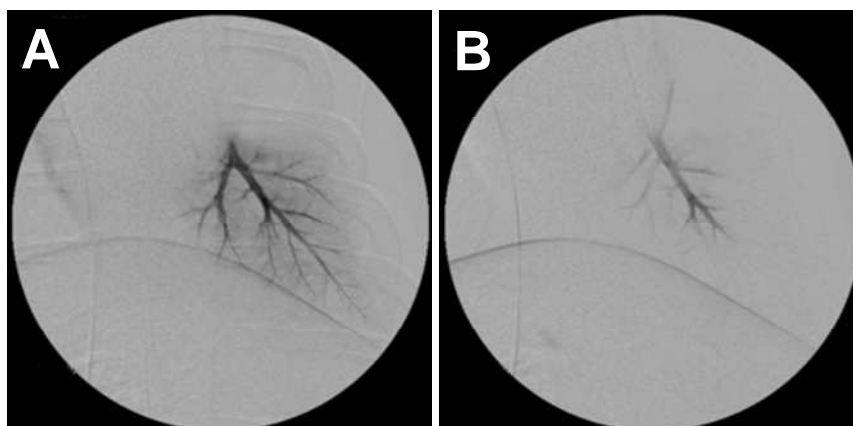


Figure 2: Angiography of a sheep bronchial artery before (A) and after (B) embolisation with DEB-IRI

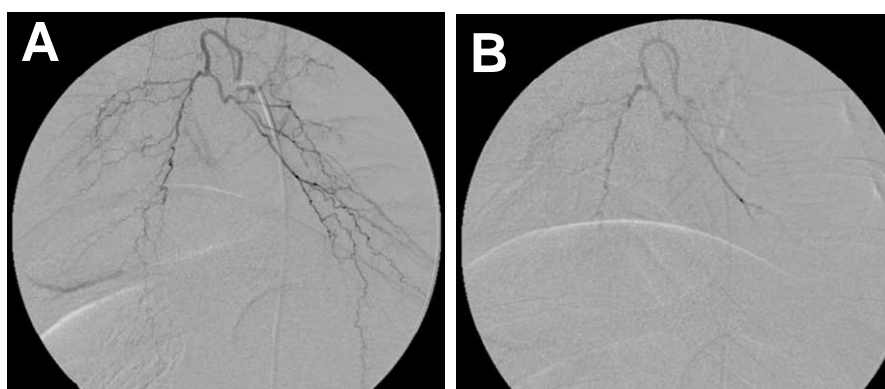


Table 1: Pharmacokinetic parameters (mean \pm standard deviation) of plasmatic irinotecan after embolization with DEB-IRI (PAE-50, PAE-50+BAE-0, PAE-50+BAE-50; n=3 sheep for each embolization group) and after direct pulmonary artery injection of free irinotecan (n=2 sheep)

	PA-IRI 100	PAE-50	PAE-50+BAE-0	PAE-50+BAE-50
Cmax (ng/ml)	3686 \pm 2118	609 \pm 74	1072 \pm 223	1528 \pm 155
AUC0-∞ (ng.min/ml)	221 675 \pm 26 100	137 587 \pm 30 008	160 742 \pm 7886	274 692 \pm 32 284
T1/2 (min)	200 \pm 9	211 \pm 76	260 \pm 20	237 \pm 26

Table 2: Vessel and parenchyma necrosis of occluded pulmonary artery 4 days after the procedure (NA: non applicable)

	Pulmonary artery			
	PAE-0	PAE-50	PAE-50+BAE-0	PAE-50+BAE-50
Beads	n=99	n=127	n=167	n=161
Vessel necrosis	0%	34.7 %	31.7%	21.2%
Chi2 (versus PAE-0)	NA	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001
Chi2 (versus PAE-50+BAE-0)	NA	NA	NA	p=0.0294
Beads	n=99	n=127	n=202	n=200
Parenchyma necrosis	0%	36.2%	24.2%	24%
Chi2 (versus PAE-0)	NA	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001
Chi2 (versus PAE-50+BAE-0)	NA	NA	NA	p=0.9519

Table 3: Vessel and parenchyma necrosis of occluded bronchial artery 4 days after the procedure

	Bronchial artery		Chi ² test
	PAE-50+BAE-0	PAE-50+BAE-50	
Beads	n=37	n=49	p<0.0001
Vessel necrosis	8.2%	48.9%	
Beads	n=37	n=50	p=0.4157
Parenchyma necrosis	8.2%	4%	

Partie 2

MICROSPHERES DE CHIMIOEMBOLISATION CHARGEES EN SIROLIMUS

2.1 Contexte médical : les hémoptysies massives

L'hémoptysie massive est l'une des situations les plus critiques parmi les urgences vitales. Elle est généralement définie pour une quantité de sang extériorisée comprise entre 100 et 600 mL par 24h (Dweik 1999) et concerne moins de 5% des hémotypsies (Thompson 1992). La majorité des hémoptysies massives (90%) ont pour origine une hypervascularisation systémique d'origine artérielle bronchique (Yoon 2002). Les étiologies principales des hémoptysies massives sont les dilatations des bronches, la tuberculose active ou séquellaire, le cancer bronchique, les aspergillomes ou l'aspergillose invasive. Plus rarement les saignements proviennent de la circulation pulmonaire (artérielle, veineuse ou capillaire) ou des gros vaisseaux thoraciques (Yoon 2002).

L'évolution sans traitement médical simple est grevée d'un taux de mortalité de 50% à 100% (Crocco 1968). L'embolisation bronchique est le traitement symptomatique de référence des hémoptysies massives ou récidivantes (Remy 1973 ; Remy 1977 ; Uflacker 1983 ; Uflacker 1985 ; Ramakantan 1996). Elle permet un contrôle immédiat de l'hémoptysie dans 75% à 90% (Carette 2004). L'évolution à moyen et long terme reste marquée par un taux de récives évalué entre 10% et 52% après embolisation (embolisation incomplète, recanalisation, persistance de la pathologie à l'origine de l'hypervascularisation) (Katoh 1990 ; Thompson 1992 ; Mal 1999 ; de Gregorio 2006).

2.2 Principe actif étudié : sirolimus

2.2.1 Rationnel

La recanalisation des vaisseaux embolisés est une des principales causes de récives des hémoptysies massives après embolisation bronchique (Keller 1987 ; Katoh 1990). Elle est due à un remodelage vasculaire qui aboutit à la migration transvasculaire de l'agent

d'embolisation et à l'apparition d'une nouvelle lumière vasculaire fonctionnelle (Vinters 1986; Tomaszewski 1988). Le remodelage vasculaire est impliqué dans de nombreuses pathologies (Eddahibi 2003; Levy 2005; Chetta 2007 ; Welter 2009 ; Aubier 2010) et fait intervenir de nombreux facteurs et voies de signalisation qui sont autant de cibles thérapeutiques (Jeffery 2001 ; Burgess 2009 ; Morin-Brureau 2011).

Les inhibiteurs du remodelage vasculaire sont nombreux et appartiennent à des classes thérapeutiques différentes (Garnier 1993 ; Wojciak-Stothard 2008 ; Zanini 2008). Le sirolimus est à la fois un immunosuppresseur et un inhibiteur du remodelage vasculaire (Murphy 2003 ; Buerke 2007 ; Semela 2007). Il est l'un des principes actifs les plus utilisés dans les stents imprégnés pour prévenir la resténose (Windecker 2005; Minutello 2006 ; Buerke 2007 ; Steigerwald 2009)

L'utilisation de microsphères de chimioembolisation chargées en sirolimus pourrait être intéressante dans la prévention de la recanalisation et donc de la récurrence des hémoptysies. Le sirolimus n'étant pas hydrosoluble, nous avons utilisé des microsphères de chimioembolisation préchargées en sirolimus fournies par un industriel.

2.2.2 Caractéristiques (EMA)

Le sirolimus ou rapamycine (Figure 22) est un macrolide initialement identifié comme un agent antibiotique et antifongique. Ses propriétés antiprolifératives ont été mises à profit dans des domaines cliniques très variés tels que la transplantation rénale, cardiaque ou pulmonaire (Kahan 2000 ; Keogh 2004 ; Snell 2006), la cardiologie interventionnelle avec les endoprothèses chargées en sirolimus (Morice 2002) ou encore l'oncologie où les propriétés antitumorales du sirolimus sont actuellement explorées (Mita 2003 ; Boffa 2004 ; Pal 2008 ; Heuer 2009 ; Treiber 2009 ; Yang 2009). Commercialement, il a été développé comme agent immunosuppresseur et est indiqué en prévention du rejet d'organe chez les patients adultes présentant un risque immunologique faible à modéré recevant une transplantation rénale. Le schéma posologique usuel consiste en une dose de charge unique de 6 mg de sirolimus par voie orale suivie d'une dose de 2 mg une fois par jour. La posologie maximale administrée ne doit pas dépasser 40 mg.

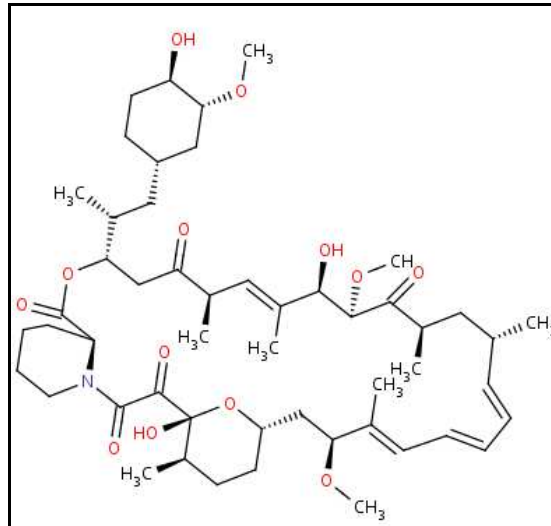


Figure 22- Structure chimique du sirolimus (Chemicalize)

i. Mécanisme d'action

Le sirolimus inhibe une protéine kinase, la mTOR (mammalian target of rapamycin), qui joue un rôle central dans la régulation de la prolifération cellulaire chez les mammifères. En inhibant la mTOR, il exerce un effet antiprolifératif sur de nombreux types cellulaires et une inhibition de l'activation lymphocytaire, à l'origine d'une immunosuppression.

ii. Métabolisme

Le sirolimus est un substrat du cytochrome P450 IIIA4 (CYP3A4) et de la glycoprotéine-P. Il est principalement métabolisé par O-déméthylation et/ou hydroxylation. Sept métabolites principaux, incluant les dérivés hydroxylés, déméthylés et hydroxydéméthylés, sont identifiables dans le sang total. Le sirolimus est le composé principalement retrouvé dans le sang humain total et il contribue pour plus de 90% à l'activité immunosuppressive.

iii. Pharmacocinétique

Après administration par voie orale, le sirolimus est rapidement absorbé, le pic de concentration étant atteint en une heure chez les sujets sains recevant des doses uniques et en 2 heures chez les patients avec une allogreffe rénale stable et recevant des doses répétées. La biodisponibilité systémique du sirolimus administré concomitamment à la ciclosporine est

d'environ 14%. La demi-vie d'élimination terminale chez les patients transplantés rénaux stables après des doses orales répétées est de 62 ± 16 heures.

iv. Toxicité

La toxicité est dose dépendante et porte essentiellement sur des paramètres biologiques : thrombocytopenie, anémie, hypokaliémie, hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie. Des infections urinaires, douleurs abdominales, diarrhées et nausées ont également été fréquemment rapportées.

2.3 Travaux personnels

2.3.1 Quantification du sirolimus dans le sang et dans le tissu pulmonaire de la brebis

La quantification du sirolimus dans le sang total et dans le tissu pulmonaire de brebis a été réalisée par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse quadripôle en tandem.

i. Sirolimus dans le sang total

Le sirolimus a été dosé dans le sang total en raison de sa forte affinité pour les hématies. Les prélèvements sanguins ont été réalisés dans des tubes contenant de l'EDTA comme anticoagulant. Nous avons utilisé une méthode de dosage adaptée de celle de Koster et son équipe (Koster 2009), utilisée en routine pour le suivi thérapeutique des patients sous traitement par sirolimus. Nous avons vérifié au préalable que la méthode était applicable au sang de brebis, à l'identique du sang humain (Figure 23). L'exactitude de la méthode, appliquée à des échantillons de brebis, a été vérifiée. La méthode a montré être reproductible et répétable avec des coefficients de variation inférieurs à 15%. Le sirolimus a été dosé dans des prélèvements, réalisés chez la brebis 15 minutes après la chimioembolisation bronchique, afin de vérifier que les concentrations retrouvées se situaient dans la gamme d'étalonnage utilisée en pratique courante (2,5 ng/mL – 49 ng/mL). La limite de quantification de la méthode est de 2 ng/mL.

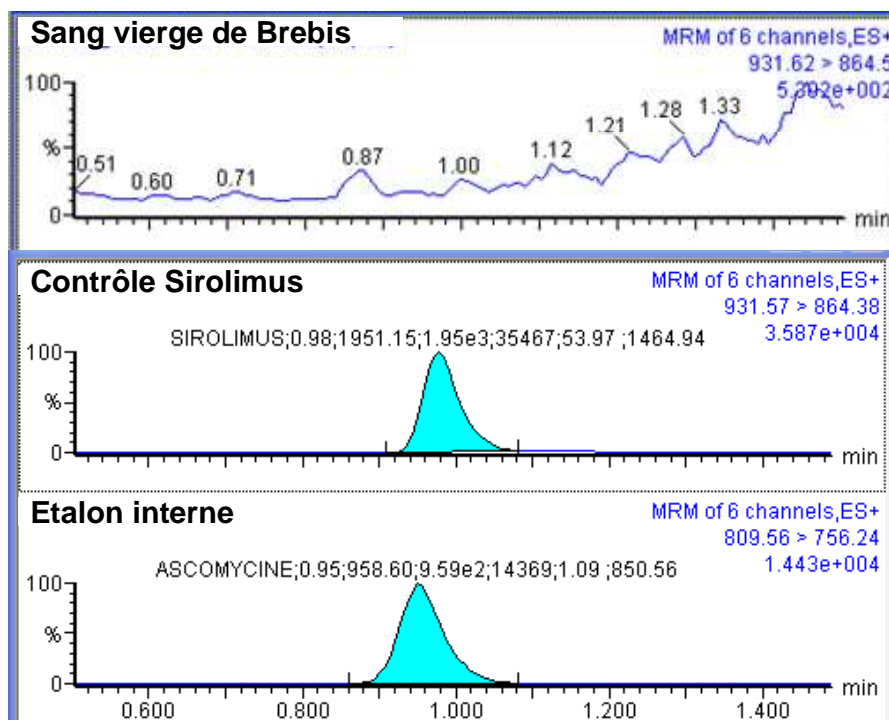


Figure 23- Chromatogrammes d'un sang vierge de brebis, d'un point contrôle de sirolimus (10,2 ng/mL) et de l'étalon interne (sang humain)

ii. Sirolimus dans le tissu pulmonaire

La quantification tissulaire du sirolimus a été réalisée avec la méthode de dosage utilisée pour la quantification dans le sang. Les échantillons tissulaires ont été pesés, homogénéisés dans du Tris-HCl 1 M glacial puis centrifugés à +4°C. Le surnageant obtenu a été traité de la même façon que les échantillons sanguins. La matrice tissulaire étant différente de celle du sang total, nous avons validé la méthode de dosage à partir de prélèvements de tissu sain pulmonaire de brebis surchargés en sirolimus. Le rendement d'extraction à partir du tissu pulmonaire était supérieur à 87 %. Les coefficients de variation pour la répétabilité, la reproductibilité et l'exactitude étaient inférieurs à 15%. La méthode était linéaire pour une gamme de concentrations comprises entre 5 ng/mL et 100 ng/mL, avec un coefficient de corrélation (r^2) égal à 0,9984. La limite de quantification était de 5 ng/mL.

2.3.2 Chimioembolisation de l'artère bronchique dans un modèle d'hypervascularisation systémique du poumon

Problématique

L'embolisation bronchique est le traitement de première intention des hémoptysies massives, mais elle est généralement suivie d'une recanalisation source de récurrences. L'utilisation de microsphères de chimioembolisation délivrant localement un inhibiteur du remodelage vasculaire comme le sirolimus pourrait être intéressante pour prévenir ces récurrences.

Objectif

L'objectif de l'étude était de caractériser les performances des microsphères chargées en sirolimus en termes de concentrations sanguine et tissulaire dans un modèle d'hypervascularisation systémique du poumon chez la brebis.

Etude

L'hypervascularisation systémique du poumon et la dilatation des artères bronchiques ont été provoquées par embolisation de l'artère pulmonaire avec des caillots sanguins et des spires métalliques. La chimioembolisation de l'artère bronchique a été réalisée chez 2 brebis 14 jours après l'embolisation de l'artère pulmonaire avec des microsphères de taille 500-700 μm préchargées avec 38 mg de sirolimus. Ces microsphères préchargées ont été fournies par l'industriel Biocompatibles.

Le sirolimus a été dosé dans le sang après chimioembolisation de l'artère bronchique pendant 12 jours et dans le tissu à partir d'échantillons prélevés au 12^{ème} jour, date du sacrifice des brebis. La concentration était stable durant les premières 24 heures suivant la chimioembolisation de l'artère bronchique (médiane=28ng/mL, min-max :19-38) (Figure 24), et décroissait ensuite jusqu'à 2ng/mL à J2. Le sirolimus était présent dans le tissu pulmonaire à J12 dans tous les échantillons (n=3 échantillons tissulaires par brebis ; médiane=27ng/mL, min-max :13-32) (Figure 25). Le nombre d'échantillons tissulaires analysés était très limité car les poumons embolisés présentaient des zones de nécrose étendues liées à un défaut de fixation du poumon dans le formol.

En conclusion, cette étude a montré que la délivrance locale de sirolimus au tissu pulmonaire durant 12 jours, à une concentration importante, sans pic systémique, est possible

après chimioembolisation de l'artère bronchique dans un modèle d'hypervascularisation pulmonaire.

L'analyse complémentaire histologique a montré que le taux de recanalisation des vaisseaux embolisés était nul chez les brebis ayant reçu une chimioembolisation bronchique par microsphères préchargées en sirolimus (n=2 brebis, 11 vaisseaux analysés) versus 16% chez les brebis ayant reçu une embolisation bronchique par microsphères non chargées (n=2 brebis, 32 vaisseaux analysés)(résultat non significatif).

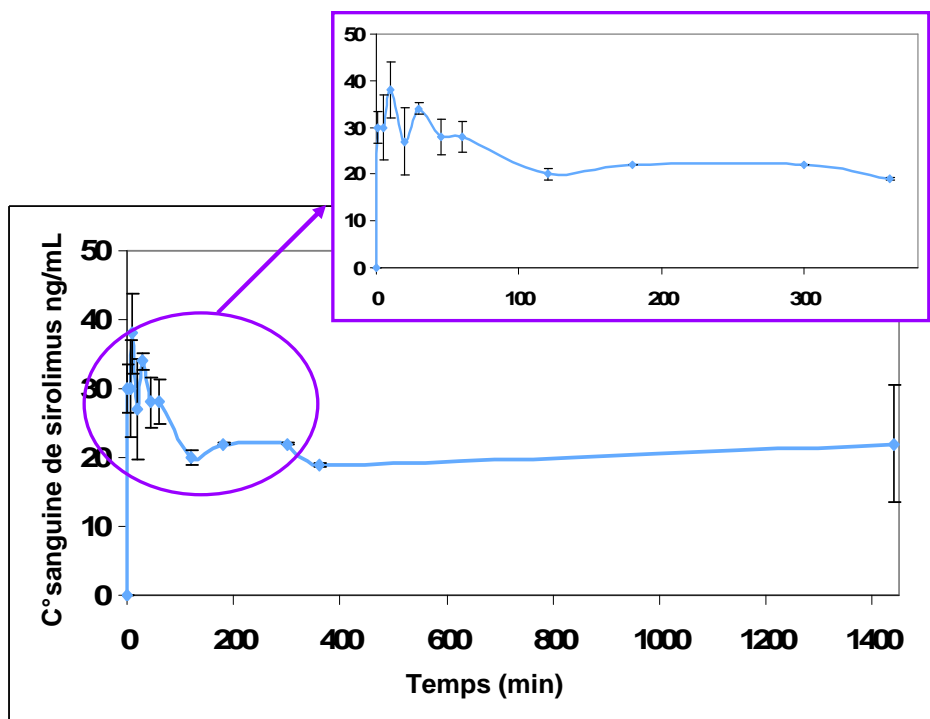


Figure 24- Profil sanguin du sirolimus (ng/mL) après chimioembolisation bronchique chez la brebis (dose : 38 mg , n = 2 brebis)

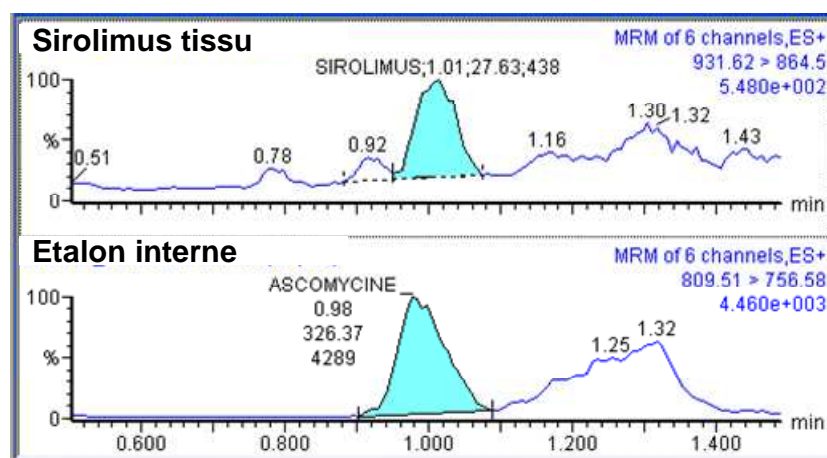


Figure 25- Chromatogramme d'un échantillon tissulaire de brebis contenant du sirolimus (13 ng/mL)

Partie 3

DISCUSSION GENERALE

Nos résultats représentent les premières données sur la chimioembolisation par microsphères chargées dans le poumon. Ils vont être discutés au regard de la littérature autour de trois points : leur validité, les performances des différentes techniques de chimioembolisation présentées dans nos études (chimioembolisation pulmonaire seule ou combinée, chimioembolisation bronchique dans un modèle d'hypervascularisation du poumon) et les performances des microsphères chargeables appliquées à la chimioembolisation du poumon.

3.1 Validité de nos résultats

3.1.1 Libération rapide et biphasique de l'irinotécan

i. Libération de l'irinotécan dans le plasma

Quelles que soient la dose en irinotécan chargée dans la microsphère et la procédure de chimioembolisation (chimioembolisation de l'artère pulmonaire seule ou chimioembolisation additionnelle de l'artère bronchique), la libération plasmatique de l'irinotécan était rapide et biphasique : un pic plasmatique observé dans les 10 premières minutes après la procédure puis une phase de décroissance progressive des concentrations plasmatiques jusqu'à 24h, temps à partir duquel l'irinotécan n'était plus détecté dans le plasma. Taylor et son équipe ont obtenu, chez le cochon, après chimioembolisation hépatique, un profil plasmatique de libération de l'irinotécan similaire au notre avec un pic observé dans les 5 premières minutes et une décroissance jusqu'à 20h (Taylor 2007). L'organe embolisé (foie, poumon) et l'espèce animale (cochon, brebis) ne semblent donc pas influencer la cinétique de libération de l'irinotécan au niveau plasmatique après chimioembolisation.

Lorsqu'on a augmenté la concentration en irinotécan chargé, de 10 mg/mL à 50 mg/mL, la cinétique de libération de l'irinotécan au niveau plasmatique était ralentie dans les 20 premières minutes après la chimioembolisation pulmonaire. Cette cinétique plus lente observée à la concentration de 50 mg/mL est liée à une réduction de l'échange ionique et à un

taux de diffusion plus faible de l'irinotécan dans la microsphère, qui devient plus hydrophobe et plus dense en chargeant une quantité importante en irinotécan (Taylor 2007).

La libération rapide et biphasique de l'irinotécan et l'influence de la dose chargée dans les microsphères sur les cinétiques de libération, observées dans nos études, sont en accord avec les résultats des études réalisées *in vitro* sur la libération d'irinotécan à partir des microsphères de chimioembolisation (Taylor 2007 ; Jordan 2010). Il n'existe pas à notre connaissance de données publiées sur la pharmacocinétique plasmatique de l'irinotécan après chimioembolisation chez l'homme. Les études sur la libération de la doxorubicine à partir des microsphères de chimioembolisation ont montré qu'il existait une bonne corrélation entre les profils de libération de la doxorubicine au niveau plasmatique, obtenus *in vitro* et *in vivo* chez l'animal et chez l'homme (Lewis 2006 ; Varela 2007; Gonzalez 2008). La bonne corrélation entre nos résultats et ceux obtenus chez le cochon et *in vitro* (Taylor 2007), laisse supposer que la libération de l'irinotécan au niveau plasmatique serait, chez l'homme, également rapide et biphasique après chimioembolisation.

ii. Libération de l'irinotécan dans le tissu

Nos résultats ont montré que l'irinotécan, après chimioembolisation de l'artère pulmonaire avec des microsphères de taille 300-500 μ m, était rapidement libéré dans le tissu et était complètement élué des microsphères en moins de 4 jours. La présence de nécroses de la paroi vasculaire et du parenchyme autour des vaisseaux occlus, observée uniquement avec les microsphères chargées en irinotécan à 50mg/mL, suggère que la libération du principe actif était plus rapide pour les microsphères chargées à des concentrations plus faibles en irinotécan et que le temps de contact entre le tissu et le principe actif n'était pas suffisant pour permettre une diffusion locale du principe actif. On aurait pu s'attendre à ce résultat au vu de l'étude *in vitro* de Taylor et son équipe qui ont montré que la libération de l'irinotécan était rapide et complète en une heure pour des microsphères de même type et de taille inférieure à 500 μ m et ce quelle que soit la dose chargée en irinotécan, et que cette libération était encore plus rapide pour des petites doses en irinotécan (Taylor 2007).

Une quantification plus précoce de l'irinotécan dans le tissu a été réalisée par Rao et son équipe à 1h, 6h et 24h après chimioembolisation hépatique (modèle tumoral VX2 chez le lapin). L'irinotécan était présent dans le tissu hépatique. Les concentrations en irinotécan à 1h et 6h étaient du même ordre de grandeur, 50 et 60 ng/200 mg de tissu respectivement, celle à 24h était trois fois plus élevée (174 ng/200 mg de tissu) (Rao 2009). Cette différence de

concentrations pourrait suggérer une libération de l'irinotécan dans le tissu en deux phases. Une libération du principe actif qui se fait dans un premier temps dans un milieu vascularisé favorisant l'élution et le métabolisme du principe actif (concentrations tissulaires faibles), puis dans un second temps, suite à l'ischémie induite par l'occlusion vasculaire, une libération qui se fait dans un milieu non vascularisé, plus acide et nécrosé favorisant la concentration du principe actif (concentrations élevées).

3.1.2 Absence de toxicité systémique

Nous n'avons pas détecté de SN38 dans le plasma de nos brebis. Ce résultat peut être expliqué par l'absence (Li 2005) ou la très faible activité dans le plasma de brebis de la carboxylesterase, enzyme responsable de l'activation de l'irinotécan en SN38. Koizumi et son équipe ont mesuré des concentrations (C_{max}) en SN38 inférieures à 5 ng/mL après injection IV de 100 mg d'irinotécan chez la brebis (28-32 kg) (Koizumi 1998). Les doses d'irinotécan utilisées dans nos études étant comprises entre 20 mg et 200 mg, le poids de nos brebis étant compris entre 70 kg et 85 kg et la limite de quantification du SN38 par notre méthode de dosage étant de 5 ng/mL, ce résultat était attendu.

Des études ont montré que la toxicité de l'irinotécan était corrélée avec la concentration plasmatique en SN38 (de Forni 1994 ; Rowinski 1994, Abigeres 1995, Sasaki 1995). Aucune toxicité liée à l'irinotécan n'a été rapportée dans nos études. Ce résultat pourrait être lié à l'absence de SN38 dans le plasma de brebis.

i. Evaluation et interprétation de la toxicité systémique de l'irinotécan

Aucune toxicité sévère liée à l'irinotécan n'a été rapportée chez des patients ayant reçu une chimioembolisation hépatique par microsphères chargées en irinotécan (100 mg par chimioembolisation) (Martin 2009, Martin 2010). En revanche, l'administration IV d'irinotécan à des doses équivalentes (60-100mg), chez des patients atteints de tumeur pulmonaire, a été associée à de sévères diarrhées et neutropénies (Naka 2002 ; Fukuda 2004 ; Kim 2010). Cette toxicité observée par voie IV mais pas après une chimioembolisation par microsphères chargées en irinotécan est probablement liée aux concentrations plasmatiques en irinotécan et en SN38 qui doivent être beaucoup plus élevées après une perfusion IV qu'après une chimioembolisation. Une étude chez le lapin a montré que la chimioembolisation par

microsphères chargées en irinotécan permettait une réduction significative des concentrations systémiques en irinotécan et en SN38, comparée à une injection IV (Rao 2009).

La toxicité systémique de l'irinotécan observée chez l'animal reste néanmoins difficilement transposable chez l'homme pour deux principales raisons :

- la toxicité de l'irinotécan chez l'homme est très complexe et dépend de nombreux facteurs pharmacocinétiques (Kudoh 1995 ; Mathijssen 2001), cliniques, biologiques et pharmacogénétiques (Kweekel 2008; Rouits 2008; Han 2009).
- la grande disparité du métabolisme de l'irinotécan (activation en SN38, détoxification du SN38,...) selon les espèces (Satoh 1994 ; Li 2005 ; Satoh 2006).

ii. Taux de conversion de l'irinotécan en SN38 selon l'espèce

Les modèles animaux habituellement utilisés en embolisation sont le lapin (Hong 2006), le cochon (Taylor 2007) et la brebis (Laurent 2008). Le choix du modèle animal est particulièrement important pour évaluer la toxicité et l'efficacité de l'irinotécan libéré à partir des microsphères de chimioembolisation. En effet, le taux de conversion de l'irinotécan en SN38 par la carboxylesterase est très variable selon les espèces. Satoh et son équipe ont montré que la carboxylesterase hépatique du lapin et celle du cochon avaient une activité respectivement 30 fois et 17 fois plus importante que celle de l'homme (Satoh 1994). D'autres études, réalisées chez le lapin, ont montré que la carboxylesterase était 100 à 1000 fois plus active que celle de l'homme (Figure 26)(Danks 1999 ; Wierdl 2001). L'activité de la carboxylesterase hépatique de la brebis n'a pas été décrite dans ces études. La quantité de SN38 produite chez le lapin et le cochon est donc beaucoup plus élevée que celle produite chez l'homme, pour une même dose d'irinotécan injectée. L'efficacité et la toxicité de l'irinotécan étant directement liées à la concentration en SN38, il est important de prendre en considération les spécificités animales, au niveau de l'étape d'activation de l'irinotécan en SN38, dans l'interprétation et la transposabilité des résultats chez l'homme afin d'éviter une surestimation de l'efficacité ou de la toxicité de l'irinotécan. Les principales caractéristiques de l'étape d'activation de l'irinotécan en SN38 chez l'homme, la brebis et le lapin sont présentées dans la Figure 27.

Nous avons choisi comme modèle animal, la brebis, qui est, parmi les modèles animaux utilisés en embolisation, le plus adapté pour la chimioembolisation pulmonaire bien que son métabolisme pour le SN38 soit différent de celui de l'homme, le point privilégié de nos

études préliminaires étant les performances de libération du principe actif à partir des microsphères et non l'efficacité.

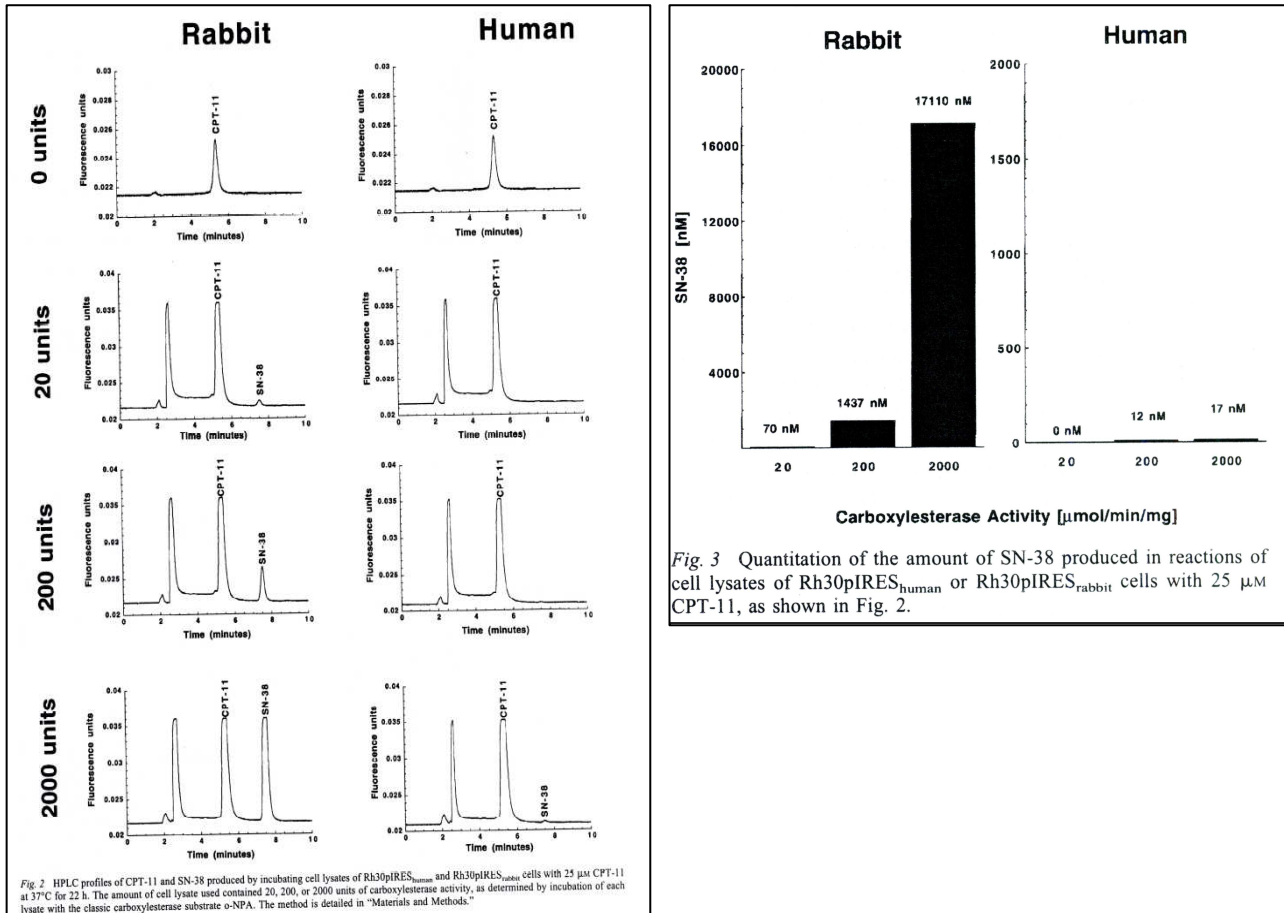


Figure 26- Comparaison entre l'activité de la carboxylesterase du lapin et celle de l'homme dans la conversion de l'irinotécan (CPT11) en SN38 (Danks 1999)

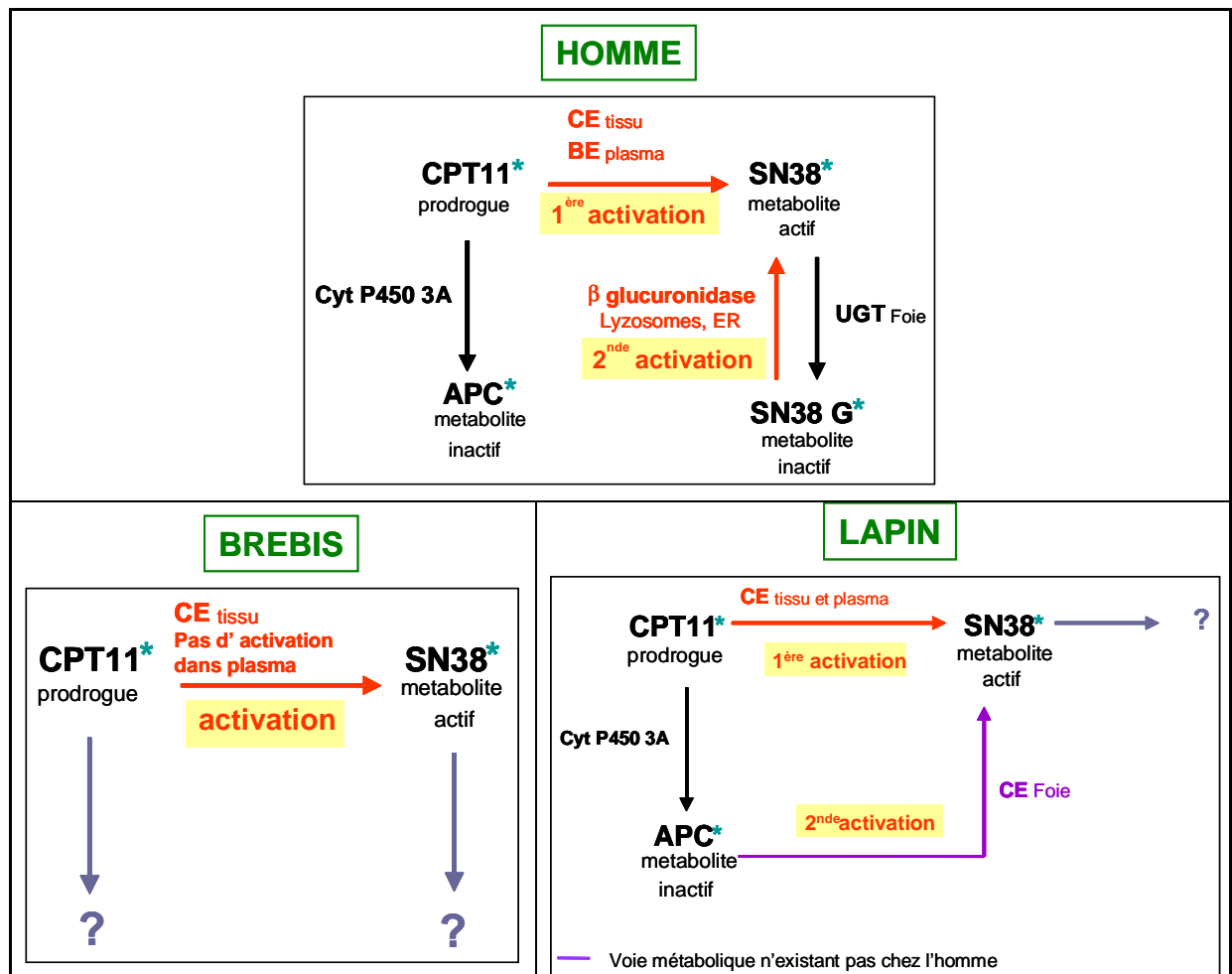


Figure 27- Activation de l'irinotécan (CPT11) en SN38 chez l'homme, la brebis et le lapin (Koizumi 1998 ; Morton 1999 ; Li 2005; Tobin 2006)

CE: carboxylesterase ; BE: butyrylcholinesterase ; UGT:UDP-glucuronosyltransferase ; ER: endoplasmic reticulum ; * : formes carboxylate et lactone

3.1.3 Effets locaux sur tissu non tumoral

Nos études préliminaires ont été réalisées sur un modèle non tumoral, notre objectif étant d'évaluer la chimioembolisation du poumon, par microsphères chargeables en irinotécan, en termes de tolérance et de performances de libération et diffusion du principe actif dans le tissu pulmonaire et non en termes d'efficacité. La transposabilité des résultats, obtenus à partir d'un modèle non tumoral chez le cochon à un modèle tumoral chez l'homme (prélèvements de CHC), après chimioembolisation hépatique par microsphères chargeables en doxorubicine, a été démontrée par Namur et son équipe. Ils ont montré, au niveau du tissu

hépatique, que les profils de libération et de distribution de la doxorubicine à partir des microsphères chargeables, les concentrations en doxorubicine et les lésions tissulaires induites par le principe actif étaient assez proches entre le modèle non tumoral et le modèle tumoral (Namur 2010 ; Namur 2011).

La transposabilité de nos résultats dans un modèle tumoral n'a pas encore été étudiée et l'absence de données dans la littérature concernant les profils de libération de l'irinotécan, au niveau tissulaire, après chimioembolisation ne nous permet pas de comparer nos résultats avec ceux obtenus dans un modèle tumoral. Néanmoins, on peut supposer que la cinétique de libération de l'irinotécan pourrait être ralentie dans une tumeur où le pH est acide, comparé à un tissu sain. Contrairement à la doxorubicine, l'irinotécan coexiste sous différentes formes dans une zone de pH allant de 3 à 8. L'irinotécan se présente sous deux formes lactone ionisées (l'une ayant deux charges positives, l'autre une charge positive) à pH acide et sous une forme carboxylate zwitterion en équilibre avec la forme lactone (une charge positive) à pH neutre ou basique (Figure 28). Son interaction avec les groupements anioniques de la microsphère devrait être par conséquent plus forte à pH acide qu'à pH neutre et son profil de libération ralenti à pH acide. Les milieux utilisés pour étudier *in vitro* la libération de principe actif à partir de microsphères de chimioembolisation sont très souvent des milieux tamponnés ayant un pH voisin de 7 (Taylor 2007 ; Gonzalez 2008 ; Jordan 2010). Le pH des tissus sains varie entre 7 et 8 mais celui des tissus tumoraux varie entre 5,5 et 7 (Wike Hooley 1984 ; Thistlethwaite 1985). Le pH acide des tumeurs perturbe les échanges ioniques. Les principes actifs ionisables peuvent, en fonction de leur pKa et de leur structure, se comporter différemment à pH physiologique et à pH acide (Mahoney 2003 ; Gerweck 2006) Les études préliminaires de libération *in vitro* pour valider l'intérêt de charger, ou non, un principe actif dans la microsphère devraient inclure des libérations de principe actif réalisées dans des milieux à pH acide voisin de celui des tumeurs.

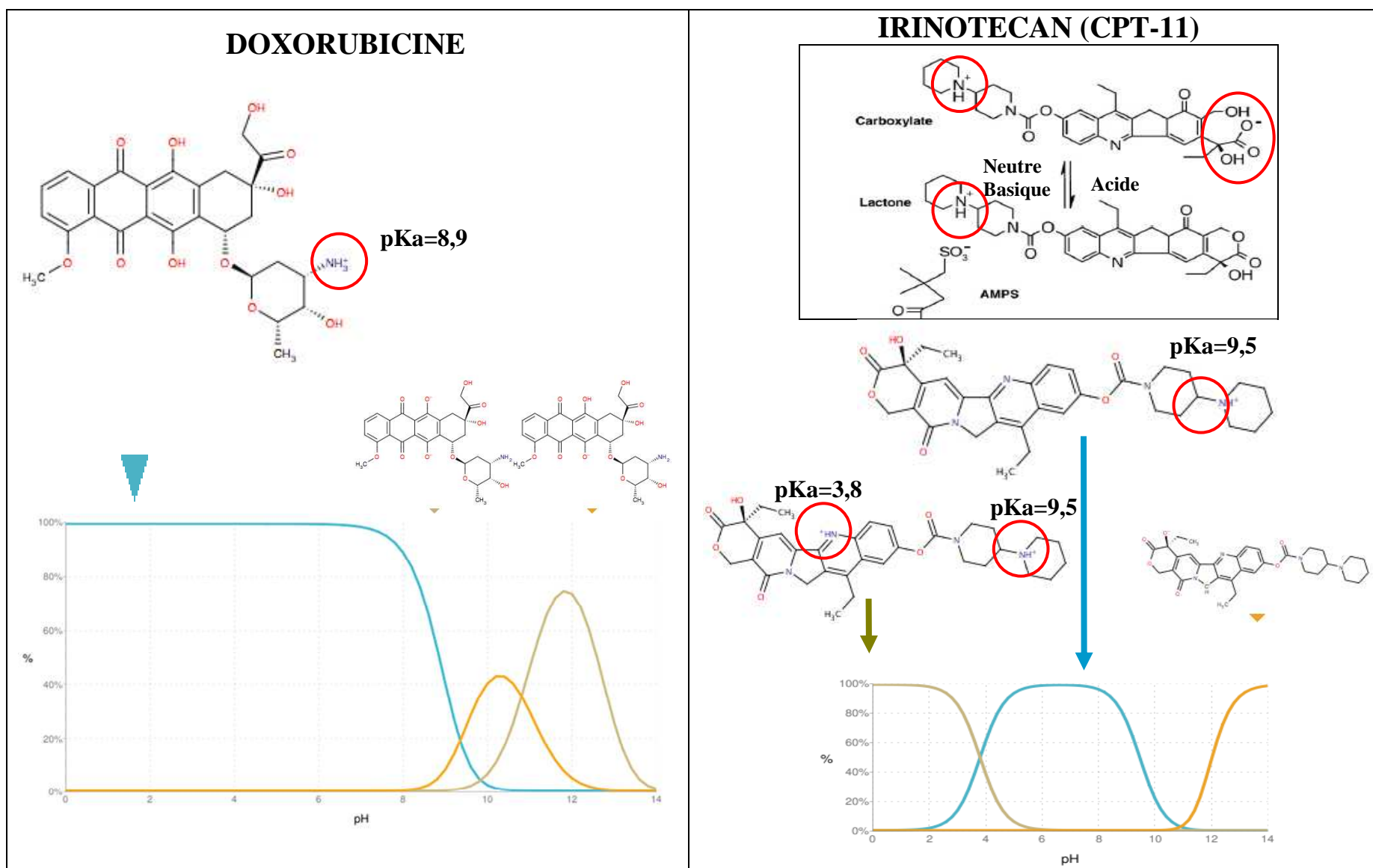


Figure 28-Formes ionisées de la doxorubicine et de l'irinotécan en fonction du pH (Chemicalize, Tang 2008)

Les formules des formes ionisées qui prédominent pour un pH supérieur à 10 ont été volontairement « rétrécies » car ces formes n'existent pas dans la zone de pH étudiée pour la chimioembolisation.

3.2 Chimioembolisation du poumon: performances selon la technique

Les critères de performance de la chimioembolisation du poumon sont différents selon qu'il s'agit d'une chimioembolisation « d'imprégnation » pour le traitement des tumeurs pulmonaires ou d'une chimioembolisation « anti-recanalisation » pour la prévention des récurrences des hémoptysies massives. Dans la chimioembolisation « d'imprégnation », l'action thérapeutique principale est assurée par le principe actif chargé dans les microsphères de chimioembolisation, qui doit être libéré en quantité suffisante pour obtenir une action antitumorale et diffuser en profondeur dans le tissu pulmonaire pour assurer une imprégnation du lobe. Dans la chimioembolisation « anti-recanalisation », l'action thérapeutique principale est assurée par la microsphère en tant qu'agent d'occlusion vasculaire. Le principe actif chargé dans les microsphères doit avoir une action locale et diffuser dans une zone limitée autour du vaisseau.

3.2.1 Chimioembolisation « d'imprégnation »

i. Chimioembolisation limitée à la seule artère pulmonaire

Nos résultats ont montré que la chimioembolisation de l'artère pulmonaire seule ne permettait pas une imprégnation suffisante du poumon par l'irinotécan qui était rapidement éliminé au niveau pulmonaire par la vasodilatation réactionnelle des artères bronchiques dont le débit sanguin peut augmenter progressivement jusqu'à 5 fois sa normale, après occlusion de l'artère pulmonaire (Charan 1997 ; Fadel 2006). La chimioembolisation de l'artère pulmonaire seule paraît donc peu prometteuse dans le traitement des métastases pulmonaires vascularisées par l'artère pulmonaire.

ii. Chimioembolisation de l'artère pulmonaire combinée

L'association d'une embolisation bronchique par microsphères chargées, ou non, à la chimioembolisation de l'artère pulmonaire a permis une imprégnation du segment pulmonaire embolisé par l'irinotécan pendant au moins 4 jours et confirme notre hypothèse de « washout » de l'irinotécan via les artères bronchiques après occlusion de l'artère pulmonaire.

* [Apport d'une embolisation bronchique par microsphères non chargées](#)

L'embolisation bronchique additionnelle par microsphères non chargées a permis d'obtenir des concentrations tissulaires élevées en irinotécan. Cette augmentation de la concentration tissulaire ne s'est pas traduite par une diminution des concentrations plasmatiques en irinotécan, comparée à une chimioembolisation limitée à la seule artère pulmonaire. Nous supposons que le principe actif, lors du « washout » par les artères bronchiques, est éliminé majoritairement dans la lymphe et non dans la circulation systémique (Wagner 1998) et qu'en embolisant les artères bronchiques, cette quantité de principe actif est restée dans le tissu, expliquant l'augmentation de la concentration tissulaire après l'embolisation bronchique additionnelle.

La double embolisation hépatique, chimioembolisation de l'artère hépatique associée à l'embolisation de la veine porte, est une technique utilisée pour augmenter le taux de résection des CHC (Aoki 2004 ; Kokudo 2004 ; Vilgrain 2008). Elle est relativement bien tolérée et permet d'obtenir lorsque la chimioembolisation de l'artère hépatique est réalisée avec de la doxorubicine, un taux significativement plus élevé de nécrose complète de la tumeur avec un taux élevé de survie sans récurrence à 5 ans, comparée à une embolisation de la veine porte seule (Nakao 1986 ; Ogata 2006).

La double embolisation appliquée au poumon, chimioembolisation de l'artère pulmonaire combinée à une embolisation bronchique, n'a jamais encore été réalisée chez l'homme et pourrait être intéressante comme chimioembolisation d'imprégnation dans le traitement des tumeurs pulmonaires. Cependant, nos résultats ont été obtenus à partir d'un poumon non tumoral et Koukourakis et son équipe ont montré que la densité vasculaire dans les tumeurs pulmonaires était très inférieure à celle d'un poumon non tumoral (Figure 29) (Koukourakis 2000). La vectorisation du principe actif par la voie artérielle nécessiterait, pour obtenir une imprégnation suffisante de la tumeur pulmonaire par le principe actif, une libération continue et prolongée du principe actif qui doit être capable de diffuser profondément dans le tissu pulmonaire.

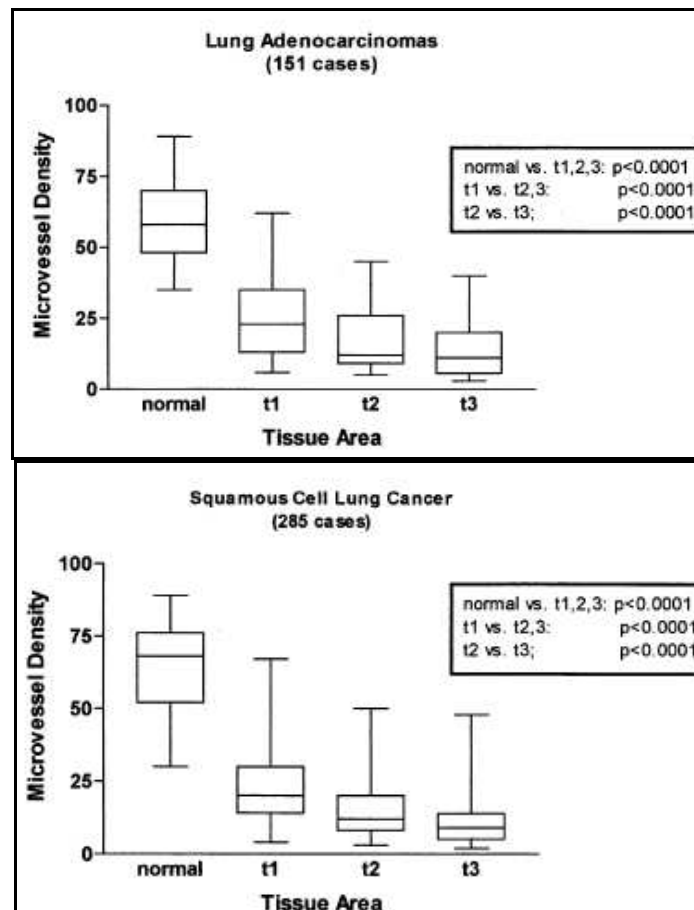


Figure 29- Densité vasculaire dans le poumon sain et dans les tumeurs pulmonaires (Koukourakis 2000)

t1 : périphérie de la tumeur, t2 : zone intermédiaire de la tumeur, t3 : zone centrale de la tumeur

* [Apport d'une embolisation bronchique par microsphères chargées](#)

L'embolisation bronchique additionnelle par microsphères chargées n'a pas permis d'augmenter les concentrations tissulaires en irinotécan, comparée à l'embolisation bronchique additionnelle par microsphères non chargées. Le nombre de prélèvements tissulaires analysés étant faible et la quantification ayant été réalisée à partir d'homogénats de tissus (présence et quantité de microsphères dans l'échantillon inconnues), ce résultat est à prendre avec précaution. La présence de nécrose vasculaire sans aucune nécrose du parenchyme autour des artères bronchiques embolisées suggère que la diffusion de l'irinotécan à partir des microsphères était très limitée.

La chimioembolisation bronchique a été réalisée 10 minutes après la chimioembolisation de l'artère pulmonaire, temps à partir duquel une vasodilatation des

artères bronchiques a été observée sous angiographie. La dilatation des artères bronchiques réactionnelle à l'occlusion de l'artère pulmonaire a été décrit dans la littérature comme un phénomène progressif qui se stabilisait environ à 4 semaines (Liebow 1950 ; Williams 1955). Il est possible que la dilatation progressive des artères bronchiques après la chimioembolisation de l'artère pulmonaire ait favorisé le déplacement des microsphères au cours du temps, ne permettant pas un contact suffisamment long avec le tissu pour une diffusion de l'irinotécan dans le parenchyme.

Une chimioembolisation bronchique, réalisée quelques semaines après la chimioembolisation de l'artère pulmonaire, aurait peut-être permis une meilleure imprégnation du poumon par un déplacement plus limité des microsphères, sous réserve que le principe actif chargé puisse être libéré à partir de la microsphère sur plusieurs semaines comme la doxorubicine et non sur plusieurs jours comme l'irinotécan.

Cette technique de double embolisation reste encore expérimentale et doit être maîtrisée par une meilleure connaissance du processus de vasodilatation réactionnelle des artères bronchiques après occlusion de l'artère pulmonaire (au bout de combien de temps la dilatation est stabilisée ? quel est le diamètre des artères bronchiques ?). Ces informations sont essentielles pour déterminer d'une part l'intervalle de temps nécessaire pour réaliser l'embolisation de l'artère bronchique après la chimioembolisation de l'artère pulmonaire et d'autre part la taille adéquate des microsphères permettant une embolisation la plus distale possible pour obtenir une couverture plus importante du parenchyme par le principe actif.

3.2.2 Chimioembolisation « anti-recanalisation » : Chimioembolisation bronchique par microsphères chargées en sirolimus

Les microsphères préchargées en sirolimus ont permis une libération prolongée du principe actif dans le tissu pulmonaire. La recanalisation des vaisseaux embolisés a été observée uniquement chez les brebis ayant reçu une embolisation bronchique par microsphères non chargées. Le sirolimus semble donc avoir une efficacité dans la prévention de la recanalisation, en inhibant le remodelage vasculaire au niveau des artères bronchiques embolisées. Les concentrations tissulaires en sirolimus quantifiées 12 jours après la chimioembolisation sont élevées (médiane : 27 ng/mL) et correspondent à des concentrations *in vitro* qui inhibent la croissance tumorale sur des lignées cellulaires de CHC (Heuer 2009). Cette inhibition de la croissance tumorale est également observée pour des concentrations en sirolimus beaucoup plus faibles (entre 1 ng/mL et 10 ng/mL) (Heuer 2009 ; Wang 2009).

La dose en sirolimus préchargée (38 mg) dans les microsphères est très élevée par rapport aux doses de sirolimus utilisées en pratique (entre 2 et 8 mg). Les concentrations sanguines sont au dessus de celles recommandées pour un effet thérapeutique immunosuppresseur (EMA).

L'interprétation de nos résultats pharmacocinétique et tissulaire est difficile pour cette étude pilote expérimentale pour laquelle il n'y a pas eu de groupes contrôles (injection IA ou IV de sirolimus seul), ni d'évaluation de la toxicité systémique. Des études *in vitro* pour caractériser ces microsphères préchargées en sirolimus et des études précliniques plus complètes, sur des effectifs plus importants, doivent être réalisées pour définir la dose optimale qui prévient la recanalisation sans toxicité locale ou systémique.

3.3 Microsphères de chimioembolisation chargeables : sont-elles des vecteurs adaptés à la chimioembolisation du poumon ?

3.3.1 Réduction des concentrations systémiques

Nos résultats ont montré que les microsphères de chimioembolisation chargées en irinotécan permettent de diminuer de façon significative les concentrations systémiques en irinotécan après chimioembolisation du poumon, en comparaison à une injection IA d'irinotécan seul. Cette réduction des concentrations systémiques du principe actif après chimioembolisation par microsphères chargées a été également rapportée dans d'autres études (Taylor 2007 ; Hong 2006 ; Rao 2009). Néanmoins, quel que soit le principe actif chargé dans la microsphère (irinotécan ou doxorubicine), on observe au niveau systémique toujours 2 phases : une libération initiale d'une partie du principe actif dès les premières minutes après la chimioembolisation, qui correspond à un pic systémique puis une libération plus progressive du principe actif. Pour l'irinotécan et la doxorubicine, cette libération initiale ne semble pas avoir de conséquences cliniques importantes et causer une toxicité aiguë liée à une concentration trop élevée du principe actif dans la circulation systémique (Varela 2007 ; Martin 2009 ; Martin 2010 ; Lammer 2010). Ce pic systémique reste en dessous des concentrations toxiques (Figure 30). En dehors de ce risque de toxicité, cette libération initiale d'une quantité plus ou moins importante de principe actif au niveau systémique diminue la quantité qui reste dans la microsphère avec pour conséquence une libération au niveau local d'une quantité moins importante et une diminution potentielle de l'efficacité.

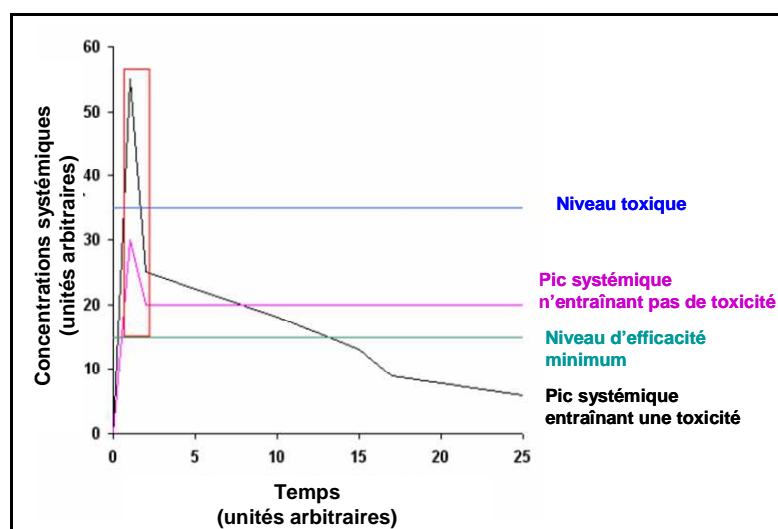


Figure 30- Conséquence d'une libération initiale de principe actif en fonction de la dose libérée

Le pic systémique n'a pas été observé pour le sirolimus et l'ibuprofène (Borovac 2006) qui ont été préchargées dans les microsphères de chimioembolisation. Le mode de préparation et les mécanismes et types de liaisons impliqués dans le chargement du principe actif dans la microsphère sont des paramètres importants à considérer. Nous pensons que le chargement extemporané du principe actif dans les microsphères de chimioembolisation par échange ionique est à l'origine de ce pic systémique. Les interactions ioniques entre la microsphère et le principe actif peuvent être rompues lors de la dilution et la mise en suspension des microsphères avant chimioembolisation libérant dans le surnageant une quantité de principe actif non lié. Cette quantité de principe actif libre injecté en même temps que les microsphères serait à l'origine du pic systémique observé dès les premières minutes après la chimioembolisation.

3.3.2 Concentration et diffusion du principe actif dans le tissu pulmonaire

i. Concentrations dans le tissu pulmonaire

Les microsphères de chimioembolisation permettent d'assurer une imprégnation tissulaire en irinotécan au moins jusqu'à 4 jours après chimioembolisation de l'artère pulmonaire, si celle-ci est combinée à une embolisation ou à une chimioembolisation de l'artère bronchique. Certaines concentrations mesurées dans le tissu correspondent à des concentrations actives en irinotécan sur différentes lignées cellulaires cancéreuses du poumon chez l'homme après un temps d'exposition de 4 jours (IC₅₀ : 205-1761 ng/mL) (van Ark-Otte 1998). Nos concentrations les plus élevées (médiane : 2469 ng/g tissu, min : 1017 ; max : 6372) sont proches de celles obtenues après perfusion *ex vivo* d'un poumon humain pour une même dose d'irinotécan injectée (2500 ng/g tissu) (Biancosino 2007).

Namur et son équipe ont montré, chez l'homme, que ces microsphères chargées en doxorubicine permettaient une libération locale de la doxorubicine sur plusieurs semaines à des concentrations supérieures à celles ayant des effets cytotoxiques sur des cultures d'hépatocytes *in vitro* (Chuu 2007 ; Namur 2011)

Les microsphères de chimioembolisation permettent donc de délivrer au tissu une concentration active du principe actif.

ii. Diffusion dans le tissu pulmonaire

La nécrose observée au niveau de la paroi vasculaire et du parenchyme autour des vaisseaux indique que l'irinotécan diffuse localement dans le tissu. La quantification ayant été réalisée à partir d'homogénats de tissus, il n'a pas été possible de quantifier la zone imprégnée par le principe actif. Namur et son équipe a pu montrer chez l'homme que la libération de doxorubicine couvrait une zone d'un diamètre supérieur à 1,2 mm autour du vaisseau embolisé et induisait une nécrose du parenchyme hépatique autour des microsphères (Namur 2011).

Les microsphères chargeables en irinotécan permettent une diminution des concentrations systémiques et une délivrance d'une concentration élevée en irinotécan dans le tissu pulmonaire. Néanmoins, la libération de l'irinotécan est trop rapide pour permettre une imprégnation durable et efficace d'un lobe pulmonaire. Par comparaison, le profil de libération de la doxorubicine observée au niveau hépatique (libération du principe actif sur plusieurs semaines et diffusion dans le parenchyme) correspondrait davantage au profil de libération recherché pour une imprégnation d'un lobe pulmonaire par chimioembolisation.

3.3.3 Performances de libération : influence du vecteur ou du principe actif ?

Les profils de libération de la doxorubicine et de l'irinotécan ne sont pas très différents d'un type de microsphère à l'autre. En revanche, ils sont très différents en termes de vitesse de libération et de quantité de principe actif libérée pour un même type de microsphère (Gonzalez 2006 ; Taylor 2007 ; Jordan 2010). La libération de la doxorubicine est lente et dure plusieurs semaines (Namur 2010), celle de l'irinotécan est rapide et dure plusieurs jours. La différence dans les profils de libération entre la doxorubicine et l'irinotécan peut s'expliquer en partie par des phénomènes ioniques. Les solutions de chargement de la doxorubicine et de l'irinotécan ont un pH voisin de 3,5. Comme nous l'avons vu précédemment, la doxorubicine existe sous une seule et même forme chargée positivement à pH 3,5 et à pH physiologique, l'irinotécan existe à pH 3,5 sous 2 formes lactones ionisées (l'une ayant deux charges positives, l'autre une charge positive) et à pH physiologique sous

une forme lactone ionisée (une charge positive) et une forme carboxylate zwitterion. Les microsphères chargées négativement vont interagir de façon équivalente à pH 3,5 avec l'irinotécan et la doxorubicine ce qui peut expliquer que les performances de chargement de ces deux principes actifs soient similaires. A pH physiologique, ces microsphères vont libérer plus rapidement l'irinotécan dont la charge positive est devenue plus faible, que la doxorubicine dont la charge positive est stable.

Néanmoins, les phénomènes ioniques ne peuvent pas expliquer à eux seuls cette différence de cinétique de libération de plusieurs semaines à quelques jours entre les deux principes actifs. Plusieurs études ont montré que la doxorubicine avait la capacité à se réarranger et à former des empilements par liaisons hydrogènes à l'intérieur de la microsphère (phénomène de stacking) (Eksborg 1978 ; Menozzi 1984 ; Agrawal 2009). La doxorubicine est alors sous une forme cristalline qui nécessite une solubilisation pour la libérer. Ce phénomène pourrait expliquer sa cinétique de libération sur plusieurs semaines.

Les performances de libération du principe actif à partir des microsphères chargeables dépendent donc davantage du principe actif chargé que de la microsphère en tant que vecteur.

Partie 4

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Notre travail a démontré que les microsphères de chimioembolisation chargeables avaient un avantage par rapport aux injections IA ou IV. En permettant une libération prolongée du principe actif avec une concentration importante dans le tissu pulmonaire et une réduction significative des concentrations systémiques, ces microsphères peuvent être considérées comme des vecteurs de principe actif.

Toutefois, on peut se demander si la délivrance du principe actif au tissu pulmonaire sera assurée de façon contrôlée dans le cas des tumeurs pulmonaires et celui des hémoptysies massives. L'effet recherché sur le tissu cible étant différent pour ces deux applications cliniques.

Dans le cas des tumeurs pulmonaires, on suppose que l'anticancéreux doit être libéré en quantité importante sur un temps suffisamment long pour obtenir une imprégnation durable et étendue à un lobe pulmonaire, à des concentrations antitumorales. Les microsphères de chimioembolisation chargeables en irinotécan ne permettent pas actuellement ce type de libération contrôlée. La libération de l'irinotécan est trop rapide et trop courte pour espérer obtenir une imprégnation efficace d'un lobe pulmonaire. Il faudrait recourir à un mécanisme de libération du principe actif autre que ionique pour permettre une libération contrôlée. Le préchargement de l'irinotécan dans la microsphère pourrait être envisagé. Par ailleurs, l'étude de d'autres principes actifs tels que le cisplatine ou le docétaxel serait probablement plus appropriée que l'irinotécan pour le traitement des tumeurs pulmonaires.

Dans le cas des hémoptysies massives, on suppose que l'inhibiteur du remodelage vasculaire doit être libéré de manière prolongée sur plusieurs mois pour prévenir la recanalisation et à petites doses pour limiter la diffusion du principe actif et permettre une action circonscrite du vaisseau. Les microsphères préchargées en sirolimus semblent permettre une libération contrôlée du principe actif. Ces microsphères prototypes nous paraissent intéressantes pour prévenir la recanalisation. Il reste à définir quelle dose de sirolimus doit être préchargée dans les microsphères pour obtenir des concentrations inhibant le remodelage vasculaire et permettre une libération prolongée sur plusieurs mois du principe actif.

En termes de techniques de chimioembolisation du poumon, nous avons montré que la chimioembolisation de l'artère pulmonaire combinée à une embolisation de l'artère bronchique permettait une meilleure imprégnation du tissu pulmonaire comparée à une chimioembolisation limitée à l'artère pulmonaire seule et à une double chimioembolisation des artères pulmonaire et bronchique. Il reste à déterminer après quel intervalle de temps doit être réalisée l'embolisation de l'artère bronchique après la chimioembolisation de l'artère pulmonaire pour limiter au maximum le déplacement des microsphères lors de la dilatation des artères bronchiques et quelle est la taille optimale des microsphères permettant une embolisation la plus distale possible des artères pulmonaire et bronchique pour obtenir une couverture maximale du parenchyme par le principe actif.

La chimioembolisation de l'artère bronchique dans le cadre du traitement des hémoptysies massives est une technique moins complexe que la double embolisation et pourrait être envisagée chez l'homme à la condition d'avoir des microsphères de chimioembolisation adaptées pour cette indication.

REFERENCES

Abigeres D, Chabot GG, Armand JP, Herait P, Gouyette A, Gandia D. Phase I and pharmacologic studies of the camptothecin analog irinotecan administered every 3 weeks in cancer patients. *J Clin Oncol* 13 (1): 210-21, 1995.

Afssaps, site <http://afssaps-prd.afsspas.fr> Répertoire des spécialités pharmaceutiques RCP Campto[®]. Mise à jour 21/11/2006.

Agrawal P, Barthwal SK, Barthwal R. Studies on self-aggregation of anthracycline drugs by restrained molecular dynamics approach using nuclear magnetic resonance spectroscopy supported by absorption, fluorescence, diffusion ordered spectroscopy and mass spectrometry. *Eur J Med Chem* 44 (4): 1437-51, 2009.

Aliberti C, Benea G, Tilli M, Fiorentini G. Chemoembolization (TACE) of unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma with slow-release doxorubicin-eluting beads: preliminary results. *Cardiovasc Intervent Radiol* 31 (5): 883-8, 2008.

Aliberti C, Tilli M, Benea G, Fiorentini G. Trans-arterial chemoembolization (TACE) of liver metastases from colorectal cancer using irinotecan-eluting beads: preliminary results. *Anticancer Res* 26 (5B): 3793-5, 2006.

Aoki T, Imamura H, Hasegawa K, Matsukura A, Sano K, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Sequential preoperative arterial and portal venous embolizations in patients with hepatocellular carcinoma. *Arch Surg* 139 (7): 766-74, 2004

Aubier M, Marthan R, Berger P, Chambellan A, Chanez P, Aguilaniu B, Brillet PY, Burgel PR, Chaouat A, Devillier P, Escamilla R, Louis R, Mal H, Muir JF, Perez T, Similowski T, Wallaert B, Roche N. [COPD and inflammation: statement from a French expert group: inflammation and remodelling mechanisms]. *Rev Mal Respir* 27 (10): 1254-66, 2010.

Baltes S, Freund I, Lewis AL, Nolte I, Brinker T. Doxorubicin and irinotecan drug-eluting beads for treatment of glioma: a pilot study in a rat model. *J Mater Sci Mater Med* 21 (4): 1393-402, 2010.

Bansal T, Awasthi A, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Development and validation of reversed phase liquid chromatographic method utilizing ultraviolet detection for quantification of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite, SN-38, in rat plasma and bile samples: application to pharmacokinetic studies. *Talanta* 76 (5): 1015-21, 2008.

Bastian P, Bartkowski R, Kohler H, Kissel T. Chemo-embolization of experimental liver metastases. Part I: distribution of biodegradable microspheres of different sizes in an animal model for the locoregional therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 46 (3): 243-54, 1998.

- Beaujeux R, Laurent A, Wassef M, Casasco A, Gobin YP, Aymard A, Rufenacht D, Merland JJ. Trisacryl gelatin microspheres for therapeutic embolization, II: preliminary clinical evaluation in tumors and arteriovenous malformations. *AJNR Am J Neuroradiol* 17 (3): 541-8, 1996.
- Biancosino C, Albert M, Linder A. Acute toxicity of irinotecan in the ex-vivo isolated perfused human lung model--high-dose therapy during isolated perfusion without acute toxic lung edema. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 6 (5): 583-7, 2007.
- Biocompatibles, site: www.biocompatibles.com. Products DC Bead[®] consultation 20/07/2011
- Biondi M, Fusco S, Lewis AL, Netti PA. New Insights into the Mechanisms of the Interactions Between Doxorubicin and the Ion-Exchange Hydrogel DC Bead for Use in Transarterial Chemoembolization (TACE). *J Biomater Sci Polym Ed*, 2011.
- Biosphere Medical, site: www.biospheremed.com. Products Hepaspheres consultation 1/08/2011
- Boffa DJ, Luan F, Thomas D, Yang H, Sharma VK, Lagman M, Suthanthiran M. Rapamycin inhibits the growth and metastatic progression of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10 (1 Pt 1): 293-300, 2004.
- Borovac T, Pelage JP, Kasselouri A, Prognon P, Guiffant G, Laurent A. Release of ibuprofen from beads for embolization: in vitro and in vivo studies. *J Control Release* 115 (3): 266-74, 2006.
- Buerke M, Guckenbiehl M, Schwertz H, Buerke U, Hilker M, Platsch H, Richert J, Bomm S, Zimmerman GA, Lindemann S, Mueller-Werdan U, Werdan K, Darius H, Weyrich AS. Intramural delivery of Sirolimus prevents vascular remodeling following balloon injury. *Biochim Biophys Acta* 1774 (1): 5-15, 2007.
- Burgess JK. The role of the extracellular matrix and specific growth factors in the regulation of inflammation and remodelling in asthma. *Pharmacol Ther* 122 (1): 19-29, 2009.
- Camma C, Schepis F, Orlando A, Albanese M, Shahied L, Trevisani F, Andreone P, Craxi A, Cottone M. Transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: meta-analysis of randomized controlled trials. *Radiology* 224 (1): 47-54, 2002.
- Canadian Association of Radiologists, site: www.radiologyinfo.ca consultation 21/01/2010
- Carette MF, Khalil A, Parrot A. Hemoptysies: principales étiologies et conduite à tenir. *EMC-Pneumologie* 2004; 1: 99-128.
- Carlini LE, Meropol NJ, Bever J, Andria ML, Hill T, Gold P, Rogatko A, Wang H, Blanchard RL. UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan. *Clin Cancer Res* 11 (3): 1226-36, 2005.
- Cay O, Kruskal J, Thomas P, Clouse ME. Targeting of different ethiodized oil-doxorubicin mixtures to hypovascular hepatic metastases with intraarterial and intraportal injections. *J Vasc Interv Radiol* 7 (3): 409-17, 1996.

Charan NB, Carvalho P. Angiogenesis in bronchial circulatory system after unilateral pulmonary artery obstruction. *J Appl Physiol* 82 (1): 284-91, 1997.

Chemicalize, site: www.chemicalize.org. Irinotecan, Sirolimus. Consultation 5/07/2011

Chen Y, Burton MA, Codde JP, Napoli S, Martins IJ, Gray BN. Evaluation of ion-exchange microspheres as carriers for the anticancer drug doxorubicin: in-vitro studies. *J Pharm Pharmacol* 44 (3): 211-5, 1992.

Chetta A, Zanini A, Torre O, Olivieri D. Vascular remodelling and angiogenesis in asthma: morphological aspects and pharmacological modulation. *Inflamm Allergy Drug Targets* 6 (1): 41-5, 2007.

Chollet DF, Goumaz L, Renard A, Montay G, Vernillet L, Arnera V, Mazzo DJ. Simultaneous determination of the lactone and carboxylate forms of the camptothecin derivative CPT-11 and its metabolite SN-38 in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 718 (1): 163-75, 1998.

Chuu JJ, Liu JM, Tsou MH, Huang CL, Chen CP, Wang HS, Chen CT. Effects of paclitaxel and doxorubicin in histocultures of hepatocellular carcinomas. *J Biomed Sci* 14 (2): 233-44, 2007.

Crocco JA, Rooney JJ, Fankushen DS, DiBenedetto RJ, Lyons HA. Massive hemoptysis. *Arch Intern Med* 121 (6): 495-8, 1968.

Czauderna P, Zbrzezniak G, Narozanski W, Sznurkowska K, Skoczylas-Stoba B, Stoba C. Pulmonary embolism: a fatal complication of arterial chemoembolization for advanced hepatocellular carcinoma. *J Pediatr Surg* 40 (10): 1647-50, 2005.

Danks MK, Morton CL, Krull EJ, Cheshire PJ, Richmond LB, Naeve CW, Pawlik CA, Houghton PJ, Potter PM. Comparison of activation of CPT-11 by rabbit and human carboxylesterases for use in enzyme/prodrug therapy. *Clin Cancer Res* 5 (4): 917-24, 1999.

de Baere T. DC beads loaded with irinotecan: preclinical *in vitro* and *in vivo* evaluation. Global Embolization Symposium and Technologies (GEST), Paris, France, 15-18 April 2009.

de Baere T, Deschamps F, Teriitheau C, Rao P, Conengrapt K, Schlumberger M, Leboulleux S, Baudin E, Hechellhammer L. Transarterial chemoembolization of liver metastases from well differentiated gastroenteropancreatic endocrine tumors with doxorubicin-eluting beads: preliminary results. *J Vasc Interv Radiol* 19 (6): 855-61, 2008.

de Baere T, Zhang X, Aubert B, Harry G, Lagrange C, Ropers J, Dufaux J, Lumbroso J, Rougier P, Ducreux M, Roche A. Quantification of tumor uptake of iodized oils and emulsions of iodized oils: experimental study. *Radiology* 201 (3): 731-5, 1996.

de Baere T, Dufaux J, Roche A, Counnord JL, Berthault MF, Denys A, Pappas P. Circulatory alterations induced by intra-arterial injection of iodized oil and emulsions of iodized oil and doxorubicin: experimental study. *Radiology* 194 (1): 165-70, 1995.

- de Bruijn P, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 698 (1-2): 277-85, 1997.
- de Forni M, Bugat R, Chabot GG, Culine S, Extra JM, Gouyette A, Madelaine I, Marty ME, Mathieu-Boue A. Phase I and pharmacokinetic study of the camptothecin derivative irinotecan, administered on a weekly schedule in cancer patients. *Cancer Res* 54 (16): 4347-54, 1994.
- de Gregorio MA, Medrano J, Mainar A, Alfonso ER, Rengel M. [Endovascular treatment of massive hemoptysis by bronchial artery embolization: short-term and long-term follow-up over a 15-year period]. *Arch Bronconeumol* 42 (2): 49-56, 2006.
- Dhanasekaran R, Kooby DA, Staley CA, Kauh JS, Khanna V, Kim HS. Comparison of conventional transarterial chemoembolization (TACE) and chemoembolization with doxorubicin drug eluting beads (DEB) for unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). *J Surg Oncol* 101 (6): 476-80, 2010.
- Dweik RA, Stoller JK. Role of bronchoscopy in massive hemoptysis. *Clin Chest Med* 20 (1): 89-105, 1999.
- Eddahibi S, D'Ortho MP, Adnot S. Physiopathologie du remaniement vasculaire pulmonaire au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire. *Réanimation* 12(2) :91-101, 2003.
- Ekholm S, Albrechtsson U, Tylen U. Bronchial artery infusion of mitomycin C in carcinoma of the lung. *Cardiovasc Intervent Radiol* 6 (2): 86-96, 1983.
- Eksborg S. Extraction of daunorubicin and doxorubicin and their hydroxyl metabolites: self-association in aqueous solution. *J Pharm Sci* 67 (6): 782-5, 1978.
- EMA, site: www.ema.europa.eu Product information Rapamune (Sirolimus) mise à jour 3/02/2011. consultation 11/06/2011.
- Eyol E, Boleij A, Taylor RR, Lewis AL, Berger MR. Chemoembolisation of rat colorectal liver metastases with drug eluting beads loaded with irinotecan or doxorubicin. *Clin Exp Metastasis* 25 (3): 273-82, 2008.
- Fadel E, Wijtenburg E, Michel R, Mazoit JX, Bernatchez R, Decante B, Sage E, Mazmanian M, Herve P. Regression of the systemic vasculature to the lung after removal of pulmonary artery obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 173 (3): 345-9, 2006.
- Fassberg J, Stella VJ. A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogues. *J Pharm Sci* 81 (7): 676-84, 1992.
- Fiorentini G, Aliberti C, Turrisi G, Del Conte A, Rossi S, Benea G, Giovanis P. Intraarterial hepatic chemoembolization of liver metastases from colorectal cancer adopting irinotecan-eluting beads: results of a phase II clinical study. *In Vivo* 21 (6): 1085-91, 2007.

- Fisher MB, Vandenbranden M, Findlay K, Burchell B, Thummel KE, Hall SD, Wrighton SA. Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank. *Pharmacogenetics* 10 (8): 727-39, 2000.
- Forster RE, Small SA, Tang Y, Heaysman CL, Lloyd AW, Macfarlane W, Phillips GJ, Antonijevic MD, Lewis AL. Comparison of DC Bead-irinotecan and DC Bead-topotecan drug eluting beads for use in locoregional drug delivery to treat pancreatic cancer. *J Mater Sci Mater Med* 21 (9): 2683-90, 2010.
- Fukuda M, Oka M, Soda H, Kinoshita A, Fukuda M, Nagashima S, Kuba M, Takatani H, Tsurutani J, Nakamura Y, Kasai T, Inoue Y, Soejima Y, Kohno S. Phase II study of irinotecan combined with carboplatin in previously untreated non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 54 (6): 573-7, 2004.
- Garnier LF. [Angiotensin converting enzyme inhibitors and vascular remodelling in arterial hypertension]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 42 (8): 438-44, 1993.
- Gaur SK, Friese JL, Sadow CA, Ayyagari R, Binkert CA, Schenker MP, Kulke M, Baum R. Hepatic arterial chemoembolization using drug-eluting beads in gastrointestinal neuroendocrine tumor metastatic to the liver. *Cardiovasc Intervent Radiol* 34 (3): 566-72, 2011.
- Gerweck LE, Vijayappa S, Kozin S. Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther* 5 (5): 1275-9, 2006.
- Goldberg JA, Kerr DJ, Blackie R, Whately TL, Pettit L, Kato T, McArdle CS. Mitomycin C-loaded microcapsules in the treatment of colorectal liver metastases. Pharmacokinetics of regionally administered particulate chemotherapy. *Cancer* 67 (4): 952-5, 1991.
- Gonzalez MV, Tang Y, Phillips GJ, Lloyd AW, Hall B, Stratford PW, Lewis AL. Doxorubicin eluting beads-2: methods for evaluating drug elution and in-vitro:in-vivo correlation. *J Mater Sci Mater Med* 19 (2): 767-75, 2008.
- Grosso M, Vignali C, Quaretti P, Nicolini A, Melchiorre F, Gallarato G, Bargellini I, Petruzzi P, Massa Saluzzo C, Crespi S, Sarti I. Transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma with drug-eluting microspheres: preliminary results from an Italian multicentre study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 31 (6): 1141-9, 2008.
- Haaz MC, Rivory LP, Riche C, Robert J. The transformation of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite SN-38 by human liver microsomes. Differential hydrolysis for the lactone and carboxylate forms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356 (2): 257-62, 1997.
- Han JY, Lim HS, Park YH, Lee SY, Lee JS. Integrated pharmacogenetic prediction of irinotecan pharmacokinetics and toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 63 (1): 115-20, 2009.
- Hendriks JM, Van Schil PE. Isolated lung perfusion for the treatment of pulmonary metastases. *Surg Oncol* 7 (1-2): 59-63, 1998.

Heuer M, Benko T, Cicinnati VR, Kaiser GM, Sotiropoulos GC, Baba HA, Treckmann JW, Broelsch CE, Paul A. Effect of low-dose rapamycin on tumor growth in two human hepatocellular cancer cell lines. *Transplant Proc* 41 (1): 359-65, 2009.

Hong K, Khwaja A, Liapi E, Torbenson MS, Georgiades CS, Geschwind JF. New intra-arterial drug delivery system for the treatment of liver cancer: preclinical assessment in a rabbit model of liver cancer. *Clin Cancer Res* 12 (8): 2563-7, 2006.

Hong K, Kobeiter H, Georgiades CS, Torbenson MS, Geschwind JF. Effects of the type of embolization particles on carboplatin concentration in liver tumors after transcatheter arterial chemoembolization in a rabbit model of liver cancer. *J Vasc Interv Radiol* 16 (12): 1711-7, 2005.

Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, Karrison T, Janisch L, Ramirez J, Rudin CM, Vokes EE, Ratain MJ. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 22 (8): 1382-8, 2004.

Ishimori S, Hattori M, Shibata Y, Shizawa H, Fujinaga R. Treatment of carotid-cavernous fistula by gelfoam embolization. *J Neurosurg* 27 (4): 315-9, 1967.

Jaxel C, Kohn KW, Wani MC, Wall ME, Pommier Y. Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity. *Cancer Res* 49 (6): 1465-9, 1989.

Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 92 (1): 1-20, 2001.

Jenke DR. Drug delivery via ion exchange across a fiber membrane. *Pharm Res* 6 (1): 96-9, 1989.

Johnston MR, Minchen RF, Dawson CA. Lung perfusion with chemotherapy in patients with unresectable metastatic sarcoma to the lung or diffuse bronchioloalveolar carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (2): 368-73, 1995.

Jordan O, Denys A, De Baere T, Boulens N, Doelker E. Comparative study of chemoembolization loadable beads: in vitro drug release and physical properties of DC bead and hepasphere loaded with doxorubicin and irinotecan. *J Vasc Interv Radiol* 21 (7): 1084-90, 2010.

Kahan BD. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 356 (9225): 194-202, 2000.

Kan Z, Wright K, Wallace S. Ethiodized oil emulsions in hepatic microcirculation: in vivo microscopy in animal models. *Acad Radiol* 4 (4): 275-82, 1997.

- Kaneda N, Hosokawa Y, Yokokura T. Simultaneous determination of the lactone and carboxylate forms of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), the active metabolite of irinotecan (CPT-11), in rat plasma by high performance liquid chromatography. *Biol Pharm Bull* 20 (7): 815-9, 1997.
- Katagiri Y, Mabuchi K, Itakura T, Naora K, Iwamoto K, Nozu Y, Hirai S, Ikeda N, Kawai T. Adriamycin-lipiodol suspension for i.a. chemotherapy of hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 23 (4): 238-42, 1989.
- Kato T, Sato K, Sasaki R, Kakinuma H, Moriyama M. Targeted cancer chemotherapy with arterial microcapsule chemoembolization: review of 1013 patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 37 (4): 289-96, 1996.
- Kato T, Nemoto R, Mori H, Takahashi M, Tamakawa Y, Harada M. Arterial chemoembolization with microencapsulated anticancer drug. An approach to selective cancer chemotherapy with sustained effects. *Jama* 245 (11): 1123-7, 1981 a.
- Kato T, Nemoto R, Mori H, Takahashi M, Tamakawa Y. Transcatheter arterial chemoembolization of renal cell carcinoma with microencapsulated mitomycin C. *J Urol* 125 (1): 19-24, 1981 b.
- Kato T, Nemoto R, Mori H, Kumagai I. Sustained-release properties of microencapsulated mitomycin C with ethylcellulose infused into the renal artery of the dog. *Cancer* 46 (1): 14-21, 1980.
- Katoh O, Kishikawa T, Yamada H, Matsumoto S, Kudo S. Recurrent bleeding after arterial embolization in patients with hemoptysis. *Chest* 97 (3): 541-6, 1990.
- Keller FS, Rosch J, Loflin TG, Nath PH, McElvein RB. Nonbronchial systemic collateral arteries: significance in percutaneous embolotherapy for hemoptysis. *Radiology* 164 (3): 687-92, 1987.
- Keogh A, Richardson M, Ruygrok P, Spratt P, Galbraith A, O'Driscoll G, Macdonald P, Esmore D, Muller D, Faddy S. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years: a randomized clinical trial. *Circulation* 110 (17): 2694-700, 2004.
- Kim YS, Park SH, Kyung SY, Sym SJ, Lee SP, Park JW, Jung SH, Park J, Cho EK, Lee JH, Shin DB. Irinotecan plus carboplatin in patients with extensive-disease small-cell lung cancer. *Med Oncol* 28(1): 342-50, 2010.
- Koizumi T, Kubo K, Hanaoka M, Miyahara T, Kaneki T, Yamamoto H, Ge RL, Fujimoto K, Kobayashi T, Sekiguchi M. Pharmacokinetic characteristics of the novel anticancer agent CPT-11 and its active metabolite in plasma and lung lymph fluid following intravenous administration to sheep. *Arzneimittelforschung* 48 (11): 1097-100, 1998.
- Kokudo N, Makuuchi M. Current role of portal vein embolization/hepatic artery chemoembolization. *Surg Clin North Am* 84 (2): 643-57, 2004.

- Konno T. Targeting cancer chemotherapeutic agents by use of lipiodol contrast medium. *Cancer* 66 (9): 1897-903, 1990.
- Koster RA, Dijkers EC, Uges DR. Robust, high-throughput LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, everolimus, and sirolimus in whole blood. *Ther Drug Monit* 31 (1): 116-25, 2009.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Fezoulidis I. Cancer vascularization: implications in radiotherapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48 (2): 545-53, 2000.
- Kreuter J, "Nanoparticles" in: *Colloidal Drug Delivery Systems*, Kreuter J, Ed., Marcel Dekker, New York 1994, p219-343.
- Kudoh S, Fukuoka M, Masuda N, Yoshikawa A, Kusunoki Y, Matsui K, Negoro S, Takifuji N, Nakagawa K, Hirashima T, et al. Relationship between the pharmacokinetics of irinotecan and diarrhea during combination chemotherapy with cisplatin. *Jpn J Cancer Res* 86 (4): 406-13, 1995.
- Kweekel D, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Clinical and pharmacogenetic factors associated with irinotecan toxicity. *Cancer Treat Rev* 34 (7): 656-69, 2008.
- Lammer J, Malagari K, Vogl T, Pilleul F, Denys A, Watkinson A, Pitton M, Sergent G, Pfammatter T, Terraz S, Benhamou Y, Avajon Y, Gruenberger T, Pomoni M, Langenberger H, Schuchmann M, Dumortier J, Mueller C, Chevallier P, Lencioni R. Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 33 (1): 41-52, 2010.
- Laurent A, Wassef M, Namur J, Martal J, Labarre D, Pelage JP. Recanalization and particle exclusion after embolization of uterine arteries in sheep: a long-term study. *Fertil Steril* 91 (3): 884-92, 2009.
- Laurent A, Velzenberger E, Wassef M, Pelage JP, Lewis AL. Do microspheres with narrow or standard size distributions localize differently in vasculature? An experimental study in sheep kidney and uterus. *J Vasc Interv Radiol* 19 (12): 1733-9, 2008.
- Laurent A. Radiodiagnostic - Principes et techniques d'imagerie - Agents d'embolisation. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) 35-140-A-20: 1-10, 2006.
- Laurent A, Wassef M, Chapot R, Houdart E, Merland JJ. Location of vessel occlusion of calibrated tris-acryl gelatin microspheres for tumor and arteriovenous malformation embolization. *J Vasc Interv Radiol* 15 (5): 491-6, 2004.
- Laurent A, Beaujeux R, Wassef M, Rufenacht D, Boschetti E, Merland JJ. Trisacryl gelatin microspheres for therapeutic embolization, I: development and in vitro evaluation. *AJNR Am J Neuroradiol* 17 (3): 533-40, 1996.
- Lee JK, Chung YH, Song BC, Shin JW, Choi WB, Yang SH, Yoon HK, Sung KB, Lee YS, Suh DJ. Recurrences of hepatocellular carcinoma following initial remission by transcatheter arterial chemoembolization. *J Gastroenterol Hepatol* 17 (1): 52-8, 2002.

- Lencioni R, Crocetti L, Petruzzi P, Vignali C, Bozzi E, Della Pina C, Bargellini I, Cioni D, Oliveri F, De Simone P, Bartolozzi C, Brunetto M, Filipponi F. Doxorubicin-eluting bead-enhanced radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: a pilot clinical study. *J Hepatol* 49 (2): 217-22, 2008.
- Levy M, Maurey C, Danel C, Puyo P, Bonnette P, Israel-Biet D. Remodelage vasculaire pulmonaire et dysfonction endothéliale dans la mucoviscidose. *Revue des Maladies Respiratoires* 22(5): 903, 2005.
- Lewis AL. Drug-device combination products. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, VII p154-189, 2010.
- Lewis AL, Gonzalez MV, Leppard SW, Brown JE, Stratford PW, Phillips GJ, Lloyd AW. Doxorubicin eluting beads - 1: effects of drug loading on bead characteristics and drug distribution. *J Mater Sci Mater Med* 18 (9): 1691-9, 2007.
- Lewis AL, Gonzalez MV, Lloyd AW, Hall B, Tang Y, Willis SL, Leppard SW, Wolfenden LC, Palmer RR, Stratford PW. DC bead: in vitro characterization of a drug-delivery device for transarterial chemoembolization. *J Vasc Interv Radiol* 17 (2 Pt 1): 335-42, 2006.
- Li B, Sedlacek M, Manoharan I, Boopathy R, Duysen EG, Masson P, Lockridge O. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem Pharmacol* 70 (11): 1673-84, 2005.
- Liebow AA, Hales MR, Harrison W, Bloomer W, Lindskog GE. The genesis and functional implications of collateral circulation of the lungs. *Yale J Biol Med* 22 (6): 637-50, 1950.
- Liu DM, Kos S, Buczkowski A, Kee S, Munk PL, Klass D, Wasan E. Optimization of Doxorubicin Loading for Superabsorbent Polymer Microspheres: in vitro Analysis. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2011.
- Liu Z, Wu XY, Bendayan R. In vitro investigation of ionic polysaccharide microspheres for simultaneous delivery of chemosensitizer and antineoplastic agent to multidrug-resistant cells. *J Pharm Sci* 88 (4): 412-8, 1999.
- Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 37 (2): 429-42, 2003.
- Llovet JM, Real MI, Montana X, Planas R, Coll S, Aponte J, Ayuso C, Sala M, Muchart J, Sola R, Rodes J, Bruix J. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 359 (9319): 1734-9, 2002.
- Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, Fan ST, Wong J. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35 (5): 1164-71, 2002.

- Lyer L, King CD, Whittington PF, Green MD, Roy SK, Tephly TR, Coffman BL, Ratain MJ. Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J Clin Invest* 101 (4): 847-54, 1998.
- Maeda N, Osuga K, Higashihara H, Mikami K, Tomoda K, Hori S, Nakazawa T, Nakamura H. In vitro characterization of cisplatin-loaded superabsorbent polymer microspheres designed for chemoembolization. *J Vasc Interv Radiol* 21 (6): 877-81, 2010.
- Mahoney BP, Raghunand N, Baggett B, Gillies RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochem Pharmacol* 66 (7): 1207-18, 2003.
- Mal H, Rullon I, Mellot F, Brugiere O, Sleiman C, Menu Y, Fournier M. Immediate and long-term results of bronchial artery embolization for life-threatening hemoptysis. *Chest* 115 (4): 996-1001, 1999.
- Malagari K, Chatzimichael K, Alexopoulou E, Kelekis A, Hall B, Dourakis S, Delis S, Gouliamos A, Kelekis D. Transarterial chemoembolization of unresectable hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: results of an open-label study of 62 patients. *Cardiovasc Intervent Radiol* 31 (2): 269-80, 2008.
- Martin RC, Howard J, Tomalty D, Robbins K, Padr R, Bosnjakovic PM, Tatum C. Toxicity of irinotecan-eluting beads in the treatment of hepatic malignancies: results of a multi-institutional registry. *Cardiovasc Intervent Radiol* 33 (5): 960-6, 2010.
- Martin RC, Joshi J, Robbins K, Tomalty D, O'Hara R, Tatum C. Transarterial Chemoembolization of Metastatic Colorectal Carcinoma with Drug-Eluting Beads, Irinotecan (DEBIRI): Multi-Institutional Registry. *J Oncol* 2009: 539795, 2009.
- Masuda N, Fukuoka M. Irinotecan in the treatment of small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 1 (2): 187-95, 2001.
- Masuda N, Fukuoka M, Kusunoki Y, Matsui K, Takifuji N, Kudoh S, Negoro S, Nishioka M, Nakagawa K, Takada M. CPT-11: a new derivative of camptothecin for the treatment of refractory or relapsed small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 10 (8): 1225-9, 1992.
- Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 7 (8): 2182-94, 2001.
- Menozzi M, Valentini L, Vannini E, Arcamone F. Self-association of doxorubicin and related compounds in aqueous solution. *J Pharm Sci* 73 (6): 766-70, 1984.
- Milne EN, Zerhouni EA. Blood supply of pulmonary metastases. *J Thorac Imaging* 2 (4): 15-23, 1987.
- Milne EN. Pulmonary metastases: vascular supply and diagnosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1 (7-8): 739-42, 1976.

- Minutello RM, Bhagan S, Feldman D, Sharma A, Hong MK, Wong SC. Angiographic pattern of restenosis following implantation of overlapping sirolimus-eluting (Cypher) stents. *Am J Cardiol* 97 (4): 499-501, 2006.
- Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther* 2 (4 Suppl 1): S169-77, 2003.
- Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 346 (23): 1773-80, 2002.
- Morin-Brureau M, Lebrun A, Rousset MC, Fagni L, Bockaert J, de Bock F, Lerner-Natoli M. Epileptiform activity induces vascular remodeling and zonula occludens 1 downregulation in organotypic hippocampal cultures: role of VEGF signaling pathways. *J Neurosci* 31 (29): 10677-88, 2011.
- Morton CL, Wadkins RM, Danks MK, Potter PM. The anticancer prodrug CPT-11 is a potent inhibitor of acetylcholinesterase but is rapidly catalyzed to SN-38 by butyrylcholinesterase. *Cancer Res* 59 (7): 1458-63, 1999.
- Murdter TE, Sperker B, Kivisto KT, McClellan M, Fritz P, Friedel G, Linder A, Bosslet K, Toomes H, Dierkesmann R, Kroemer HK. Enhanced uptake of doxorubicin into bronchial carcinoma: beta-glucuronidase mediates release of doxorubicin from a glucuronide prodrug (HMR 1826) at the tumor site. *Cancer Res* 57 (12): 2440-5, 1997.
- Murphy GJ, Bicknell GR, Nicholson ML. Rapamycin inhibits vascular remodeling in an experimental model of allograft vasculopathy and attenuates associated changes in fibrosis-associated gene expression. *J Heart Lung Transplant* 22 (5): 533-41, 2003.
- Naka N, Kawahara M, Okishio K, Hosoe S, Ogawara M, Atagi S, Takemoto Y, Ueno K, Kawaguchi T, Tsuchiyama T, Furuse K. Phase II study of weekly irinotecan and carboplatin for refractory or relapsed small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 37 (3): 319-23, 2002.
- Nakakuma K, Tashiro S, Hiraoka T, Ogata K, Ootsuka K. Hepatocellular carcinoma and metastatic cancer detected by iodized oil. *Radiology* 154 (1): 15-7, 1985.
- Nakamura H, Hashimoto T, Oi H, Sawada S. Transcatheter oily chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *Radiology* 170 (3 Pt 1): 783-6, 1989.
- Nakao N, Miura K, Takahashi H, Ohnishi M, Miura T, Okamoto E, Ishikawa Y. Hepatocellular carcinoma: combined hepatic, arterial, and portal venous embolization. *Radiology* 161 (2): 303-7, 1986.
- Namur J, Citron SJ, Sellers MT, Dupuis MH, Wassef M, Manfait M, Laurent A. Embolization of hepatocellular carcinoma with drug-eluting beads: doxorubicin tissue concentration and distribution in patient liver explants. *J Hepatol* (Epub ahead of print) 2011.

Namur J, Wassef M, Millot JM, Lewis AL, Manfait M, Laurent A. Drug-eluting beads for liver embolization: concentration of doxorubicin in tissue and in beads in a pig model. *J Vasc Interv Radiol* 21 (2): 259-67, 2010.

Namur Julien. Microsphères d'embolisation pour la vectorisation de principes actifs: Etude de la libération *in vivo* par microspectroscopies optiques, 255p. Thèse de Doctorat (mention: ingénierie de la Santé, spécialité Biophysique): Reims: 2009 a.

Namur J, D'Inca H, Lewis AL, Manfait M, Laurent A. Interaction, distribution and concentration of the two drugs doxorubicin or irinotecan in drug eluting beads. 34th Annual Meeting of the Society of Interventional Radiology, San Diego, CA, USA, 7-12 March 2009 b.

Noda K, Nishiwaki Y, Kawahara M, Negoro S, Sugiura T, Yokoyama A, Fukuoka M, Mori K, Watanabe K, Tamura T, Yamamoto S, Saijo N. Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 346 (2): 85-91, 2002.

Ogata S, Belghiti J, Farges O, Varma D, Sibert A, Vilgrain V. Sequential arterial and portal vein embolizations before right hepatectomy in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 93 (9): 1091-8, 2006.

Ohishi H, Uchida H, Yoshimura H, Ohue S, Ueda J, Katsuragi M, Matsuo N, Hosogi Y. Hepatocellular carcinoma detected by iodized oil. Use of anticancer agents. *Radiology* 154 (1): 25-9, 1985.

Okamoto Y, Konno A, Togawa K, Kato T, Tamakawa Y, Amano Y. Arterial chemoembolization with cisplatin microcapsules. *Br J Cancer* 53 (3): 369-75, 1986.

Okamoto Y, Konno A, Togawa K, Kato T, Amano Y. Microcapsule chemoembolization for head and neck cancer. *Arch Otorhinolaryngol* 242 (1): 105-11, 1985.

Osaki T, Hanagiri T, Nakanishi R, Yoshino I, Taga S, Yasumoto K. Bronchial arterial infusion is an effective therapeutic modality for centrally located early-stage lung cancer: results of a pilot study. *Chest* 115 (5): 1424-8, 1999.

Owens TS, Dodds H, Fricke K, Hanna SK, Crews KR. High-performance liquid chromatographic assay with fluorescence detection for the simultaneous measurement of carboxylate and lactone forms of irinotecan and three metabolites in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 788 (1): 65-74, 2003.

Pal SK, Figlin RA, Reckamp KL. The role of targeting mammalian target of rapamycin in lung cancer. *Clin Lung Cancer* 9 (6): 340-5, 2008.

Pelage JP, Laurent A, Wassef M, Bonneau M, Germain D, Rymer R, Flaud P, Martal J, Merland JJ. Uterine artery embolization in sheep: comparison of acute effects with polyvinyl alcohol particles and calibrated microspheres. *Radiology* 224 (2): 436-45, 2002.

- Pelage JP, Laurent A, Bonneau M, Wassef M, Rymer R, Merland JJ. Arterial blood supply to the uterus in nonpregnant sheep: a pertinent model for clinical practice? *Invest Radiol* 36 (12): 721-5, 2001.
- Perring S, Hind R, Fleming J, Birch S, Batty V, Taylor I. Dosimetric assessment of radiolabelled lipiodol as a potential therapeutic agent in colorectal liver metastases using combined CT and SPECT. *Nucl Med Commun* 15 (1): 34-8, 1994.
- Pizzolato JF, Saltz LB. The camptothecins. *Lancet* 361 (9376): 2235-42, 2003.
- Pohlen U, Rieger H, Meyer BT, Loddenkemper C, Buhr HJ, Heitland P, Koester HD, Schneider P. Chemoembolization of lung metastases--pharmacokinetic behaviour of carboplatin in a rat model. *Anticancer Res* 27 (2): 809-15, 2007.
- Poon RT, Tso WK, Pang RW, Ng KK, Woo R, Tai KS, Fan ST. A phase I/II trial of chemoembolization for hepatocellular carcinoma using a novel intra-arterial drug-eluting bead. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5 (9): 1100-8, 2007.
- Poyanli A, Rozanes I, Acunas B, Sencer S. Palliative treatment of hepatocellular carcinoma by chemoembolization. *Acta Radiol* 42 (6): 602-7, 2001.
- Ramakantan R, Bandekar VG, Gandhi MS, Aulakh BG, Deshmukh HL. Massive hemoptysis due to pulmonary tuberculosis: control with bronchial artery embolization. *Radiology* 200 (3): 691-4, 1996.
- Rao P, Pascale F, Seck A, Teritheau C, Dechamps F, Namur J, Paci A, Willis AL, De Baere T. Evaluation of modes of irinotecan administration in a rabbit Vx-2 tumour model: early pharmacokinetics and tumour reponse. 25th Annual Meeting of the Cardiovascular and Interventional Society of Europe, Lisbon, Portugal, 19-23 September 2009.
- Raoul JL, Heresbach D, Bretagne JF, Ferrer DB, Duvauferrier R, Bourguet P, Messner M, Gosselin M. Chemoembolization of hepatocellular carcinomas. A study of the biodistribution and pharmacokinetics of doxorubicin. *Cancer* 70 (3): 585-90, 1992.
- Raoul JL, Bourguet P, Bretagne JF, Duvauferrier R, Coornaert S, Darnault P, Ramee A, Herry JY, Gastard J. Hepatic artery injection of I-131-labeled lipiodol. Part I. Biodistribution study results in patients with hepatocellular carcinoma and liver metastases. *Radiology* 168 (2): 541-5, 1988.
- Ratto GB, Toma S, Civalleri D, Passerone GC, Esposito M, Zaccheo D, Canepa M, Romano P, Palumbo R, De Cian F, Scarano F, Vannozzi M, Spessa E, Fantino G. Isolated lung perfusion with platinum in the treatment of pulmonary metastases from soft tissue sarcomas. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112 (3): 614-22, 1996.
- Remy J, Arnaud A, Fardou H, Giraud R, Voisin C. Treatment of hemoptysis by embolization of bronchial arteries. *Radiology* 122 (1): 33-7, 1977.
- Remy J, Voisin C, Ribet M, Dupuis C, Beguery P, Tonnel AB, Douay B, Pagniez B, Denies JL. [Treatment, by embolization, of severe or repeated hemoptysis associated with systemic hypervascularization]. *Nouv Presse Med* 2 (31): 2060, 1973.

Respir, site: www.respir.com. Base documentaire et formation en pneumologie. Consultation 16/12/2009.

Rivory LP, Robert J. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous quantitation of the carboxylate and lactone forms of the camptothecin derivative irinotecan, CPT-11, and its metabolite SN-38 in plasma. *J Chromatogr B Biomed Appl* 661 (1): 133-41, 1994.

Rouits E, Charasson V, Petain A, Boisdron-Celle M, Delord JP, Fonck M, Laurand A, Poirier AL, Morel A, Chatelut E, Robert J, Gamelin E. Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 99 (8): 1239-45, 2008.

Rowinsky EK, Grochow LB, Ettinger DS, Sartorius SE, Lubejko BG, Chen TL, Rock MK, Donehower RC. Phase I and pharmacological study of the novel topoisomerase I inhibitor 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin (CPT-11) administered as a ninety-minute infusion every 3 weeks. *Cancer Res* 54 (2): 427-36, 1994.

Sandler A. Irinotecan therapy for small-cell lung cancer. *Oncology (Williston Park)* 16 (4): 419-25, 428, 433; discussion 433-4, 437-8, 2002.

Sasaki Y, Hokusui H, Mizuno S, Morita M, Miya T, Eguchi K, Shinkai T, Tamura T, Ohe Y, Saijo N. A pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of CPT-11 and its active metabolite SN-38. *Jpn J Cancer Res* 86 (1): 101-10, 1995.

Sasaki Y, Imaoka S, Kasugai H, Fujita M, Kawamoto S, Ishiguro S, Kojima J, Ishikawa O, Ohigashi H, Furukawa H, et al. A new approach to chemoembolization therapy for hepatoma using ethiodized oil, cisplatin, and gelatin sponge. *Cancer* 60 (6): 1194-203, 1987.

Satoh T, Hosokawa M. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chem Biol Interact* 162 (3): 195-211, 2006.

Satoh T, Hosokawa M, Atsumi R, Suzuki W, Hokusui H, Nagai E. Metabolic activation of CPT-11, 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin, a novel antitumor agent, by carboxylesterase. *Biol Pharm Bull* 17 (5): 662-4, 1994.

Schneider P, Foitzik T, Pohlen U, Golder W, Buhr HJ. Temporary unilateral microembolization of the lung-a new approach to regional chemotherapy for pulmonary metastases. *J Surg Res* 107 (2): 159-66, 2002.

Seki A, Hori S, Kobayashi K, Narumiya S. Transcatheter arterial chemoembolization with epirubicin-loaded superabsorbent polymer microspheres for 135 hepatocellular carcinoma patients: single-center experience. *Cardiovasc Intervent Radiol* 34 (3): 557-65, 2011 a.

Seki A, Hori S. Switching the Loaded Agent from Epirubicin to Cisplatin: Salvage Transcatheter Arterial Chemoembolization with Drug-eluting Microspheres for Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol* (Epub ahead of print) 2011 b.

- Seki A, Hori S. Transcatheter arterial chemoembolization with docetaxel-loaded microspheres controls heavily pretreated unresectable liver metastases from colorectal cancer: a case study. *Int J Clin Oncol* (Epub ahead of print) 2011 c.
- Semela D, Piguet AC, Kolev M, Schmitter K, Hlushchuk R, Djonov V, Stoupis C, Dufour JF. Vascular remodeling and antitumoral effects of mTOR inhibition in a rat model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 46 (5): 840-8, 2007.
- Shiah HS, Liu TW, Chen LT, Chang JY, Liu JM, Chuang TR, Lee WS, Whang-Peng J. Pulmonary embolism after transcatheter arterial chemoembolization. *Eur J Cancer Care (Engl)* 14 (5): 440-2, 2005.
- Snell GI, Valentine VG, Vitulo P, Glanville AR, McGiffin DC, Loyd JE, Roman A, Aris R, Sole A, Hmissi A, Pirron U. Everolimus versus azathioprine in maintenance lung transplant recipients: an international, randomized, double-blind clinical trial. *Am J Transplant* 6 (1): 169-77, 2006.
- Speakman TJ. Internal Occlusion of a Carotid-Cavernous Fistula. *J Neurosurg* 21: 303-5, 1964.
- Steigerwald K, Merl S, Kastrati A, Wieczorek A, Vorpahl M, Mannhold R, Vogeser M, Hausleiter J, Joner M, Schomig A, Wessely R. The pre-clinical assessment of rapamycin-eluting, durable polymer-free stent coating concepts. *Biomaterials* 30 (4): 632-7, 2009.
- Takayasu K, Arai S, Ikai I, Omata M, Okita K, Ichida T, Matsuyama Y, Nakanuma Y, Kojiro M, Makuuchi M, Yamaoka Y. Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology* 131 (2): 461-9, 2006.
- Tanizawa A, Fujimori A, Fujimori Y, Pommier Y. Comparison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials. *J Natl Cancer Inst* 86 (11): 836-42, 1994.
- Taylor RR, Tang Y, Gonzalez MV, Stratford PW, Lewis AL. Irinotecan drug eluting beads for use in chemoembolization: in vitro and in vivo evaluation of drug release properties. *Eur J Pharm Sci* 30 (1): 7-14, 2007.
- Thistlethwaite AJ, Leeper DB, Moylan DJ, 3rd, Nerlinger RE. pH distribution in human tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11 (9): 1647-52, 1985.
- Thompson AB, Teschler H, Rennard SI. Pathogenesis, evaluation, and therapy for massive hemoptysis. *Clin Chest Med* 13 (1): 69-82, 1992.
- Tobin P, Clarke S, Seale JP, Lee S, Solomon M, Aulds S, Crawford M, Gallagher J, Evers T, Rivory L. The in vitro metabolism of irinotecan (CPT-11) by carboxylesterase and beta-glucuronidase in human colorectal tumours. *Br J Clin Pharmacol* 62 (1): 122-9, 2006.
- Tomashefski JF, Cohen AM, Doershuk CF. Longterm histopathologic follow-up of bronchial arteries after therapeutic embolization with polyvinyl alcohol (133) in patients with cystic fibrosis. *Hum Pathol* 1988; 19(5):555-561.

- Treiber G. mTOR inhibitors for hepatocellular cancer: a forward-moving target. *Expert Rev Anticancer Ther* 9 (2): 247-61, 2009.
- Uchiyama N, Kobayashi H, Nakajo M, Shinohara S. Treatment of lung cancer with bronchial artery infusion of cisplatin and intravenous sodium thiosulfate rescue. *Acta Oncol* 27 (1): 57-61, 1988.
- Uflacker R, Kaemmerer A, Picon PD, Rizzon CF, Neves CM, Oliveira ES, Oliveira ME, Azevedo SN, Ossanai R. Bronchial artery embolization in the management of hemoptysis: technical aspects and long-term results. *Radiology* 157 (3): 637-44, 1985.
- Uflacker R, Kaemmerer A, Neves C, Picon PD. Management of massive hemoptysis by bronchial artery embolization. *Radiology* 146 (3): 627-34, 1983.
- Van Ark-Otte J, Kedde MA, van der Vijgh WJ, Dingemans AM, Jansen WJ, Pinedo HM, Boven E, Giaccone G. Determinants of CPT-11 and SN-38 activities in human lung cancer cells. *Br J Cancer* 77 (12): 2171-6, 1998.
- Van Beers B, Roche A, Cauquil P, Jamart J, Pariente D, Ajavon Y. Transcatheter arterial chemotherapy using doxorubicin, iodized oil and Gelfoam embolization in hepatocellular carcinoma. *Acta Radiol* 30 (4): 415-8, 1989.
- Van Putte BP, Grootenboers M, van Boven WJ, van Oosterhout M, Pasterkamp G, Folkerts G, Schramel F. Selective pulmonary artery perfusion for the treatment of primary lung cancer: Improved drug exposure of the lung. *Lung Cancer* 65 (2): 208-13, 2009.
- Van Putte BP, Hendriks JM, Romijn S, Van Schil PE. Isolated lung perfusion for the treatment of pulmonary metastases current mini-review of work in progress. *Surg Oncol* 12 (3): 187-93, 2003.
- Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M, Ayuso C, Castells L, Montana X, Llovet JM, Bruix J. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol* 46 (3): 474-81, 2007.
- Vilgrain V, Sibert A, Zappa M, Belghiti J. Sequential arterial and portal vein embolization in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma: the hospital beaujon experience. *Semin Intervent Radiol* 25 (2): 155-61, 2008.
- Vinters HV, Lundie MJ, Kaufmann JCE. Long-term pathological follow-up of cerebral arteriovenous malformations treated by embolization with bucrylate. *N Engl J Med* 1986; 314(8):477-483.
- Vogl TJ, Lehnert T, Zangos S, Eichler K, Hammerstingl R, Korkusuz H, Lindemayr S. Transpulmonary chemoembolization (TPCE) as a treatment for unresectable lung metastases. *Eur Radiol* 18 (11): 2449-55, 2008.
- Vogl TJ, Herzog C, Zangos S, Lindemayr S. [Palliative treatment of primary lung tumors with transpulmonary chemoembolization (TPCE)]. *Rofu* 179 (3): 300-7, 2007.

- Vogl TJ, Wetter A, Lindemayr S, Zangos S. Treatment of unresectable lung metastases with transpulmonary chemoembolization: preliminary experience. *Radiology* 234 (3): 917-22, 2005.
- Wagner EM, Blosser S, Mitzner W. Bronchial vascular contribution to lung lymph flow. *J Appl Physiol* 85 (6): 2190-5, 1998.
- Wang W, Jia WD, Xu GL, Wang ZH, Li JS, Ma JL, Ge YS, Xie SX, Yu JH. Antitumoral activity of rapamycin mediated through inhibition of HIF-1alpha and VEGF in hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 54 (10): 2128-36, 2009.
- Wassef M, Pelage JP, Velzenberger E, Namur J, Schwartz-Cornil I, Taylor RR, Lewis AL, Laurent A. Anti-inflammatory effect of ibuprofen-loaded embolization beads in sheep uterus. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 86 (1): 63-73, 2008.
- Weiss W, Boucot KR, Cooper DA. The Philadelphia pulmonary neoplasm research project. Survival factors in bronchogenic carcinoma. *Jama* 216 (13): 2119-23, 1971.
- Weksler B, Ng B, Lenert JT, Burt ME. Isolated single-lung perfusion with doxorubicin is pharmacokinetically superior to intravenous injection. *Ann Thorac Surg* 56 (2): 209-14, 1993.
- Welter M, Bartha K, Rieger H. Vascular remodelling of an arterio-venous blood vessel network during solid tumour growth. *J Theor Biol* 259 (3): 405-22, 2009.
- Wierdl M, Morton CL, Weeks JK, Danks MK, Harris LC, Potter PM. Sensitization of human tumor cells to CPT-11 via adenoviral-mediated delivery of a rabbit liver carboxylesterase. *Cancer Res* 61 (13): 5078-82, 2001.
- Wike-Hooley JL, Haveman J, Reinhold HS. The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiother Oncol* 2 (4): 343-66, 1984.
- Williams MH, Jr., Towbin EJ. Magnitude and time of development of the collateral circulation to the lung after occlusion of the left pulmonary artery. *Circ Res* 3 (4): 422-4, 1955.
- Windecker S, Remondino A, Eberli FR, Juni P, Raber L, Wenaweser P, Togni M, Billinger M, Tuller D, Seiler C, Roffi M, Corti R, Sutsch G, Maier W, Luscher T, Hess OM, Egger M, Meier B. Sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents for coronary revascularization. *N Engl J Med* 353 (7): 653-62, 2005.
- Wojciak-Stothard B. New drug targets for pulmonary hypertension: Rho GTPases in pulmonary vascular remodelling. *Postgrad Med J* 84 (993): 348-53, 2008.
- Yang X, Hu Z, Chan SY, Goh BC, Duan W, Chan E, Zhou S. Simultaneous determination of the lactone and carboxylate forms of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 by high-performance liquid chromatography: application to plasma pharmacokinetic studies in the rat. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 821 (2): 221-8, 2005.

Yang Z, Lei Z, Li B, Zhou Y, Zhang GM, Feng ZH, Zhang B, Shen GX, Huang B. Rapamycin inhibits lung metastasis of B16 melanoma cells through down-regulating alphav integrin expression and up-regulating apoptosis signaling. *Cancer Sci* 101 (2): 494-500, 2009.

Yoon W, Kim JK, Kim YH, Chung TW, Kang HK. Bronchial and nonbronchial systemic artery embolization for life-threatening hemoptysis: a comprehensive review. *Radiographics* 22 (6): 1395-409, 2002.

Yumoto Y, Jinno K, Tokuyama K, Araki Y, Ishimitsu T, Maeda H, Konno T, Iwamoto S, Ohnishi K, Okuda K. Hepatocellular carcinoma detected by iodized oil. *Radiology* 154 (1): 19-24, 1985.

Zanini A, Chetta A, Olivieri D. Therapeutic perspectives in bronchial vascular remodeling in COPD. *Ther Adv Respir Dis* 2 (3): 179-87, 2008.

