



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I
FACULTE DE MEDECINE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

Discipline : Bioingénierie
Présentée et soutenue publiquement

par **Frédéric MARCHAL**

le 25 novembre 2005

Approche expérimentale du traitement local des métastases hépatiques.
Hyperfréquence – Thérapie photodynamique – Modèles animaux

Directeur de Thèse : Pr François GUILLEMIN

JURY

Président:	Pr. P. Boissel (Nancy)
Jury :	Dr. L.N. Bezdetnaya-Bolotina (Nancy) Pr. F. Guillemin (Nancy)
Rapporteurs:	Pr. S. Evrard (Bordeaux) Pr. M. Rivoire (Lyon)

Cette thèse est dédiée à mon Grand-Père, le Docteur Maurice Tarrou, qui avait consacré une partie de sa vie à la recherche contre le cancer. Ce travail est le témoin de ma profonde admiration.

REMERCIEMENTS

A Céline, Hugues et Yann

Ce travail m'a fait manquer beaucoup de temps avec vous. Votre amour et votre patience m'ont aidé durant toutes ces années. Avec tout mon amour.

A Maman et mes frères

Votre soutien, votre confiance et votre amour ont été une aide précieuse.

A mes Beaux Parents

Merci pour votre aide et votre compréhension.

A tous mes amis

Merci pour votre complicité, votre amitié et pour tous ces moments partagés.

A Monsieur le Professeur François Guillemin

Depuis mon DEA, vous avez dirigé ces travaux de recherche malgré un emploi du temps de plus en plus chargé. Vos remarques et conseils ont toujours été constructifs, permettant d'avancer dans cette thèse, même aux moments les plus difficiles, puis de la mener à bien. Je vous remercie vivement de m'avoir encadré, de m'avoir fait apprécier la recherche et de m'avoir consacré autant de temps tout au long de ce travail.

A Monsieur le Professeur Patrick Boissel

Vous m'aviez fait confiance en m'accueillant dans votre service pour mon clinicat et j'ai pu parfaire ma formation à votre contact ainsi qu'auprès de vos collaborateurs. Depuis, les échanges entre les 2 services sont fréquents et toujours chaleureux. Que ce travail soit l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Michel Rivoire

Je vous adresse mon profond respect et mes remerciements pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'être le rapporteur de cette thèse. C'est avec plaisir que j'ai appris à connaître les membres de votre équipe lors de trop brefs passages à Lyon. J'espère que ces échanges perdureront dans le temps.

A Monsieur le Professeur Serge Evrard

Je te remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Ta connaissance de la radiofréquence et de la photothérapie dynamique font de toi l'interlocuteur idéal. Je t'exprime ma profonde reconnaissance pour l'attention que tu as porté à ce travail.

A Madame le Docteur Lina Bezdetsnaya-Bolotine

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre équipe et de m'avoir fait profiter de votre expérience en thérapie photodynamique et recherche expérimentale. J'ai apprécié votre enthousiasme et votre disponibilité. Notre collaboration va se prolonger en terminant ce travail et en débutant d'autres thématiques de recherche.

A Monsieur le Docteur Dominique Elias

C'est à vous que je dois la première partie de ce travail. J'ai pu ainsi valider la technique que vous aviez mise au point. Je vous remercie aussi pour toute l'aide que vous m'avez apporté à la mise en place de la chimiohyperthermie intrapéritonéale et j'espère pouvoir encore bénéficier de votre enseignement.

A Monsieur le Docteur Philippe Rauch

Grâce à ton savoir-faire en statistiques et à tes conseils toujours avisés, nombre d'articles ont trouvé leur place dans des revues à fort impact factor! J'apprécie ton esprit de synthèse et ta modestie. J'espère qu'une fois le printemps revenu, nous pourrons reprendre le vélo dans le Saintois, ballades interrompues cette année. Avec toute mon amitié.

A Monsieur le Docteur Jean Luc Verhaeghe

Votre disponibilité et votre présence sans faille m'ont été d'un grand soutien. Soyez en chaleureusement remercié.

A Madame Sophie Marchal

Un grand merci pour votre aide, votre disponibilité et votre patience au cours de ces 3 années. A votre tour maintenant pour rédiger votre thèse!

A Monsieur le Docteur Vadim Chalau

Votre travail en spectroscopie trouvera tout naturellement son prolongement à Londres et dans de futures collaborations.

A Monsieur le Docteur N'Guyen Tran

Nos discussions animées au sein du laboratoire de chirurgie expérimentale et ton aide efficace à m'apprendre l'anesthésie des rats ont permis la concrétisation de nombreuses manip. Puisse nous continuer cette fructueuse collaboration.

A Madame le Docteur Agnès Leroux

Tu m'as appris à lire les lames d'anatomo-pathologie et ce malgré une charge de travail déjà importante. Un grand merci.

A Mesdames et Messieurs du laboratoire d'Instrumentation Médicale Automatisée en Cancérologie (IMAC) et de l'Ecole de Chirurgie

Je vous remercie pour toute l'aide que vous m'avez apportée à mettre en place les différentes expérimentations.

A Mesdames et Messieurs des Départements de Radiologie et d'Anatomo-pathologie

Merci pour votre dévouement à m'aider tout au long de ce travail.

A Mesdames et Messieurs les anesthésistes réanimateurs, médecins du Centre, personnels du bloc opératoire, du service et du secrétariat du Département de Chirurgie

Merci pour votre compréhension lors de mes absences répétées et de votre aide auprès des patients et de leur famille.

Aux patients et à leur famille

Merci pour votre compréhension et votre disponibilité.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	12
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1. La radiofréquence	16
1.1. Histoire de la radiofréquence	16
1.2. Aspects techniques	17
1.2.1. Principe	17
1.2.1.1. Les effets tissulaires	19
1.2.1.2. Les effets cellulaires immédiats	19
1.2.1.3. Les effets thermiques indirects	20
1.2.1.4. Taille de la zone d'ablathermie	20
1.2.2. Matériel	21
1.2.2.1. Radionics® (Figure 1.2.)	22
1.2.2.3. RITA (Radiofrequency Interstitial Tumor Ablation) Medical Systems® (Figure 1.3.)	23
1.2.2.3. Radiotherapeutics® (Figure 1.4.)	24
1.2.2.4. Berchtold® (Figure 1.5.)	25
1.3. Les techniques concurrentes	26
1.3.1. Le laser	27
1.3.2. La cryothérapie	27
1.3.3. Ultrasons de haute énergie focalisés	30
1.4. Traitement des tumeurs hépatiques par radiofréquence	31
1.4.1. Efficacité thérapeutique	31
1.4.2. Mortalité et morbidité	34
1.4.2.1. Mortalité	34
1.4.2.2. Morbidité	34
1.4.2.3. Morbidité biliaire	36
2. La thérapie photodynamique	36
2.1. Histoire de la thérapie photodynamique	36
2.2. Les réactions photochimiques	38
2.2.1. Les réactions photochimiques de type I	40
2.2.2. Les réactions photochimiques de type II	41
2.3. La photodégradation des photosensibilisants	44
2.4. Les photosensibilisants	47
2.4.1. Propriétés idéales d'un photosensibilisant	47
2.4.2. Les photosensibilisants de deuxième et de troisième générations	47
2.4.3. La 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorine (<i>m</i> -THPBC)	49
2.5. L'oxygène, élément clé du déroulement des réactions photodynamiques	50
2.5.1. La consommation en oxygène au cours de la PDT	51
2.5.2. Utilisation de moyens permettant de pallier la déplétion en oxygène au cours de la PDT	52

2.5.2.1. Application de faibles irradiances	52
2.5.2.2. Fractionnement de l'irradiation	52
2.5.2.3. Compensation de l'hypoxie préexistante	53
2.6. Les mécanismes de photodestruction des tumeurs par la PDT	53
2.6.1. Dommages cellulaires	54
2.6.2. La nécrose	55
2.6.3. L'apoptose	56
2.6.4. Dommages vasculaires	58
2.6.4.1. Les mécanismes des dommages vasculaires	58
2.6.4.2. Facteurs influençant la réponse vasculaire à la PDT	60
2.6.4.2.1. L'intervalle drogue-lumière (IDL)	60
2.6.4.2.2. L'irradiance appliquée	61
2.6.5. Dommages immunitaires	61
2.7. La thérapie photodynamique en pratique clinique	63
2.7.1. Cancer de l'œsophage	63
2.7.2. Cancer pulmonaire non à petites cellules	64
2.7.3. Les cancers ORL	64
2.7.4. Les tumeurs de vessie	65
2.7.5. Les tumeurs cutanées	65
2.7.6. Les cholangiocarcinomes hilaires	66
2.7.7. Les tumeurs du pancréas	66
2.7.8. Les autres indications	67
RESULTATS	69
<hr/>	
1. Etude des lésions biliaires induites par la radiofréquence et prévention de ces lésions	70
1.1. Modèle expérimental de lésions biliaires lors de la réalisation d'une ablathermie hépatique par RF	70
1.2. Prévention des lésions biliaires lors de la réalisation d'une ablathermie hépatique par RF au contact des voies intrahépatiques	78
2. Cinétique de distribution intahépatique et intratumorale de la 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorine (m-THPBC)	86
2.1. Modèle expérimental de tumeur hépatique chez le rat athymique à partir d'une lignée de tumeur humaine HT29	86
2.2. Pharmacocinétique intrahépatique et intratumorale de la m-THPBC par spectroscopie de diffusion élastique et par extraction	92
2.2.1. Techniques de mesure de la concentration intratissulaire d'un photosensibilisant	93
2.2.2. Spectroscopie de diffusion élastique (ESS)	94
2.2.3. Description de l'appareil de mesure	95
2.2.3.1. Module "Source de Lumière"	96
2.2.3.2. Sonde à fibres optiques	97
2.2.3.3. Module de spectrométrie, ordinateur et programmes informatiques associés	97
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	133
<hr/>	
CONCLUSIONS	142
<hr/>	

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145
<hr/>	
ANNEXES	184
Liste des abréviations	185
Communications écrites et orales	187

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Il a été estimé pour l'année 2002 10,9 millions de nouveaux cas de cancers dans le monde, 6,7 millions de décès et 24,6 millions de personnes vivant avec un cancer (1). Pour la même année 2002, le cancer colorectal (CCR) est responsable de 1,02 millions de nouveaux cas et 529 000 décès. Le CCR est le deuxième en terme de prévalence (11,5 %), après le cancer du sein (17,9 %) et avant la prostate (9,6 %) (1). La survie à 5 ans est estimée à 54-56 % dans les pays développés et à 39 % dans les pays émergents (1). En France, le cancer reste la première cause de mortalité (2). Le CCR atteint 36200 personnes par an et provoque le décès de 15949 patients (année 2000) (3). Le nombre annuel de CCR a augmenté de 50 % entre l'année 1980 et 2000 (4). Toutefois, sa mortalité a tendance à légèrement diminuer, probablement due à une prise en charge plus précoce et plus efficace de ce cancer (2).

Les métastases hépatiques sont déjà présentes au moment du diagnostic d'un CCR chez 15 à 25% des patients et vont apparaître au cours de l'évolution de la maladie chez plus de la moitié des autres patients (5, 6). Seul le traitement chirurgical offre des possibilités de guérison. Malheureusement, peu de patients porteurs de métastases hépatiques isolées sont éligibles pour la chirurgie (7), les autres étant récusés du fait d'un nombre trop grand de métastases hépatiques, d'une atteinte bilobaire, d'une fonction hépatique ne permettant pas la résection hépatique ou de contre-indications opératoires (8). De plus, parmi les patients qui ont pu bénéficier d'une résection chirurgicale, 75% vont développer de nouvelles métastases, dont 20 à 30% seront confinées au foie (9). La résection chirurgicale des métastases, lorsqu'elle est possible, est le traitement de référence des récidives localisées au foie (9). L'histoire naturelle des métastases hépatiques et les possibilités restreintes de les traiter chirurgicalement ont imposé le développement d'autres modalités thérapeutiques, dont l'ablation des métastases hépatiques par radiofréquence.

La radiofréquence (RF) est une technique récente de destruction thermique des tumeurs hépatiques. Les premières publications concernant le traitement des lésions hépatiques datent de 1993 (10-12). Depuis, de nombreuses séries ont confirmé la faisabilité de la RF. La morbidité reste faible, de 3 à 36 % (13-15). Toutefois, il existe des situations pour lesquelles la RF est contre indiquée comme par exemple la situation centrale des tumeurs. En effet, le risque de lésions biliaires secondaires à l'ablathermie est important.

La thérapie photodynamique (PDT) est une autre technique mini-invasive de destruction locale de tumeurs (16). La PDT a été principalement utilisée pour traiter des lésions cancéreuses ou précancéreuses superficielles de la peau et des muqueuses, accessibles par endoscopie comme les tumeurs de l'œsophage, des bronches, de la vessie et de la sphère ORL (16). La limite de cette technique est la faible pénétration tissulaire de la lumière qui est nécessaire pour activer localement le photosensibilisant (17). L'apparition de nouveaux photosensibilisants permettant de travailler à des longueurs d'onde ayant une plus forte pénétration tissulaire, ouvre la voie à la destruction de tumeurs solides comme les métastases hépatiques (17, 18).

Cette étude a pour but d'approfondir les connaissances dans le traitement des métastases hépatiques par des moyens de destruction locale.

La première partie concerne le moyen de prévenir les lésions biliaires lorsqu'une radiofréquence est réalisée au contact des voies biliaires intrahépatiques. Un modèle expérimental de lésions biliaires par radiofréquence a été validé chez le porc. Dans un deuxième temps, la perfusion des canaux biliaires par du sérum glucosé froid a permis la prévention de ces lésions biliaires lors de la réalisation d'une ablation au contact des voies biliaires.

La deuxième partie concerne la cinétique de distribution intrahépatique et intratumorale d'un nouveau photosensibilisant de deuxième génération, la *m*THPBC. Un modèle expérimental de tumeur hépatique chez le rat athymique à partir d'une lignée de tumeur humaine (HT29) a été mis au point. La pharmacocinétique hépatique et tumorale du photosensibilisant a été déterminée par extraction et par spectroscopie de diffusion élastique. La spectroscopie de diffusion élastique étudie l'interaction lumière-tissu par l'analyse de la lumière diffusée. Afin de réaliser ces mesures, un spectromètre a été élaboré.

Enfin, l'association de la radiofréquence et de la photothérapie dynamique pour la destruction de tumeurs hépatiques de volume important est abordée dans les perspectives de ce travail.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La radiofréquence

L'hyperthermie a été appliquée comme un moyen thérapeutique en cancérologie. L'hyperthermie a été employée localement, régionalement et même de manière générale pour différents types de tumeurs (19). L'hyperthermie locale et régionale a l'avantage de pouvoir traiter des tumeurs localisées avec des températures supérieure à 42°C. Cela suppose comme hypothèse que les cellules cancéreuses seraient plus sensibles à la chaleur que les cellules normales, en raison d'une moins bonne vascularisation du tissu tumoral et d'une capacité de vasodilatation de la néovascularisation tumorale diminuée (20, 21).

1.1. Histoire de la radiofréquence

La première utilisation de la radiofréquence (courant haute fréquence alternatif) est le bistouri électrique (1911), appliqué pour coaguler des petites lésions cutanées et de la vessie, puis pour la chirurgie des tumeurs cérébrales (1928) (22).

Durant les années 1970, les générateurs sont devenus plus petits, plus performants, monitorant la température à l'extrémité de l'électrode et la puissance. Les voies sensitives étaient alors électrocoagulées dans le traitement des douleurs chroniques (algies faciales). En 1985, Huang *et al.* (23, 24) sont les premiers à utiliser la radiofréquence pour détruire les voies de conduction dans le traitement des arythmies cardiaques.

La petite taille des lésions créées par la radiofréquence de l'ordre de quelques millimètres constituait la limite de la technique jusqu'à ce que d'importants progrès dans la forme des électrodes et dans l'énergie délivrée puissent créer des lésions de plusieurs centimètres. Ce fut alors l'engouement pour cette technologie aussi bien dans la recherche fondamentale que clinique, d'abord en urologie pour l'hypertrophie bénigne de prostate (25) puis plus récemment dans le traitement des tumeurs primitives et secondaires hépatiques.

1.2. Aspects techniques

1.2.1. Principe

L'application d'un courant de radiofréquence sinusoïdal (400 à 500 kHz) provoque une destruction tissulaire limitée par nécrose de coagulation. L'échauffement responsable de la nécrose des cellules est créé par une agitation ionique autour d'une électrode (les ions changeant de direction à la fréquence du courant alternatif) (26).

La différence entre le bistouri électrique et l'ablation par radiofréquence est la modulation de la forme de l'onde électrique et le volume dans lequel l'énergie est absorbée (Figure 1.1.).

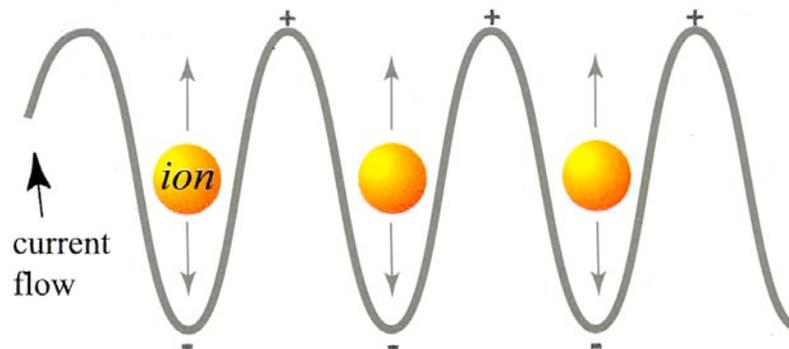


Figure 1.1. Le tissu traversé par un courant sinusoïdal subit une agitation ionique qui induit, par friction entre les particules, un échauffement tissulaire (27).

L'échauffement des tissus induit par la radiofréquence provoque la coagulation (vers 60 °C), puis la vaporisation de l'eau intra et extracellulaire à 100 °C et enfin une carbonisation au delà de 100 °C (24, 28) (Tableau 1).

Tableau 1. type de lésions histologiques induites en fonction de la température (° C)

<i>Température</i>	<i>Changements histologiques</i>
45 °C	Vasodilatation, dommage endothélial
50 °C	Disparition de l'activité enzymatique
60 °C	Désorganisation des membranes cellulaires Dénaturation des protéines
70 °C	Dénaturation du collagène Perméabilisation des membranes
80 °C	Contraction des fibres collagènes Nécrose de coagulation
100 °C	Vaporisation de l'eau Déshydratation totale Carbonisation
> 100 °C	Volatilisation des constituants organiques

Lors de la destruction tissulaire par hyperthermie locale, 2 phases se suivent; La première phase est l'effet direct de l'hyperthermie qui est fonction de l'énergie totale délivrée, de la biologie tumorale et de l'environnement tumoral (29, 30). Cette première étape repose sur le concept de la plus grande sensibilité des cellules tumorales à l'hyperthermie par rapport aux cellules normales (21), avec mort cellulaire immédiate. La deuxième phase englobe les effets secondaires et indirects de l'hyperthermie qui aboutissent à une progression dans la

destruction tissulaire. Ces dommages tissulaires sont le résultat de plusieurs mécanismes, incluant les lésions de la microvascularisation, l'apoptose, l'activation des cellules de Kupffer, et la modulation de la réponse immunitaire.

1.2.1.1. Les effets tissulaires

Plusieurs zones se créent dans le foie et la tumeur après application d'une hyperthermie locale. Ces modifications sont mieux visualisées dans le foie que dans la tumeur. Quatre zones différentes sont décrites: la première zone est celle où le tissu est en contact direct avec la source d'hyperthermie. Les cellules apparaissent morphologiquement normales avec un tissu de soutien intact mais ces cellules ne sont pas viables. La zone centrale entourant immédiatement la première zone est composée de tissu complètement détruit. La zone de transition est le siège de suffusion hémorragique et contient des cellules au stade de mort cellulaire précoce. La quatrième zone est le tissu sain entourant la zone de transition (30). La vascularisation tumorale est altérée dès que la température dépasse 42 °C, avec des phénomènes de stase et de thrombose. Au delà de 60 °C, cette vascularisation est complètement détruite (31).

1.2.1.2. Les effets cellulaires immédiats

La fraction cellulaire tuée par l'hyperthermie augmente d'un facteur 100 avec une élévation de 2 °C (21). A une température comprise entre 50 et 55 °C, la mort cellulaire intervient instantanément sur des cultures cellulaires (21). Les modifications de la perméabilité membranaire étaient traditionnellement considérées comme la cause principale de la mort cellulaire, mais c'est l'altération des mitochondries qui est le facteur déterminant des lésions irréversibles induites par l'hyperthermie (30, 32). Les modifications ultrastructurales mitochondriales surviennent dans les 15 minutes après l'application de l'hyperthermie. L'activité de la NADH-diaphorase (nicotinamide adenine dinucleotide-diaphorase) cesse immédiatement après l'hyperthermie. L'étude du métabolisme respiratoire cellulaire en utilisant une coloration au NADH-diaphorase permet de faire la différence entre la viabilité et la non viabilité du tissu bien avant les modifications morphologiques induites par l'hyperthermie (33). L'hyperthermie induit aussi des altérations de l'appareil de Golgi, du cytosquelette, de la synthèse de l'ARN et du réarrangement des polysomes nucléaires (30).

1.2.1.3. Les effets thermiques indirects

Les dommages tissulaires progressent jusqu'à 7 jours après l'arrêt de l'hyperthermie (32), puis la taille des lésions de nécrose diminue lentement dans le temps, le tissu nécrotique étant remplacé par des cellules inflammatoires (34). La progression de ces dommages tissulaires dans le temps est le résultat de plusieurs mécanismes. L'hyperthermie induit l'apoptose pour des températures comprises entre 40 et 45 °C. L'application locale d'une hyperthermie dans un tissu ou une tumeur crée un gradient de température qui décroît au fur et à mesure que l'on s'éloigne du point d'impact. Basé sur l'étude de l'activité de la caspase 3, le pic d'apoptose survient 2 heures après la fin de l'hyperthermie et progresse pendant 12 heures (35). La stimulation de l'apoptose est directement induite par l'hyperthermie, l'altération de l'environnement tissulaire ou secondaire à des cytokines (35, 36). D'autres facteurs, comme la protéine HSP (heat shock protein) 70, protéine impliquée dans la thermotolérance acquise, peuvent inhiber l'apoptose (37). La stase puis la thrombose vasculaire péri-tumorale induite par l'hyperthermie sont des phénomènes qui peuvent persister jusqu'à 24 heures après la fin du traitement. L'hypoxie secondaire entraîne une baisse du pH intratissulaire, participant à la mort cellulaire (29). L'hyperthermie induit la production d'interleukine 1 et de TNF α par les cellules de Kupffer (30). Les lymphocytes T et les macrophages sont rapidement stimulés par une hyperthermie locale, suivie par un pic d'immunoblastes et de mastocytes jusqu'à 20 jours après l'application (38). La réponse immunitaire antitumorale participe aux mécanismes de destruction tumorale, qui perdurent dans le temps et qui peuvent s'étendre à d'autres localisations. Ainsi Isbert et al. ont montré, sur un modèle de tumeurs implantées dans le foie, que la destruction de la tumeur d'un lobe par hyperthermie réduisait la croissance tumorale de la tumeur non traitée sur le même animal par rapport au groupe contrôle et au groupe résection chirurgicale (39).

1.2.3.4. Taille de la zone d'ablathermie

La taille de la lésion induite dépend de l'équilibre entre la chaleur produite et la chaleur perdue. En prenant comme hypothèse que le tissu est homogène d'un point de vue physique et électrique, que la présence de l'électrode ne modifie pas la diffusion du courant, alors la chaleur générée dans le tissu par l'extrémité de l'électrode est conditionnée par 3 facteurs (28):

- la distance à l'électrode
- le courant (puissance – impédance)

- la durée d'application

La chaleur est "perdue" à travers le tissu durant la radiofréquence par la conduction (diffusion thermique), par la convection via la circulation et par la résistance électrique des tissus. Au point d'équilibre, la chaleur générée par le courant est égale à la chaleur perdue et la température de la cible reste constante durant la procédure (26). Une lésion elliptique est observée le long d'une l'électrode linéaire. La taille de l'électrode conditionne la taille de la lésion. Elle peut être déterminée par la règle suivante: Longueur de la lésion = 2 x longueur de l'électrode et diamètre maximal de la lésion = 2/3 longueur de la lésion créée (28). Cette règle est valable pour un tissu homogène, ce qui n'est qu'une approximation. Le monitoring de la température de l'électrode n'est pas forcément le reflet de la température à l'intérieur de la lésion car il peut y avoir à l'intérieur d'un tissu hétérogène des zones chaudes (peu vascularisées) et des zones froides (vascularisées). C'est pourquoi il faut réaliser des tests in vivo pour pouvoir prédire la taille et la forme de la lésion que l'on veut produire.

1.2.2. Matériel

Le diamètre maximum de la zone de destruction tissulaire induite par une aiguille de RF est de 1 à 1,5 cm (40, 41). Pour augmenter cette dimension, deux artifices techniques ont été retenus:

- Plusieurs électrodes (4 à 12) sont déployées dans la cible. Le but est d'obtenir autant de lésions RF unitaires de petite taille que d'électrodes pour former une plus grande lésion par sommation. La taille et la forme de la lésion dépendent du nombre d'électrodes déployées et de leur disposition dans l'espace (40).
- Le refroidissement de l'électrode par circulation de liquide froid dans la gaine de l'électrode limite l'accumulation de chaleur à son voisinage, ce qui permet de délivrer une énergie électrique plus importante sans atteindre la température de 100 °C dans les tissus très proches de l'électrode soumis à une plus grande énergie RF que les tissus plus distants (42). La comparaison des aiguilles à plusieurs électrodes avec les aiguilles à refroidissement a montré que ces dernières créaient des lésions plus larges mais que les lésions créées par les aiguilles à électrodes étaient plus reproductibles, uniformes et sphériques (43). Malgré les possibilités techniques, la plupart des cliniciens se limitent à des cibles tumorales inférieures à 5 cm de diamètre, avec des indications préférentielles des tumeurs de moins de 3 cm (40). Au delà de cette taille, il faudra réaliser plusieurs applications pour traiter la lésion: une tumeur de 4 cm

est deux fois plus volumineuse qu'une tumeur de 3 cm et une tumeur de 5 cm est quatre fois plus volumineuse (40).

Quatre firmes commercialisent un appareil de radiofréquence pour l'ablathermie des tumeurs hépatiques. Tous ces matériels ont le marquage CE et ont obtenu l'autorisation de la FDA. Trois procédés techniques sont en concurrence.

1.2.2.1. Radionics® (Figure 1.2.)

Le matériel Radionics® (Radionics Instruments, INC, Burlington, MA, USA) se compose d'un générateur monopolaire de 480 kHz, d'une puissance de 200 Watts à 50 ohms. L'électrode permet de mesurer la température au site d'application. Cette électrode intègre un système interne de refroidissement. Une pompe péristaltique à galets perfuse de l'eau stérile froide à travers l'extrémité de l'électrode afin de réguler l'échauffement au contact. La carbonisation du tissu autour de l'électrode augmente considérablement l'impédance électrique et diminue la conduction électrique donc la production de chaleur au delà. Ce système de refroidissement permet d'obtenir des nécroses tissulaires plus étendues. L'électrode de 17 Gauge permet d'obtenir des nécroses de 3 cm de diamètre pour une longueur d'aiguille dénudée de 3 cm et un temps moyen d'application de 15 à 20 minutes (44). Afin d'obtenir des lésions plus importantes, une aiguille en forme de trident appelée "cluster" a été développée: elle permet d'obtenir des lésions de 5 cm de diamètre. Le courant est recueilli par des plaques ou électrodes de dispersion collées sur la face postérieure des cuisses du patient, 2 à 4 plaques sont nécessaires.

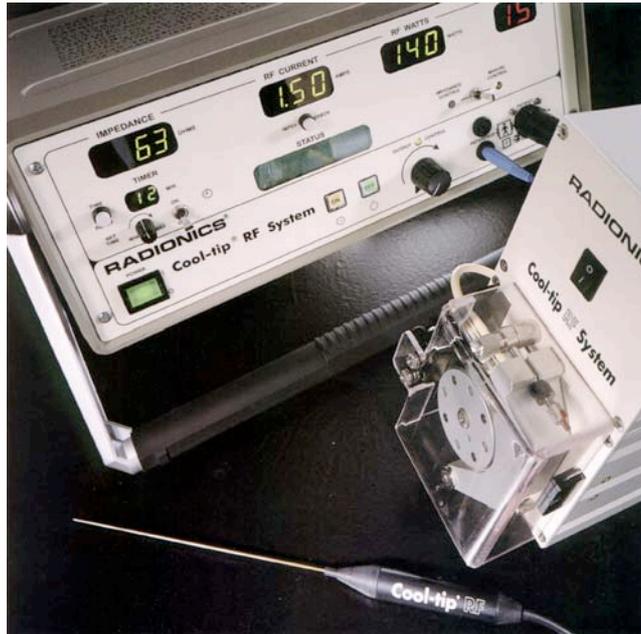


Figure 1.2. Appareil de radiofréquence Radionics® (Radionics Instruments, INC, Burlington, MA, USA).

1.2.2.3. RITA (Radiofrequency Interstitial Tumor Ablation) Medical Systems® (Figure 1.3.)

Le matériel RITA® (RITA Medical System, INC, Mountain View, CA, USA) se compose d'un générateur monopolaire 460 kHz de 150 Watts à 50 ohms. Ce générateur contrôle la température, l'impédance et la puissance. Afin d'élargir la zone de nécrose tissulaire, l'aiguille de 15 Gauge est composée de 2, 3, 4, 7 ou 9 (14 Gauge) électrodes qui vont se déployer dans la cible tumorale, comme les baleines d'un parapluie. Sur l'aiguille à 7 électrodes, sont disposés 4 capteurs de température et 5 sur l'aiguille à 9 électrodes. L'intérêt des capteurs thermiques aux extrémités des électrodes est de contrôler le positionnement: si une des électrodes est dans un vaisseau, sa température est moindres par rapport aux autres. La température contrôle automatiquement le niveau de puissance du générateur. Il existe une possibilité de contrôle de la puissance délivrée par l'impédance mesurée au niveau du tissu (45). Le courant est recueilli par deux plaques de dispersion. La procédure dure en moyenne 10 minutes, des lésions de 2-3 cm sont obtenues avec l'aiguille à 7 électrodes contre 3-5 cm pour la 9 électrodes.



Figure 1.3. Appareil de radiofréquence RITA (Radiofrequency Interstitial Tumor Ablation) Medical Systems® (RITA Medical System, INC, Mountain View, CA, USA).

1.2.2.3. Radiotherapeutics® (Figure 1.4.)

Le matériel Radiotherapeutics® (Radiotherapeutics Corporation, Sunnyvale, CA, USA) se compose d'un générateur de 100 Watts à 50 ohms. Ce générateur contrôle l'impédance et la puissance. La puissance délivrée au début de la procédure est de 50 Watts puis elle augmente de 10 en 10 chaque minute jusqu'à 90 Watts. La puissance est maintenue 15 minutes ou bien l'appareil s'arrête lorsque l'impédance atteint 200 ohms. Après 30 secondes de repos, une seconde phase d'application est lancée jusqu'à atteindre le seuil d'impédance de 200 ohms, ou avec un temps maximum de 10 minutes. Les différentes étapes de cette procédure sont détaillées par un algorithme. Selon le constructeur, le contrôle de la nécrose tumorale par la mesure de l'impédance serait plus fiable que par la mesure de la température, même en plusieurs points de la lésion. En effet, la température est mesurée à l'extrémité des électrodes et n'est pas le reflet de la température au delà des électrodes, ne pouvant ainsi prédire l'étendue de la nécrose. Par contre, la nécrose progressive de la lésion entraîne une déshydratation et donc une modification de l'impédance; lorsque la cible est totalement nécrosée, l'impédance est maximale, entraînant l'arrêt du générateur. L'aiguille de Leveen comporte 10 électrodes (46). Elle est introduite par un guide de 15 Gauge. Les lésions produites ont une taille moyenne de 3,5 cm. D'après les concepteurs, la géométrie des électrodes déployées garantit la constitution d'une zone de nécrose parfaitement sphérique.



Figure 1.4. Appareil de radiofréquence Radiotherapeutics® (Radiotherapeutics Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

1.2.2.4. Berchtold® (Figure 1.5.)

Le matériel Berchtold® (Berchtold GmbH, Tullingen, Allemagne) se compose d'un générateur monopolaire 375 kHz d'une puissance de 60 Watts à 250 ohms. Ce générateur contrôle l'impédance et la puissance. Un thermocouple externe peut être implanté afin de mesurer les températures à l'intérieur de la cible ou à distance. L'aiguille d'un diamètre de 1,2 mm pour une longueur dénudée de 1 à 2 cm suivant le modèle, est multiperforée à son extrémité. L'aiguille est reliée à une pompe d'injection qui délivre du sérum isotonique à un débit de 60 à 80 ml/h. Ce sérum perfuse en permanence l'électrode active et à pour but d'augmenter la conductibilité électrique. Le sérum, chauffé jusqu'à vaporisation, agit comme un point chaud (Hot Spot), évite une déshydratation du tissu prévenant l'adhérence de l'électrode par carbonisation des tissus au contact (47). Deux plaques de dispersion sont nécessaires. Le temps d'application est déterminé en fonction du volume cible à détruire, en moyenne de 10 à 15 minutes.

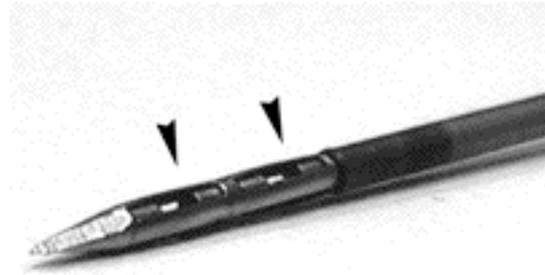


Figure 1.5. Appareil de radiofréquence Berchtold® (Berchtold GmbH, Tullingen, Allemagne) et szon aiguille multiperforée.

1.3. Les techniques concurrentes

Les techniques qui ont été développées pour les mêmes indications que la RF sont le laser et la cryothérapie. L'injection d'acide acétique, d'antimitotique ont fait l'objet de publications de petites séries mais n'ont pas connu de développements ultérieurs (48). L'injection d'éthanol, si elle a montré son efficacité dans le traitement des hépatocarcinomes localisés, n'a pas été créditée des mêmes résultats dans le traitement des métastases hépatiques. Cette moindre efficacité de l'éthanol dans les métastases hépatiques s'explique par la moins bonne diffusion du liquide dans la lésion, qui est un tissu dur au stroma fibreux, entourée de foie sain plus mou, rendant la distribution de l'éthanol imprévisible, par opposition à l'hépatocarcinome qui est une tumeur molle dans un foie de cirrhose de consistance dure (49). L'ablathermie par micro-onde (microwave) est une technique

développée principalement au Japon. La nécrose tumorale est obtenue par diffusion de micro-ondes de 2450 MHz produites par un générateur à l'extrémité d'une aiguille coaxiale. Comme pour la RF, ce sont les frictions moléculaires qui entraînent l'échauffement à proximité de l'aiguille. Une zone de nécrose de 10 à 12 mm de diamètre est obtenue après une application de 30 à 60 secondes. Plusieurs applications, soit en faisant une répétition des tirs soit en utilisant plusieurs aiguilles, peuvent être effectuées en une même séance et peuvent détruire une lésion de 6 cm de diamètre. Si l'efficacité de cette technique est comparable à celle de la RF (48, 50), son coût dix fois supérieur a probablement été un frein à son implantation hors du Japon.

1.3.1. Le laser

Le laser produit un échauffement par conversion de la lumière absorbée, lumière apportée par des fibres optiques. C'est le compromis entre la pénétration en profondeur de la lumière du laser et l'absorption suffisante par les tissus qui détermine la longueur d'onde du laser. Le laser Nd YAG (longueur d'onde 1064 nm) et le laser à diode (longueur d'onde 890 nm) sont les 2 lasers qui ont été évalués, car leur longueur d'onde est très peu absorbée par l'eau et beaucoup plus par les tissus sombres (51). L'intérêt du laser est son utilisation potentielle couplée à l'IRM, qui permet l'étude des effets du laser sur la lésion et de la température intralésionnelle (51). Dans la revue de la littérature publiée en 1999 (85), le taux de complications mineures variait de 8 à 15%, la douleur au point de ponction étant présente dans 90% des cas (52). Les réponses complètes variaient de 8 à 75% avec un taux de survie médian allant de 38 à 42 mois pour les patients porteurs de métastases de CCR (52-55). Cette technique est limitée par les petites zones de nécrose produites (montée en température trop rapide), le traitement des grosses lésions étant souvent un échec ou nécessitant l'emploi de plusieurs sondes (52, 55).

1.3.2. La cryothérapie

Le but de la cryochirurgie est la destruction in situ des tissus ou tumeurs en utilisant de très basses températures. Les premières utilisations de la congélation en cancérologie ont été faites par James Arnott en 1845 (56). Il utilisait une solution congelée de sérum salé pour réduire la taille des tumeurs dépassées du col utérin ou du sein. Entre 1870 et 1900, la production de gaz liquides (air, protoxyde d'azote et azote) a permis d'étendre ses indications

aux traitements des cancers cutanés puis aux autres tumeurs solides en particulier hépatiques (57). Il est possible de réaliser durant une laparotomie la destruction d'une MH de 4 cm avec une cryosonde (circuit fermé d'azote liquide) de 3,2 mm de diamètre fonctionnant pendant 15 minutes (un cycle de 10 à 15 minutes et un cycle de 5 à 10 minutes entrecoupés d'une période de décongélation de 5 minutes) (58). L'utilisation synchrone de 6 cryosondes permet, dans les mêmes conditions, de détruire un volume sphérique de 80 mm de diamètre. Les études expérimentales ont démontré qu'une congélation rapide suivie d'une décongélation lente assurait une destruction complète des cellules tumorales soumises à une température inférieure à moins 20° Celsius (57).

La morbidité de la technique est bien connue. Dans une revue récente de la littérature (59) les résultats de 2713 patients porteurs de MH et traités dans 72 centres, ont été analysés. La mortalité péri-opératoire était de 1,5% (33 patients) dont 21% liée à un infarctus du myocarde (patients récusés pour la chirurgie) et 18,2% (6 patients) en rapport avec un cryochoc. Un cryochoc était observé dans 1,5% des cas. Il s'agit d'une complication grave et spécifique se manifestant sous forme de troubles métaboliques majeurs en rapport avec la nécrose tumorale induite par la cryothérapie (insuffisances respiratoire et rénale, troubles de la coagulation). Ce phénomène de cryochoc mettrait en jeu les mêmes médiateurs, cytokines, TNF α et interleukine 6 que le choc septique (60). L'élévation de ces médiateurs serait corrélée au volume de foie congelé, à la durée de congélation et à un clampage pédiculaire. Le seuil limite du volume de foie congelé au delà duquel le risque de cryochoc augmente serait de 200 cm³. Le taux de complications graves, liées le plus souvent aux fractures survenant à l'intérieur des glaçons en formation et qui peuvent aboutir après décongélation à de larges plaies hépatiques (équivalent à une fracture hépatique) (57), sont inférieures à 5% (59): hémorragie majeure, abcès intrahépatique, fistule biliaire ou biliome, complications pleurales,... Les autres complications mineures variaient de 6 à 33% suivant les séries (57, 58).

Siefert et al. (61) ont étudié le taux de récurrence après cryothérapie (85 patients): 33% dans le site de cryothérapie, principalement pour les tumeurs d'un diamètre supérieur à 3 cm, 65% dans le foie et 56% en extrahépatique (récurrences corrélées avec une non diminution du taux d'ACE en post-thérapeutique) après un suivi médian de 22 mois. Ce taux d'échec local était expliqué par les auteurs par un mauvais positionnement des sondes de cryothérapie et par un mauvais monitoring de la température. Ces deux critiques sont aussi valables pour la radiofréquence: en effet, la mesure de la température au contact de l'aiguille ou de la sonde

n'est pas le reflet de la température en périphérie de la lésion, ce d'autant plus que la lésion est volumineuse et que l'on veut créer une zone de nécrose au pourtour de la tumeur en tissu sain afin de se prémunir d'une récurrence locale. Rivoire et al. (58) rapportent un taux de récurrence locale de 18 % pour des tumeurs de plus de 5 cm de diamètre. Les auteurs contrôlent en peropératoire par échographie le bon positionnement des cryosondes ainsi que le bon déroulement de la procédure et la réalité des marges, permettant un succès dans 97 % des cas pour des tumeurs supérieures à 6 cm (62). Finlay et al. (63) ont rapporté une étude (rétrospective) comparant résection hépatique versus résection hépatique associée à la cryothérapie dans les MH de cancers colorectaux. Il n'y avait pas de différence de survie entre les 2 groupes de patients (50% avec une médiane de suivi à 20 mois, la médiane de survie globale étant de 33 mois).

Quatre études (64-67) ont comparé l'ablation par cryothérapie et par RF (tableau 2). Si la mortalité ne diffère pas entre les 2 techniques, la morbidité ainsi que le taux de récurrence locale sont plus importants dans 2 études pour le groupe traité par cryothérapie (64, 66). La cryothérapie semble supérieure pour traiter les tumeurs de plus de 4 cm de diamètre (65, 67), avec des taux de récurrences locales de 17 % contre 38 % pour la RF (65). Il est difficile de conclure quant à la supériorité de l'une de ces 2 techniques, les études étant hétérogènes avec souvent peu de malades. De plus le choix de la technique était fonction de la période, les auteurs étant passés à la RF après avoir débuté leur expérience par la cryothérapie car cette dernière technique était accessible depuis plus longtemps que la RF.

Tableau 2. Etudes comparatives non randomisées entre la cryothérapie et la radiofréquence (cryothérapie / radiofréquence)

	<i>Pearson et al.</i> (64)	<i>Bilchick et al.</i> (65)	<i>Adam et al.</i> (66)	<i>Joosten et al.</i> (67)
Malades (n)	54 / 92	240 / 68	31 / 33	30 / 28
Tumeurs (n)	88 / 138	762 / 181	42 / 43	69 / 72
Mortalité (%)	1,8 / 0 (ns)	3 / 2,5 (ns)	3,2 / 0 (ns)	3 / 3.6 (ns)
Morbidité (%)	41 / 3 (0,001)	11 / 10 (ns)	29 / 24 (ns)	30 / 11 (ns)
Récidives locales (%)	13,6 / 2,2 (0,01)	15 / 10 (ns)	53 / 18 (0,003)	9 / 6 (ns)
Suivi moyen (mois)	15 / 15	28 / 12	21 / 16 (ns)	25 / 26

ns: non significatif

La cryochirurgie est une technique plus lourde à mettre en œuvre que la RF et il est nécessaire de disposer d'une unité de réanimation avec possibilité de dialyse pour traiter le cryochoc. Elle permet par contre d'étendre les indications de traitement de MH des cancers colorectaux aux tumeurs plus volumineuses (68).

1.3.3. Ultrasons de haute énergie focalisés

C'est la seule technique qui soit extracorporelle, préservant les tissus environnants. Les fréquences s'étalent entre 1 à 4 MHz, créant des pics d'intensité allant de 100 à 1500 Watts/cm², pendant 1 à 10 secondes. Les ultrasons focalisés sont des ondes mécaniques créées par un transducteur piézocomposite entraînant une absorption brutale d'énergie au point focal (69). Les ultrasons focalisés provoquent des lésions tissulaires par 2 mécanismes. Le premier est la conversion de l'énergie mécanique en chaleur (entre 85 et 100 ° C), le

second est un phénomène de cavitation ou formation de microbulles de gaz pouvant entraîner l'implosion cellulaire (69, 70). Si les études expérimentales concluaient à la faisabilité, les premières études cliniques ont été un échec, sans effet sur la tumeur et avec de sévères brûlures cutanées (70). Grâce à la persévérance des équipes chinoises, des études cliniques ont démontré l'efficacité de cette technique(71, 72). Les ultrasons focalisés ont été utilisée pour la première fois en Europe, au Churchill Hospital (Oxford, United Kingdom), en 2004 (70). Une des limites de la technique est la proximité d'organes creux qui gênent la propagation des ultrasons focalisés (dôme hépatique et poumon), avec des risques de perforations (colon). Le temps de traitement est encore long, 1 heure pour une tumeur de 2 cm, surtout si l'on compare cette technique à la RF (70). Des recherches sont en cours, en particulier à Lyon, pour améliorer les performances des ultrasons focalisés.

La radiothérapie conformationnelle, asservie à la respiration, est elle aussi une technique extracorporelle. Herfath et al. ont rapporté leur expérience préliminaire avec un contrôle local dans 81 % des cas à 18 mois sur une série de 55 tumeurs (73, 74). L'amélioration continue de la précision balistique, avec la fusion d'images de tomoscintigraphie par émission de positons, devrait amener de nouvelles indications pour la radiothérapie conformationnelle.

1.4. Traitement des tumeurs hépatiques par radiofréquence

1.4.1 Efficacité thérapeutique

Les séries de la littérature sont récentes, les premières datant de 1996. Elles ne sont pas homogènes, comprenant souvent des métastases hépatiques de cancer colorectaux, des métastases hépatiques d'autres cancers, et des tumeurs primitives, principalement des hépatocarcinomes. Tous les types de matériel ont été utilisés, la marque Radionics® dominant puisqu'elle était la première disponible. Berchtold®, firme allemande a été principalement utilisée dans son pays d'origine. Ce sont souvent les mêmes équipes qui publient, le suivi et le nombre de patients augmentant avec leur expérience.

Le taux de nécrose tumorale varie de 45 à 75% dans les premières publications (75-77) pour s'améliorer avec l'expérience (de 71 à 98%) (46, 64, 78). Le taux de récurrence au niveau de la lésion traitée varie de 1,8% (avec, pour la même série, 28% de métastases à distance

dont 80% dans le foie) (46) à 12% (79, 80) voire plus pour les premières séries (22% pour Golberg *et al.* (81), 38% pour Solbiati *et al.* (82)). La grande variabilité de ce taux de récurrence locale d'une étude à l'autre peut être expliquée par l'hétérogénéité dans la taille des lésions traitées et dans la technique utilisée (électrodes de première ou seconde génération, ablation percutanée ou laparoscopique). L'expérience de l'opérateur pour la mise en place des aiguilles ou des électrodes a certainement une incidence sur le taux de récurrence locale. Le taux de récurrence locale est d'autant plus faible que la lésion est de petite taille (75), que la nécrose déborde la zone tumorale de plus de 5 mm (83) et que l'application de la RF se fait sous laparoscopie ou lors d'une laparotomie (qui permet un repérage échographique plus précis des lésions et un clampage des vaisseaux pendant la procédure) (46). Le suivi des patients doit être suffisamment long (au moins 3 ans) pour pouvoir apprécier le taux de récurrence locale après traitement par RF (42).

Récemment, les survies à long terme des patients traités par RF ont été rapportées (Tableau 3). La survie à 3 ans varie de 30 à 69 % et à 5 ans de 22 à 46 % (45, 84-89). Le taux de survie était meilleur chez les patients avec une seule lésion de moins de 2,5 cm de diamètre (56 % à 5 ans) que chez les patients avec une lésion supérieure à 2,5 cm (13 % à 5 ans) ou de multiples lésions (11 % à 5 ans; $P = 0,0002$, log-rank test) (45). Les survies à long terme obtenues chez les patients traités par RF seraient supérieures à celles obtenues chez les patients traités par chimiothérapie (45, 88). Toutefois, il faut attendre les résultats des essais prospectifs, en particulier l'essai de l'EORTC comparant chimiothérapie versus chimiothérapie plus RF chez les patients inopérables (Etude CLOCC 4004) (90). De plus, la RF peut se substituer à la chirurgie. Elias *et al.* ont utilisés la RF à la place de la chirurgie lors des réévaluations hépatiques chez 47 patients (91). Une étude rétrospective comparant 2 périodes successives a montré que la RF augmentait le pourcentage de traitements locaux curateurs des réévaluations après hépatectomie première de 17 à 26 % et diminuait le pourcentage de réhépatectomie de 100 à 39 %.

Tableau 3. Survie des patients traités pour des métastases hépatiques de cancer colorectal par radiofréquence

<i>Etudes</i>	<i>Année</i>	<i>Nombre patients</i>	<i>Taux (%) RL</i>	<i>Survie (%) à 1 ans</i>	<i>Survie (%) à 3 ans</i>	<i>Survie (%) à 5 ans</i>
Solbiati et al.(82)	1997	29	N/C	94	N/C	N/C
Lencioni et al.(79)	1998	29	23	93	N/C	N/C
Gillams et al.(86)	2000	69	N/C	90	34	N/C
De Baere et al.(92)	2000	68	9	81	N/C	N/C
Solbiati et al.(84)	2001	117	44	93	69	46
Solbiati et al.(85)	2003	166	41	96	45	22
Oshowao et al.(87)	2003	25	N/C	100	52	N/C
Abdalla et al.(88)	2004	57	9	92	37	N/C
Lencioni et al.(93)	2005	423	25	86	47	24
Berber et al.(89)	2005	135	46	N/C	30	N/C

RL: récurrence locale

N/C: résultats non communiqués

1.4.2. Mortalité et morbidité

1.4.2.1. Mortalité

Le taux de mortalité varie de 0,1 à 1,4 % (13, 14, 94-97), celui de la chirurgie hépatique étant par comparaison inférieur à 5 % dans les dernières séries (6). Les causes de décès sont l'hémopéritoine (14, 96), l'insuffisance hépato-cellulaire sur foie cirrhotique (13, 94, 97) ou après sténose de la voie biliaire droite (95, 96), le choc septique (95, 96), les perforations digestives (94, 96), la thrombose portale, principalement chez le patient cirrhotique (94) et les complications cardiaques (95).

1.4.2.2. Morbidité

Dans la revue de Mulier *et al.* (95), la morbidité pour 3670 patients dont les tumeurs avaient été traitées par RF était de 8,9 %. Ce taux varie de 1,5 à 10 % pour les plus grosses séries de la littérature (13, 14, 94, 96, 97), à comparer aux 15 – 30 % de morbidité de la chirurgie hépatique (6, 98, 99). Schématiquement, on peut subdiviser les complications: les complications secondaires à la mise en place de l'aiguille (hémorragie, hématome sous-capsulaire, ensemencement du trajet de ponction) et celles secondaires à l'hyperthermie ("dégâts collatéraux" de l'hyperthermie comme les perforations d'organes creux, les lésions biliaires, les cholécystites...), les complications majeures, nécessitant une hospitalisation et une thérapeutique invasive (chirurgie pour hémostase, drainage d'un abcès, d'un pneumothorax, thrombose portale...) et mineures, les complications précoces (insuffisance hépato-cellulaire, troubles métaboliques, hémorragie...) et tardives (sténoses biliaires, abcès, ...). La liste des complications qui suit ne saurait être exhaustive et le plus important reste leur prévention.

- hémorragie intrapéritonéale (0,3 - 1,6 %) (82, 94, 100),
- hématome intrahépatique (0,5 %) (14),
- brèche pleurale, pneumothorax, hémothorax, pleurésie surtout pour les lésions haut situées (0,8 %) (100, 101),
- insuffisance hépato-cellulaire (0,8 %) (94, 95)
- hémobilie (0,3 %) (96, 102),
- abcès intrahépatique (1,1 %) (80, 94)
- faux anévrisme artériel (0,6 %)(94),

- nécrose de la capsule hépatique avec risque d'ensemencement péritonéal (103),
- cholécystite aiguë (102),
- cavernome portal secondaire à une thrombose portale aiguë (0,2 - 2,2 %), la thrombose étant la conséquence de la radiofréquence au voisinage des structures hépatobiliaire (94, 95, 102),
- impossibilité de refermer l'aiguille à multiples électrodes et difficultés pour la retirer, le tissu ayant coagulé autour des électrodes (104),
- brûlures cutanées en regard des plaques de dispersion (nombre insuffisant de plaques, procédure trop longue entraînant un échauffement au niveau des plaques) (0,6 – 1,4%) (94, 95),
- ensemencement le long du trajet de l'aiguille, nodules de perméation au niveau du diaphragme (0,3 - 12 %) (14, 95, 105, 106),
- perforations d'organes creux (0,5 %) (94, 95)
- complications cardiaques (0,4 %) (14, 95)
- troubles métaboliques (0,6 %) (14)

Les douleurs et l'hyperthermie pendant les 3 jours suivant la RF sont présentes respectivement dans 63 et 42 % (97, 107).

Les complications septiques sont majorées en cas d'antécédents d'anastomoses bilio-digestives et sont une contre indication à toute RF pour l'équipe de l'Institut Gustave Roussy (94). Le risque de complications sur les vaisseaux hépatiques ou les voies biliaires est majoré en cas de lésions centrales (108, 109). La présence d'une cirrhose majore le risque de complications précoces (13), en particulier le risque de thrombose portal lors de clampages pédiculaires (94). Helton a décrit les facteurs techniques pouvant influencer le taux de complications (110). Ce sont le type de générateur, le type d'électrode, l'utilisation de sérum salé pour augmenter la conduction du courant électrique, le mode de délivrance du courant (automatique versus manuel, continu versus pulsé), le volume de tissu à détruire, le clampage pédiculaire, le type de guidage radiologique (échographie versus tomographie, 3D versus 2D, navigation peropératoire), les constantes de fin d'ablathermie et le type d'anesthésie. Les cliniciens doivent intégrer toutes ces données afin de diminuer la morbidité tout en étant efficace en terme de destruction tumorale. Enfin, Poon et al. (111) ont montré que la morbidité diminuait de 400 % après les 50 premiers cas de RF de leur équipe, validant le concept de courbe d'apprentissage pour la RF.

Bien que la RF soit une procédure relativement sûre et efficace, les données précédentes suggèrent aussi que les résultats s'améliorent avec l'expérience. Pour tout patient et surtout pour les patients présentant des facteurs de risques, les décisions doivent être prise par un comité de décision pluridisciplinaire intégrant un chirurgien hépatique et un radiologue interventionniste.

1.4.2.3. Morbidité biliaire

Le taux de complications biliaires varie de 1 à 20 % (92, 95, 112, 113). Plusieurs raisons expliquent cette variabilité entre les séries de la littérature: le taux de complications est plus important si le volume tumoral à détruire est plus grand (112), si les tumeurs à détruire sont de siège centrale (13) et si le suivi est suffisant car les complications biliaires sont de révélation tardive (94). Les complications biliaires sont soit des sténoses avec dilatation d'amont (92) soit des abcès biliaires (114), soit des biliomes ou des biliopéritoinies. Les complications tardives sont des atrophies hépatiques secondaire à des sténoses des canaux principaux biliaires ou des fistules bilioveineuses avec hémobilie (95). Ces complications peuvent être fatales soit par insuffisance hépato-cellulaire (14), soit par péritonite ou un biliome se drainant dans la plèvre (86) La plupart des auteurs recommandent une distance minimale de 1,5 à 2 cm à respecter par rapport à une voie biliaire intrahépatique pour pouvoir réaliser une ablathermie par radiofréquence sans risquer une complication biliaire (46, 64, 92, 115, 116).

Le but de la première partie de ce travail était de valider une technique de protection des voies biliaires intrahépatiques lorsqu'une ablathermie par RF était réalisée au contact de ces dernières. Un modèle expérimental de lésions biliaires a été mis au point chez le porc. Une fois ce modèle validé, nous montrerons que la perfusion des voies biliaires par du sérum glucosé froid permet de prévenir les lésions biliaires lors de la RF intrahépatique.

2. La thérapie photodynamique

2.1. Histoire de la thérapie photodynamique

L'utilisation de la lumière comme thérapeutique remonte à la plus haute antiquité. Elle était déjà employée par les égyptiens et les chinois bien avant notre ère pour le traitement de

différentes lésions cutanées comme le vitiligo, le psoriasis, certains cancers cutanés ou même des pathologies générales comme les psychoses. Cependant, le concept de "thérapie photodynamique", basé sur l'action conjuguée d'un photosensibilisant, de la lumière et de l'oxygène n'est apparu qu'au XX^{ième} siècle. Dès la fin du XIX^{ième} siècle, plusieurs études montraient que la prise de drogues ou de plantes, sans danger chez des patients ou des animaux même en grande quantité, pouvait s'avérer toxique suite à une exposition consécutive des individus à la lumière du soleil. Le premier essai visant à amplifier cet effet de la lumière fut effectué par Oscar Raab, étudiant en thèse sous la direction du professeur Von Tappeiner en 1897. Les travaux de Raab portaient sur l'influence de l'acridine et de ses dérivés sur des paramécies. Ses expérimentations montrèrent que les colorants utilisés étaient toxiques pour les paramécies en présence de lumière alors qu'ils étaient sans effet en absence de lumière (117). En 1902, Ledoux-Lebardis mit en évidence le rôle majeur de l'oxygène dans ces réactions en observant une augmentation de la toxicité induite après irradiation de paramécies incubées avec de l'éosine dans des boîtes de culture ouvertes par rapport à la même expérience mais réalisée dans des boîtes de culture fermées (118). Von Tappeiner fut le premier à employer le terme de "réactions photodynamiques" pour caractériser le phénomène observé (119).

A la recherche de nouvelles substances photoactives, Walter Hausmann étudia en 1911 les effets de l'hématoporphyrine (Hp), un dérivé de l'hème, sur des paramécies, des érythrocytes et des souris (120). Ce composé s'avéra efficace pour éradiquer de petites lésions cutanées liées au psoriasis à forte dose et associé à une irradiation aux UV (1937) (121).

L'accumulation et la rétention spécifiques de l'hématoporphyrine dans les tumeurs furent mises en évidence 1924 par Auler et Banzer chez l'homme (122) et Figge proposa alors l'hématoporphyrine comme photosensibilisant pour la thérapie photodynamique en raison de son activité majoritaire au niveau de la tumeur (123). L'hématoporphyrine, constituée d'un mélange complexe de porphyrines et d'impuretés fut purifiée en 1955 par Schwartz et al. (124). Le produit de purification, l'hématoporphyrine dérivée (HpD), fut testé premièrement par Lipson sur des animaux puis utilisé chez l'humain pour la détection de nombreux cancers.

La thérapie photodynamique a connu un essor au cours des années 70 avec les expérimentations de Thomas Dougherty qui démontra le bénéfice à long terme d'un traitement photodynamique avec l'HpD de tumeurs induites chez des rats et des souris mais aussi chez l'homme (125). L'HpD a donné naissance à de nombreux dérivés dont le plus connu est le Photofrin[®]. Ce photosensibilisant a été approuvé pour la première fois au Canada en 1993 pour le traitement du papillome de la vessie puis son utilisation s'est répandue en

1995 aux Etats-Unis, en Europe et au Japon pour traiter des tumeurs obstructives de l'œsophage, des tumeurs avancées de la tête et du cou, des tumeurs bronchiques ou encore gastriques. Le Foscan[®] a été approuvé en 2001 par la FDA puis en Europe pour le traitement des tumeurs avancées de la tête et du cou, le Metvix[®] pour le traitement des tumeurs cutanées basocellulaires (126, 127).

La recherche se concentre actuellement sur la compréhension des propriétés optiques des tissus et sur l'optimisation des protocoles d'irradiation, notamment sur les effets de l'administration fractionnée de drogue et de lumière ainsi que sur l'élaboration de nouveaux photosensibilisants (17).

2.2. Les réactions photochimiques

La photosensibilisation peut être définie comme un processus au cours duquel l'activation d'un chromophore (le photosensibilisant) par la lumière va modifier chimiquement une molécule différente (le substrat). Idéalement, le photosensibilisant devrait jouer un rôle de catalyseur : il devrait se régénérer suite à son interaction avec le substrat et ne devrait pas interférer avec l'issue de la réaction. En photobiologie et en photomédecine, le terme "d'action photodynamique" est réservé aux réactions de photosensibilisation consommant de l'oxygène moléculaire (128).

Les mécanismes de photosensibilisation sont initiés par l'absorption de lumière ($h\nu$) par un photosensibilisant (P), qui sous l'effet de cette irradiation, passe à un état excité (P*). En présence d'oxygène, deux réactions faisant intervenir le photosensibilisant à l'état excité entrent en compétition, les réactions de Type I et II. Selon la définition établie par Foote (129), le mécanisme de type I implique l'interaction directe du photosensibilisant à l'état excité avec le substrat (S) alors que dans un processus de Type II, le photosensibilisant à l'état excité réagit d'abord avec l'oxygène moléculaire pour former des espèces réactives de l'oxygène susceptibles d'initier d'autres réactions (Figure 2.1.)

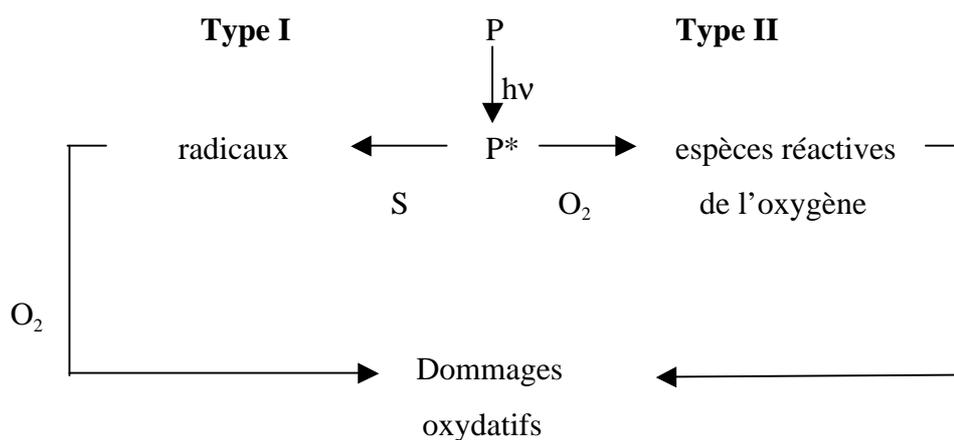


Figure 2.1.: Les réactions photochimiques de type I et II faisant intervenir le photosensibilisant à l'état triplet suite à son activation par la lumière.

Sous l'effet de l'irradiation lumineuse ($h\nu$), le photosensibilisant passe d'un état fondamental P_0 à un état singulet excité ($^1P^*$), de durée de vie courte, qui va être stabilisé par conversion interne (IC) au niveau d'excitation singulet de plus faible énergie $^1P^*$. Peu de réactions peuvent avoir lieu à partir de cet état électronique de la molécule en raison de sa faible durée de vie (10^{-9} s). Le plus souvent, $^1P^*$ rejoint un état triplet de plus faible énergie ($^3P^*$) par transition intersystème (ISC)(Eq. 1).



Dans son état triplet de durée de vie plus longue (10^{-6} à 1s en fonction de son environnement), le photosensibilisant est un agent très réactif qui va intervenir dans les réactions photochimiques de type I et II.

Un rendement quantique en état triplet élevé ainsi qu'un état triplet de longue durée de vie constituent donc des pré requis pour une photosensibilisation efficace (130).

2.2.1. Les réactions photochimiques de type I

Les réactions photodynamiques de type I se traduisent par la production de radicaux libres ou d'ions radicalaires suite au transfert d'électron ou d'hydrogène entre le photosensibilisant à l'état triplet et le substrat S (128).

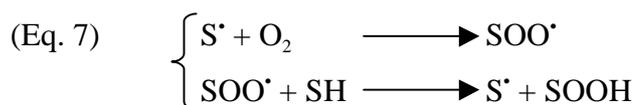
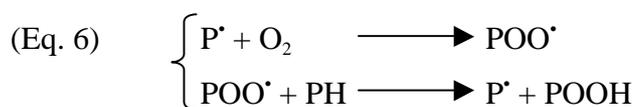
Le transfert d'électron peut s'effectuer du photosensibilisant vers le substrat (Eq. 2) ou du substrat vers le photosensibilisant (Eq. 3). Cependant, la plupart des substrats biologiques vont subir une oxydation (Eq. 3)



De la même manière, aussi bien le photosensibilisant à l'état triplet (Eq. 4) que le substrat (Eq. 5) peut jouer le rôle de donneur d'hydrogène.



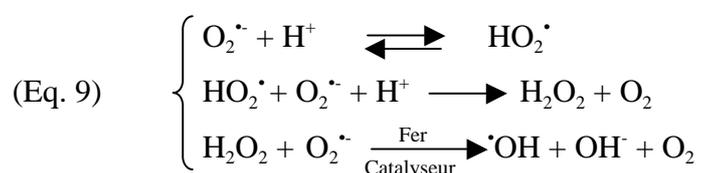
Les espèces radicalaires générées au cours des réactions de type I peuvent intervenir dans d'autres réactions. Les formes oxydées du photosensibilisant (Eq. 6) ou du substrat (Eq. 7) peuvent par exemple rapidement réagir avec l'oxygène moléculaire (O_2) présent pour former des radicaux peroxydes, initiant ainsi une chaîne d'auto-oxydation.



Les formes semi-réduites du photosensibilisant ou du substrat peuvent également interagir de manière efficace avec l'oxygène. Dans ce cas, le transfert d'électron qui a lieu entre les deux réactifs entraîne la formation de l'anion superoxyde, $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Eq. 8).



Une fois formé, l'anion superoxyde O_2^\bullet peut réagir directement avec différents substrats ou agir comme précurseur d'autres espèces réactives de l'oxygène (Eq. 9). Il intervient notamment dans la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle ($\bullet OH$). En conditions physiologiques, H_2O_2 est produit par dismutation de O_2^\bullet dont le principe repose sur la protonation de O_2^\bullet pour former son acide conjugué HO_2^\bullet , suivie par la réaction de HO_2^\bullet avec O_2^\bullet . Le radical hydroxyle peut être alors produit au cours de la réaction de Fenton entre le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'anion superoxyde O_2^\bullet .



Les réactions photochimiques de type I peuvent donc produire plusieurs espèces réactives intermédiaires. Même si l'oxygène n'est pas impliqué dans la première étape du mécanisme, sa présence dans l'environnement influence fortement les réactions chimiques suivantes. Les processus de type I induisent la formation d'espèces réactives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde (O_2^\bullet) et le radical hydroxyle ($\bullet OH$) qui sont reconnues comme puissants oxydants d'une grande variété de biomolécules telles que le cholestérol ou encore les chaînes latérales de certains acides aminés (tryptophane, histidine et méthionine) (131).

2.2.2. Les réactions photochimiques de type II

Dans les réactions photochimiques de type II, la présence d'oxygène est requise dès la première étape du processus (128). Dans ce cas, un transfert d'énergie s'effectue depuis le photosensibilisant à l'état triplet vers l'oxygène moléculaire. Le processus (Eq. 10) permet la régénération du photosensibilisant dans son état fondamental et conduit à la formation d'oxygène singulet (1O_2 ou $O_2(^1\Delta_g)$) qui correspond à l'état singulet de l'oxygène dont l'énergie est la plus faible.



L'oxygène diffère de la plupart des molécules organiques par sa multiplicité triple à l'état fondamental. La réaction 10 n'est possible que si l'énergie de l'état triplet du photosensibilisant est supérieure à l'énergie de l'oxygène singulet E_{Δ} . Comme cette énergie est relativement faible (94.5 kJ/mole) (132), un grand nombre de molécules sont susceptibles d'intervenir dans la génération d'oxygène singulet 1O_2 par un transfert d'énergie d'état triplet à état triplet.

Dans le cas d'une réaction de type II classique, le rendement quantique de production d'oxygène singulet par un photosensibilisant peut être déterminé à partir de la Figure 2.2. (133). Ce schéma résume les cinétiques de désactivations et de réactions possibles impliquant le photosensibilisant à l'état triplet: émission de phosphorescence, relaxation non radiative et interactions avec l'oxygène par désactivation physique ou par transfert d'énergie, ce dernier mécanisme conduisant à la formation d'oxygène singulet.

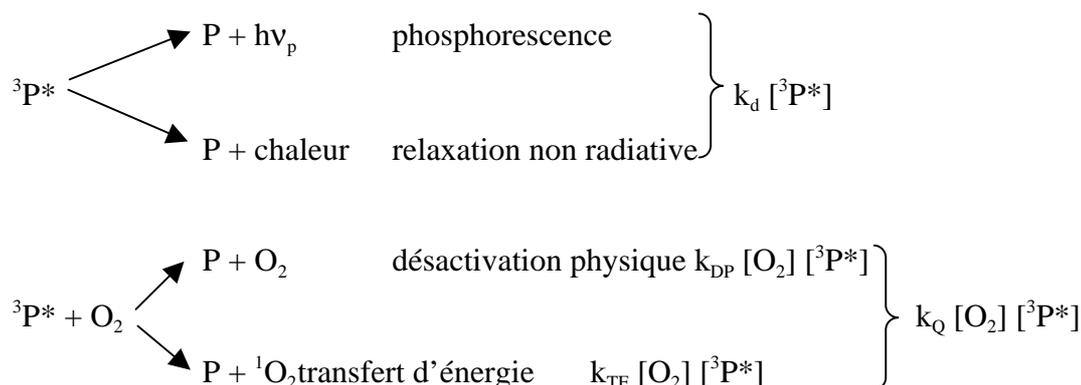


Figure 2.2.: Processus physiques et chimiques impliquant le photosensibilisant à l'état triplet excité, ${}^3P^*$, avec leurs constantes respectives.

Le calcul du rendement quantique en oxygène singulet (Φ_{Δ}) est alors donné par l'équation 11.

$$(Eq. 11) \quad \Phi_{\Delta} = \Phi_{ISC} F_Q S_{\Delta} \quad \text{où :}$$

Φ_{ISC} = rendement quantique de production de photosensibilisant à l'état triplet

F_Q = probabilité de désactivation de l'état triplet excité par réaction avec l'oxygène

$$F_Q = \frac{k_Q [O_2]}{k_d + k_Q [O_2]}$$

où la constante d'interaction de $^3P^*$ avec l'oxygène, k_Q , est égale à $k_{DP} + k_{TE}$, la somme des constantes de désactivation physique (k_{DP}) et de transfert d'énergie (k_{TE}) ;
 k_d : constante de désactivation de $^3P^*$ par mécanisme de phosphorescence ou émission non radiative.

S_Δ = probabilité que la réaction entre le photosensibilisant à l'état triplet et l'oxygène induise la formation d'oxygène singulet

$$S_\Delta = \frac{k_{TE}}{k_{DP} + k_{TE}}$$

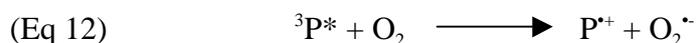
Dans le cas particulier où $k_d < k_Q [O_2]$, $\Phi_\Delta = \Phi_{ISC} S_\Delta$, qui est la forme de l'équation (11) la plus utilisée.

La réaction d'oxydation des molécules biologiques par l'oxygène singulet est très rapide. Le temps de demi-vie de l' 1O_2 est donc relativement court et varie de 4 μs dans l'eau à 25-100 μs dans les milieux organiques non polaires qui constituent un modèle des régions lipidiques des cellules (134). La distance de diffusion de l'oxygène singulet, également limitée, est comprise entre 0.01 et 0.045 μm dans le milieu cellulaire (135). Au niveau cellulaire, ces caractéristiques ont pour conséquence une relation étroite entre le site de génération de l'oxygène singulet et les structures endommagées (135).

Le rendement quantique de production d'oxygène singulet du photosensibilisant est un paramètre d'importance en PDT. Ce paramètre a déjà été reporté pour plus d'une centaine de molécules d'intérêt en biologie (136).

Un mécanisme alternatif d'interaction entre l'état triplet excité du photosensibilisant et l'oxygène moléculaire implique directement un transfert d'électrons. Cette réaction (Eq 12)

entraîne la production de l'anion superoxyde et de la forme radicalaire cationique du photosensibilisant mais reste cependant minoritaire en PDT.



2.3. La photodégradation des photosensibilisants

La plupart des photosensibilisants utilisés en thérapie photodynamique, tels que les porphyrines et leurs dérivés, subissent une dégradation progressive au cours de l'irradiation, appelée photoblanchiment, qui se traduit par une diminution de leur capacité à absorber la lumière (137, 138). Le photoblanchiment met en jeu deux mécanismes (139):

- la photodégradation, "*true photobleaching*", qui correspond à une modification profonde de la structure du photosensibilisant qui se fragmente, conduisant à la formation de plusieurs photoproduits n'absorbant pas ou peu la lumière visible.
- la phototransformation, "*photomodification*", qui correspond à une perte de l'absorbance ou de la fluorescence du photosensibilisant à certaines longueurs d'onde mais le chromophore est conservé. Elle conduit à la formation de nouveaux photoproduits absorbant dans le rouge.

Le phénomène de photoblanchiment est communément évalué par la mesure de la décroissance de fluorescence photoinduite du photosensibilisant. Cependant, les résultats obtenus par cette méthode doivent être interprétés avec précaution. En effet, la mesure de fluorescence ne reflète pas uniquement la photodégradation et les photomodifications subies par le photosensibilisant mais également les changements d'environnement du photosensibilisant. La migration du photosensibilisant d'un site de liaison à un autre au cours de l'irradiation, la photorelocalisation, contribue ainsi à la diminution de l'intensité d'émission de fluorescence et aux modifications observées dans la forme du spectre (140).

Dans la plupart des cas, les processus de photoblanchiment en PDT correspondent à une oxydation du photosensibilisant à l'état fondamental (P_{ox}). On distingue classiquement deux mécanismes de photoblanchiment, le premier faisant intervenir l'oxygène singulet (Eq. 13) et le deuxième des substrats oxydés ($S-O_2$) obtenus au cours des réactions photochimiques (Eq. 14) (141).

photodynamique avec le Photofrin® et la *m*-THPC en utilisant une faible dose de photosensibilisant associée à une forte dose de lumière (146, 147). Ces conditions permettent en effet le photoblanchiment de la faible quantité de photosensibilisant localisé dans les tissus sains avant même que des dommages sévères ne s'y produisent alors que le tissu tumoral, qui contient de 2 à 10 fois plus de photosensibilisant, peut être simultanément détruit (148). La diminution de la concentration de photosensibilisant induite par le photoblanchiment permet également de réduire la consommation photochimique en oxygène en cours d'irradiation dans le cas où cette espèce est responsable du photoblanchiment (143).

La phototransformation présente l'avantage d'induire la formation de photoproduits pouvant eux même servir de photosensibilisants avec des caractéristiques différentes des molécules dont ils dérivent (142, 149). La perte de l'efficacité dynamique liée au phénomène de photoblanchiment pourrait être partiellement compensée par une deuxième irradiation de la tumeur à une longueur d'onde permettant d'activer le photoproduit formé au cours de la première irradiation.

Le photoblanchiment rend les études de dosimétrie complexes. Traditionnellement, un traitement photodynamique peut être décrit par la dose de photosensibilisant administrée et la dose de lumière incidente. Il existe différentes façons de prendre en considération la manière dont les différents paramètres de dose affectent, et sont affectés, par la réponse du tissu au cours de l'irradiation. La première option consiste à mesurer chaque paramètre directement et indépendamment et à calculer une dose résultant de la combinaison de ces paramètres en utilisant un modèle de réponse à la PDT basé sur ces variables. Cette méthode qui incorpore de manière explicite toutes les variables de dose est appelée "dosimétrie explicite". La seconde option, la "dosimétrie implicite", consiste à utiliser une variable qui incorpore de manière implicite quelques uns ou de préférence tous les paramètres de dose, permettant de s'affranchir de leur mesure directe. La mesure du photoblanchiment est en particulier intéressante dans le concept de dosimétrie implicite. Il peut en effet être utile de prendre en considération la relation existant entre l'interaction des espèces réactives de l'oxygène avec le photosensibilisant d'une part (photoblanchiment), et avec les tissus cibles du traitement d'autre part. En effet, si les dommages biologiques et le photoblanchiment impliquent des processus faisant intervenir la même espèce, la mesure du photoblanchiment peut devenir un outil de mesure des dommages biologiques. Cette relation a été reportée pour plusieurs photosensibilisants dont les mécanismes de photodommages et de photoblanchiment font intervenir l'oxygène singulet (150-152).

2.4. Les photosensibilisants

2.4.1. Propriétés idéales d'un photosensibilisant

L'HpD et ses dérivés purifiés comme le Photofrin[®], le Photosan[®] et le Photohem[®] ont été les premiers photosensibilisants utilisés en PDT et sont référencés comme photosensibilisants de première génération (153). Ces composés présentent néanmoins plusieurs inconvénients majeurs. Leur faible sélectivité associée à une clairance lente induit une photosensibilisation cutanée de plusieurs semaines; leur faible absorption dans le rouge rend difficile le traitement des tumeurs profondes; ces composés sont des mélanges complexes dont la composition est difficile à reproduire et complexifie les études dose-réponses (154).

Ces inconvénients ont permis de définir dans les années 80 les propriétés d'un bon photosensibilisant (149):

- la toxicité du photosensibilisant à l'obscurité doit être nulle ou faible.
- le photosensibilisant doit présenter une bonne sélectivité tumorale ainsi qu'une clairance rapide afin de limiter les effets secondaires du traitement liés à la photosensibilisation générale.
- le photosensibilisant doit également avoir une composition constante et être de préférence une substance pure facile à synthétiser.
- le rendement quantique en état triplet du photosensibilisant doit être élevé. L'état énergétique de l'état triplet doit être supérieur à l'énergie requise pour générer de l'oxygène singulet (94,5 kJ / mol), et la réaction de transfert d'énergie entre ces deux molécules doit être la plus efficace possible.
- enfin le photosensibilisant doit posséder une absorption optimale dans le rouge entre 650 et 800 nm, là où les tissus sont les plus transparents à la lumière. Son absorption doit être faible dans les longueurs d'ondes du rayonnement solaire.

2.4.2. Les photosensibilisants de deuxième et de troisième générations

Les photosensibilisants de seconde génération ont été développés de manière à pallier les défauts des photosensibilisants de première génération. Les caractéristiques de ces

composés en font ainsi de bons candidats pour l'utilisation en thérapie photodynamique. En plus d'une certaine stabilité et de leur faible toxicité en absence de lumière, les photosensibilisants de seconde génération présentent une forte absorption des longueurs d'onde situées dans la zone rouge du spectre ainsi qu'un bon rendement quantique en oxygène singulet (Φ_{Δ}). Cette dernière caractéristique se traduit par un fort rendement quantique en état triplet du photosensibilisant (Φ_t) de demi-vie élevée et d'état énergétique (ΔE_t) suffisant pour permettre la formation d'oxygène singulet (155).

Une majorité de photosensibilisants testés en clinique possèdent une structure tétrapyrrolique. C'est le cas de la tetra-(hydroxylphenyl)porphyrine (m-THPP) ou de la tetra(sulfonatophenyl)porphyrine (p-TPPS₄) obtenues par une addition de groupements au noyau pyrrole qui permettent d'augmenter sa stabilité et ses capacités d'absorption dans le rouge (128). Les phtalocyanines et les naphthalocyanines sont quant à elles issues de l'extension du système π macrocyclique de porphyrines qui permet également l'amélioration de leurs critères de stabilité et d'absorption. La *zinc phthalocyanine* (ZnPc) présente notamment un bon rendement quantique d'oxygène singulet et sa commercialisation est en cours (156). Les chlorines et les bactériochlorines, issues de la simple ou double réduction de liaison de la porphyrine correspondante pourraient devenir les photosensibilisants de seconde génération de référence en PDT (157, 158). La meta-tetra(hydroxylphenyl)chlorine (*m*-THPC, Foscan[®]) a été approuvée pour traiter certains cancers et la tin etiopurpurine (SnET₂) est sur le point d'être commercialisée (17). La meta-tetra(hydroxyphenyl)bacteriochlorine (*m*-THPBC) permet le traitement de tumeurs fortement pigmentées en raison de sa forte absorption dans le rouge (159). Le LuTex appartient à la classe des texaphyrines constituée par des porphyrines dont le noyau pyrrole a été substitué par un noyau phényle (156).

Ces photosensibilisants sont d'origine synthétique totale mais d'autres sont synthétisés à partir de substances naturelles. Parmi ces composés, on trouve les dérivés de benzoporphyrine (BPD) ou les bactériochlorophylles, produits à partir de bilirubine et de chlorophylle respectivement (156). L'hypericine est une phenantropérylénequinone hydroxylée, présente en grand nombre dans les plantes de genre *Hypericum* (160). L'hypericine est utilisée à la fois pour le diagnostic des tumeurs vésicales par fluorescence et leur traitement (160-162).

Une stratégie alternative consiste à utiliser la protoporphyrine (Pp), un photosensibilisant endogène produit au cours de la biosynthèse du protohème dont l'étape limitante est la formation d'acide 5-aminolevulinic (ALA). L'apport exogène d'ALA permet

d'accroître la synthèse de Pp et son administration peut s'effectuer par voie topique, limitant ainsi la photosensibilisation cutanée. L'ALA fut le premier photosensibilisant de seconde génération à être commercialisé (17).

Les photosensibilisants de troisième génération sont des photosensibilisants de deuxième génération modifiés de manière à favoriser leur accumulation préférentiellement dans les cellules tumorales. Ces modifications se traduisent par une addition de groupements chimiques (acides aminés, protéines, polymères, hydrates de carbone ou encore par l'introduction du photosensibilisant dans des liposomes (163).

2.4.3. La 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)bactérochlorine (*m*-THPBC)

La *m*-THPBC (Figure 2.3.) dérive de la méso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrine. Sa découverte et sa synthèse chimique ont été réalisées par Bonnet *et al.* (149). Au contraire de la plupart des PS qui sont excités avec des longueurs d'onde comprise entre 630 et 652 nm, la *m*-THPBC a une forte absorbance dans l'infrarouge (740 nm) (164). Des nouvelles perspectives thérapeutiques ont été alors imaginées concernant la PDT des tumeurs profondes ou situées dans des organes pigmentés. Bonnet *et al.* ont montré que, pour une même dose de photosensibilisant administré, la profondeur de nécrose chez des souris BALB/c porteuses de tumeur PC6 était de $3,79 \pm 0,28$ mm pour la *m*-THPC et $5,22 \pm 1,21$ mm pour la *m*-THPBC (149). Le diamètre de nécrose est plus large après irradiation de foie traité par *m*-THPBC (93 ± 8 mm²) comparé à la *m*-THPC (26 ± 4 mm²) ou au Photofrin (34 ± 11 mm²) (159).

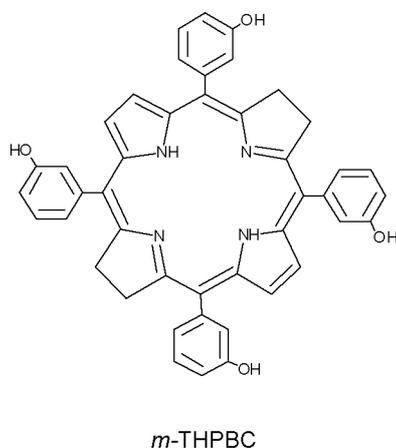


Figure 2.3. Structure de la 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)bactérochlorine

La *m*-THPBC est connue pour être un composant très instable (158). Une étude comparative de la *m*-THPBC et de la *m*-THPC dans une solution de méthanol-eau (3:2, v/v) a démontré un photoblanchiment 90 fois plus important pour la *m*-THPBC (149). Rovers *et al.* ont montré que le photoblanchiment était 20 fois plus grand que pour la *m*-THPC chez des souris porteuses de tumeurs Colo26 (164). Cette photodégradation rapide peut être un avantage, car elle diminue la toxicité générale du PS (164). Lassalle *et al.* ont étudiés la photodégradation de la *m*-THPBC. L'irradiation d'une solution fraîche de *m*-THPBC conduit à une transformation de 50 % de la *m*-THPBC en *m*-THPC (165). Mais pour une irradiation 6 heures après la préparation de *m*-THPBC, seulement 5 % de la *m*-THPBC était transformée en *m*-THPC. Les caractéristiques cinétiques de photoblanchiment et de photodégradation de la *m*-THPBC sont donc à prendre en compte pour la PDT avec ce nouveau photosensibilisant (165).

La *m*-THPBC a un pic d'absorption dans l'infrarouge à 740 nm mais aussi dans la portion verte du spectre, à 517 nm dans l'éthanol et 525 nm dans l'eau (158). Cela permet l'utilisation de la *m*-THPBC pour le traitement des lésions superficielles d'organes creux comme l'œsophage, sans risquer de perforation.

2.5. L'oxygène, élément clé du déroulement des réactions photodynamiques

L'efficacité de la thérapie photodynamique dépend de manière critique de la présence d'oxygène (166). Sa disponibilité peut être intrinsèquement compromise dans les cellules tumorales localisées au delà de la limite de diffusion de l'oxygène à partir des vaisseaux ou dans les zones localisées autour des vaisseaux soumis à des changements transitoires de perfusion (167). La variation de la pression partielle en oxygène intratumoral (pO_2) induite par la PDT est un phénomène complexe. Le traitement peut induire aussi bien une diminution qu'une augmentation la pO_2 au cours de l'irradiation (168, 169). La diminution de la pO_2 en cours d'irradiation serait directement liée à la consommation photochimique en oxygène. Cette consommation peut être associée ou non à une diminution du flux sanguin liée à des dommages vasculaires aigus. L'augmentation de la pO_2 serait la conséquence de vasospasmes mais également d'une consommation métabolique plus faible en raison de la destruction d'une partie des cellules tumorales au cours de l'irradiation.

2.5.1. La consommation en oxygène au cours de la PDT

Les réactions photochimiques produites au cours de la PDT consomment l'oxygène à une vitesse suffisamment importante pour qu'une partie du volume tumoral traité entre en hypoxie et qu'ainsi, une fraction des cellules se trouve protégée des dommages causés par l'oxygène singulet (170). Le modèle de consommation et de diffusion d'oxygène établi par Foster montre que la PDT appliquée à 50 mW/cm^2 consomme l'oxygène moléculaire à une vitesse de $6 \text{ }\mu\text{M/s}$ en milieu aqueux à $9 \text{ }\mu\text{M/s}$ en environnement lipidique (170). D'après le modèle de Foster, la diffusion de l'oxygène à partir des capillaires sanguins ne peut compenser ce phénomène en plus de la consommation métabolique des cellules tumorales ($1,7 \text{ }\mu\text{M/s}$). La distance de diffusion initiale estimée à environ $200 \text{ }\mu\text{m}$ autour des vaisseaux peut être ainsi réduite de moitié au cours d'une irradiation réalisée avec une intensité de lumière de 50 mW/cm^2 (170).

La consommation photochimique au cours de l'irradiation se traduit généralement par une diminution de la pression partielle en oxygène ($p\text{O}_2$) associée à une augmentation des zones hypoxiques dans la tumeur. La déplétion en oxygène au cours du traitement a été évaluée *in vitro* dans un modèle de tumeur non vascularisée, le sphéroïde (171), mais également *in vivo*, avec le Photofrin® (172), la *m*-THPC (173, 174), l'ALA (175) ou la verteporphine (176). Les tumeurs retrouvent leur degré initial d'oxygénation immédiatement après la fin de l'irradiation lorsque le traitement n'a pas induit de dommages vasculaires aigus (172). Mais lorsque les réactions photochimiques ont simultanément endommagé les vaisseaux, il se peut que l'hypoxie tumorale persiste (174). Les travaux de Pogue ont cependant montré que dans certaines conditions de traitement avec l'ALA-PpIX et la BPD-MA, la $p\text{O}_2$ intratumorale augmentait significativement au cours de l'irradiation. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une augmentation du flux sanguin accompagnée d'une diminution de la consommation métabolique en oxygène liée à la mort cellulaire induite au cours du traitement (168, 169).

2.5.2. Utilisation de moyens permettant de pallier la déplétion en oxygène au cours de la PDT

2.5.2.1. Application de faibles irradiances

L'application d'une lumière de faible irradiance permettrait de diminuer la vitesse de consommation photochimique en oxygène au cours du traitement, d'étendre la formation d'oxygène singulet à un volume tumoral plus important et d'augmenter ainsi l'efficacité de la PDT (170). Plusieurs études montrent en effet que la dose de lumière délivrée à faible irradiance permet d'accroître l'efficacité du traitement (177-179). Néanmoins, seulement quelques unes établissent une corrélation claire entre l'irradiance appliquée, la consommation en oxygène et l'efficacité thérapeutique. *In vivo*, la mesure de la concentration en oxygène au cours du traitement photodynamique a montré que l'application de faibles irradiances permettait de maintenir la pO_2 tumorale à un niveau proche de sa valeur initiale, avec pour conséquence, des délais de recroissance tumorale plus longs comparés à ceux obtenus avec les mêmes doses de lumière mais administrées à une irradiance plus forte (173, 174, 178).

2.5.2.2. Fractionnement de l'irradiation

Une autre méthode permettant de pallier la déplétion photochimique en oxygène au cours du traitement photodynamique consiste à fractionner l'irradiation. La dose de lumière est administrée selon un protocole alternant des cycles lumière/obscurité, de manière à ce que la déplétion en oxygène induite par la lumière au cours de l'illumination soit compensée par la diffusion d'oxygène par les capillaires pendant les périodes d'obscurité, et qu'ainsi, l'oxygène ne soit pas un facteur limitant des réactions photochimiques. Hening et al. (180) ont estimé que la vitesse de consommation en oxygène était respectivement de 2 et 6 fois celle de la vitesse de réoxygénation. Ces mesures, ainsi que la distance intercapillaire permettent d'ajuster la durée de la période d'obscurité (170, 181). Foster *et al.* ont ainsi montré que la dose de lumière délivrée selon des périodes d'illumination de 30 secondes suivies de périodes d'obscurité de 60 secondes permettait d'accroître significativement l'efficacité de la PDT avec le Photofrin® sur des tumeurs mammaires greffées chez la souris (170). Le bénéfice de ce protocole a également été mis en évidence sur des tumeurs induites par les UVB chez la souris SKH-HR1 sensibilisées par l'ALA (182, 183). L'irradiation doit être interrompue avant que la dose-seuil de dommage aux vaisseaux ne soit délivrée, de manière à ce que la diffusion de l'oxygène pendant la période d'obscurité ne soit pas limitée (182, 183). En plus d'une réoxygénation des tissus, la période d'obscurité permet, dans ce cas, la synthèse

supplémentaire de PpIX et contribue de cette manière à potentialiser l'effet du traitement pendant la seconde illumination (184). Tsutsui *et al.* (185) ont montré que le fractionnement de la lumière pouvait accroître l'efficacité de la PDT avec la *m*-THPC chez le rat, de 20 % sur un modèle de tissu sain et de 10% sur un modèle tumoral, dans le cas où une forte irradiance est appliquée. A faible irradiance, le fractionnement de l'irradiation est sans effet bénéfique par rapport à l'irradiation continue; les auteurs suggèrent que dans ces conditions, la vitesse de consommation photochimique en oxygène n'est pas suffisamment élevée pour que la période d'obscurité soit bénéfique (185).

2.5.2.3. Compensation de l'hypoxie préexistante

L'application de faibles irradiances ou le fractionnement de l'irradiation présentent l'inconvénient de ne compenser que la déplétion en oxygène induite au cours de l'irradiation. L'inhalation continue de carbogène (95% O₂ + 5% CO₂) à un débit compris entre 2,5 et 3 L/min permet de compenser également l'hypoxie tumorale préexistante par augmentation du degré de saturation de l'hémoglobine en oxygène et d'augmenter l'efficacité de la PDT avec le Photofrin® (186). L'inhalation d'oxygène normobarique, ou hyperbarique induisait aussi une augmentation significative de la pO₂ dans des tumeurs d'adénocarcinome mammaire induites chez la souris et que cette augmentation s'accompagnait d'une meilleure réponse à la PDT avec le Photofrin® (186). L'hypoxie tumorale liée à l'anémie peut être traitée par administration préalable d'érythropoïétine (EPO) dans le but d'accroître l'efficacité du traitement photodynamique avec le Photofrin® chez la souris porteuses de tumeurs Colo26 (187).

2.6. Les mécanismes de photodestruction des tumeurs par la PDT

La destruction tumorale par la thérapie photodynamique résulte de l'action combinée de deux mécanismes :

- un effet *direct* létal de la PDT sur les cellules tumorales.
- un effet *indirect* de la PDT sur la vascularisation tumorale, qui se manifeste par i) une altération de la perfusion des tumeurs, ii) l'induction d'une réponse immunitaire et inflammatoire qui potentialise l'efficacité directe du traitement.

Ces effets cellulaires, vasculaires et immunitaires s'influencent mutuellement, produisant une multitude de réponses possibles. Leur combinaison est requise pour contrôler les tumeurs à

long terme, mais leur contribution respective dans la réponse globale n'a pas encore été clairement établie (16).

2.6.1. Dommages cellulaires

Suite au traitement photodynamique, les cellules peuvent mourir par nécrose ou par apoptose. En général, la voie nécrotique est induite lorsque les cellules sont exposées à de fortes concentrations de photosensibilisant associées à des doses de lumière importantes, à l'origine de dommages cellulaires particulièrement sévères (16). La localisation subcellulaire des photosensibilisants influence également fortement le mode de mort cellulaire. Les espèces réactives de l'oxygène possèdent un temps de demi-vie court et par conséquent, leur distance de diffusion est considérablement réduite. Les sites primaires de photodommages sont donc étroitement liés à la localisation subcellulaire des photosensibilisants (188). De manière générale, la photoactivation de photosensibilisants localisés dans les lysosomes et la membrane plasmique induit la mort des cellules par nécrose, alors que celle des photosensibilisants localisés dans les mitochondries induit l'apoptose. La mitochondrie est en effet l'organite cellulaire central impliqué dans le processus de mort cellulaire. La mitochondrie assure la production de l'énergie (ATP) nécessaire au fonctionnement cellulaire et à l'entrée des cellules en apoptose (16). Cependant, l'intensité des photodommages au niveau mitochondrial peut influencer le mécanisme de mort cellulaire. Des dommages mitochondriaux sévères sont plutôt susceptibles de conduire les cellules à la mort par nécrose.

La distribution subcellulaire des photosensibilisants est en particulier influencée par leur degré d'hydrophobicité. Les photosensibilisants hydrophobes possèdent une forte affinité pour les membranes plasmiques, à travers lesquelles ils peuvent diffuser passivement. Ces photosensibilisants peuvent ensuite se localiser dans les membranes mitochondriales. C'est le cas des porphyrines dérivées de l'hématoporphyrine (Photofrin®) (189). Les photosensibilisants hydrophiles (mono-L-aspartyl chlorure e6, tetraphenylporphyrine et *aluminium phthalocyanin* tri et tétra sulfonés TPPS₃, TPPS₄, AlPc S₃, AlPc S₄) ne diffusent pas au travers de la membrane plasmique et sont incorporés par endocytose. Ils sont retrouvés de manière préférentielle dans les lysosomes. La charge des photosensibilisants modifie leur caractère hydrophobe et par conséquent leur localisation subcellulaire. Ainsi, la TPP et l'AlPc mono ou disulfatés sont plus hydrophobes, et plutôt localisés dans le cytoplasme après diffusion membranaire (190).

L'état d'agrégation des photosensibilisants, leur concentration extra et intracellulaire ainsi que les protocoles d'incubation sont des paramètres également susceptibles d'influencer leur localisation subcellulaire (191).

La plupart des photosensibilisants d'intérêt en PDT se lient aux différentes membranes cytoplasmiques. L'accumulation des photosensibilisants dans le noyau cellulaire semble extrêmement restreinte et reste peu décrite (192).

2.6.2. La nécrose

La nécrose est un processus de dégénérescence cellulaire passif, initié par des dommages aux différentes membranes cellulaires.

Les photosensibilisants lipophiles et anioniques se localisent préférentiellement au niveau des membranes. Dans les minutes suivant l'exposition à la lumière, ces photosensibilisants induisent la peroxydation du cholestérol membranaire ainsi que d'autres phospholipides insaturés. Ces dommages sont à l'origine de phénomènes d'enfllement et de bourgeonnement, de la libération de vésicules contenant des enzymes membranaires, d'une diminution du transport actif, d'une dépolarisation de la membrane plasmique, d'une inhibition de l'activité des enzymes membranaires telles que l'ATPase à Na^+K^+ (193), une augmentation de la concentration en Ca^{2+} (194) ainsi qu'une modulation de la régulation des antigènes de surface (195). La perte de l'intégrité membranaire et de l'homéostasie ionique conduit rapidement les cellules à la mort par nécrose.

La nécrose peut également survenir après photoactivation de photosensibilisants agrégés ou hydrophiles localisés préférentiellement au niveau des lysosomes et des endosomes suite à leur incorporation par endocytose et/ou par pinocytose. L'exposition à la lumière de lysosomes sensibilisés induit leur perméabilisation avec libération du photosensibilisant et des enzymes hydrolytiques fonctionnelles dans le cytosol (196).

Les membranes mitochondriales et parfois nucléaires sont également sévèrement endommagées par l'oxydation liée au traitement photodynamique (197). Varnes *et al.* ont montré que la libération de cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol induisait l'inhibition de la respiration cellulaire suite à de fortes doses de PDT avec la phtalocyanine-4 (198). Elle interrompt la chaîne de transport des électrons ainsi que la phosphorylation oxydative. Ces évènements induisent une augmentation du taux d'espèces réactives de l'oxygène ainsi qu'une réduction de la production d'ATP (199). Les cellules dépourvues d'énergie meurent ensuite rapidement par nécrose (200).

L'étude des mécanismes de lyse cellulaire indique que les dommages oxydatifs des protéines de transport membranaire induisent une modification rapide de l'homéostasie des ions Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} . La libération de ces ions hors des cellules est généralement associée *in vivo* à des réactions inflammatoires aiguës nécessaires au contrôle à long terme des tumeurs (201).

2.6.3. L'apoptose

Contrairement à la nécrose, l'apoptose est un processus de suicide cellulaire étroitement régulé, contrôlé par des signaux à la fois intra et extra-cellulaires et conduisant à des modifications cellulaires biochimiques et morphologiques. Le mécanisme apoptotique, qui nécessite de l'énergie (ATP), conduit au démantèlement systématique des cellules en corps apoptotiques, phagocytés *in vivo* par les macrophages ou par les cellules tumorales environnantes qui les catalysent ultérieurement. Les cellules apoptotiques se distinguent par un rétrécissement de leur taille, une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN, et par la formation de corps apoptotiques (202).

L'élément précoce du déclenchement de l'apoptose semble être la libération du cytochrome c à partir de la mitochondrie. La perte du cytochrome c, accompagnée ou non de la perte du potentiel membranaire mitochondrial, conduit à l'activation de la caspase-3 par formation d'un complexe avec APAF-1 ("*apoptosis activating factor*"), dATP et la procaspase 9 (Figure 2.4.). Les caspases sont à l'origine des éléments biochimiques conduisant à l'apoptose et peuvent être irréversiblement activées de manière autocatalytique ou par des enzymes de spécificité similaire. Suite à un signal pro-apoptotique, une caspase initiatrice (pro-caspase 8 ou 9) peut activer des caspases effectrices (caspase 3, 6 ou 7), responsables de la désorganisation cellulaire. Elles inactivent en effet des protéines impliquées dans la réparation et la réplication de l'ADN, et dans l'épissage de l'ARN messager, détruisent les lamines avec pour conséquence une condensation de la chromatine, clivent les protéines du cytosquelette et affectent par conséquent, la structure et l'adhésion cellulaire. Différentes caspases initiatrices peuvent être activées par divers stimuli, néanmoins, à certains points de la cascade enzymatique, ces événements convergent et les mêmes caspases effectrices sont activées. Ceci explique pourquoi différents stimuli apoptotiques ont pour conséquence les mêmes altérations morphologiques (203).

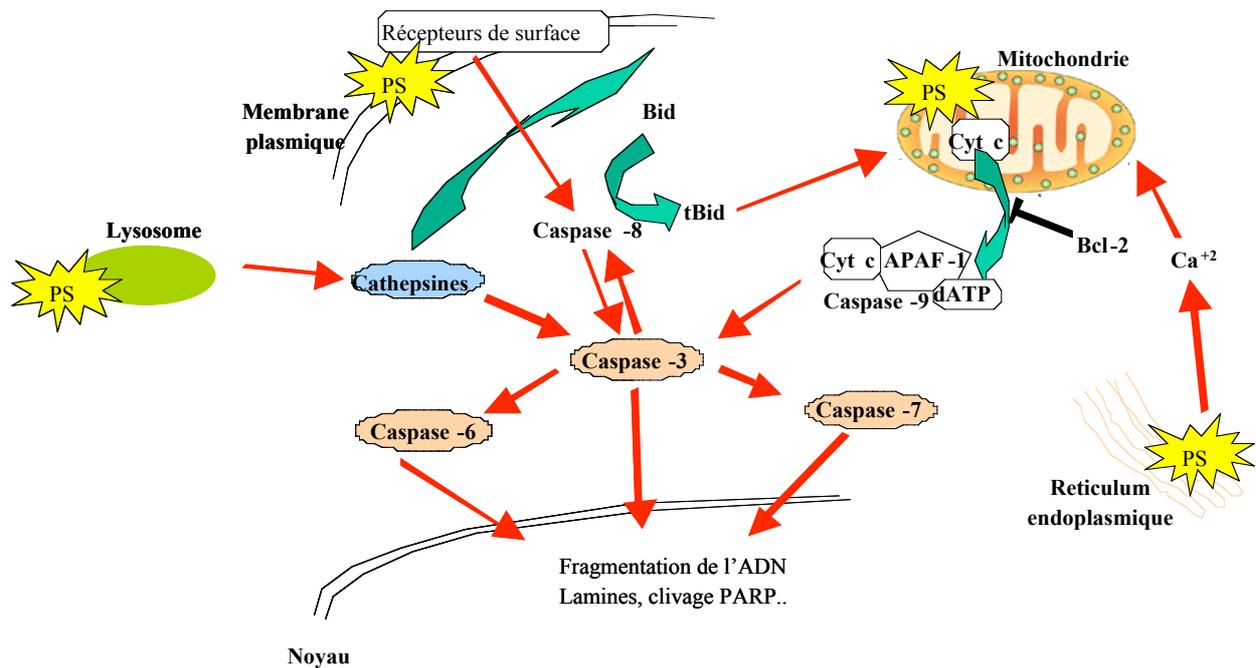


Figure 2.4. Les principaux mécanismes impliqués dans l'apoptose suite à la photoactivation d'un photosensibilisant localisé au niveau de la membrane plasmique, des lysosomes, des mitochondries ou du réticulum endoplasmique. Adapté d'après (202).

La photoactivation d'un photosensibilisant localisé au niveau des mitochondries (16) peut conduire rapidement la cellule à l'apoptose, suite à la libération de cytochrome c dans le cytoplasme où il interagit avec APAF-1 et active les caspases apoptotiques (Figure 4). Il semble que ce mécanisme soit l'élément central impliqué dans l'induction de l'apoptose par la PDT. Dans un nombre de cas restreint, le gène codant pour la procaspase-3 impliquée dans la voie de l'apoptose est muté, et peut induire une résistance relative à l'apoptose. Mais même dans ce cas, les cellules traitées par PDT peuvent entrer en apoptose par l'intermédiaire de l'activation des autres caspases (-2, -6, -7 et -8) présentes (202). La voie centrale impliquant la caspase-3 pourrait être fortement modulée par les niveaux relatifs des homologues des protéines pro et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, dont certaines constituent des cibles des réactions photodynamiques. Pour les photosensibilisants localisés dans les lysosomes, les cathepsines relarguées suite aux photodommages peuvent activer la protéine Bid susceptible de promouvoir l'apoptose au niveau de la mitochondrie par l'intermédiaire de la caspase-3 ou de l'inhiber par clivage de cette même caspase. L'apoptose peut également résulter de

photodommages induits au niveau du réticulum endoplasmique, par libération de Ca^{2+} qui va agir sur les mitochondries, ou par l'altération de certains récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique (202).

La cinétique d'apoptose dépend d'une grande variété de facteurs, dont la dose d'agent inducteur et la capacité des différents types cellulaires à franchir les étapes successives du mécanisme. Le pourcentage de cellules apoptotiques peut donc varier avec le temps après initiation du processus (204).

2.6.4. Dommages vasculaires

Le flux sanguin est le moyen d'apporter aux tissus et aux tumeurs l'oxygène et les nutriments indispensables à leur survie. La PDT peut induire une altération du système vasculaire qui alimente la tumeur, la privant ainsi de l'oxygène et des nutriments. Dans ce cas, les dommages vasculaires induisent indirectement la mort des cellules tumorales par ischémie (205).

2.6.4.1. Les mécanismes des dommages vasculaires

L'effet vasculaire de la thérapie photodynamique a été observé pour la première fois au travers de chambres transparentes implantées sur des rats porteurs de tumeurs mammaires et permettant de visualiser les changements morphologiques des vaisseaux sanguins pendant et après le traitement (206). Ces expériences associées à des mesures de flux sanguin ont montré que la PDT induisait une occlusion des vaisseaux et par conséquent, une ischémie vasculaire et tumorale (206). Les dommages vasculaires mettent en jeu plusieurs mécanismes complexes qui s'influencent mutuellement. Ces mécanismes sont schématisés sur la Figure 5 et décrits de manière détaillée dans les paragraphes suivants.

Une altération des cellules endothéliales au cours du traitement semble être à l'origine des modifications observées au niveau vasculaire (205). La PDT provoque des modifications de l'organisation des protéines du cytosquelette dans des cellules endothéliales humaines consécutivement à l'induction d'un influx calcique cellulaire (207). L'altération des protéines du cytosquelette modifie la forme des cellules qui s'arrondissent et se contractent, avec pour conséquence l'interruption des jonctions cellulaires, la perte des communications intercellulaires ainsi que l'exposition de la matrice extracellulaire et de la membrane basale (205). L'exposition de la membrane basale est un signal d'activation des plaquettes et des

neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) qui viennent adhérer sur la paroi de l'endothélium et réduisent le diamètre luminal (Figure 5). Sous l'effet de leur adhésion, les plaquettes libèrent de manière importante une molécule vasoactive, le thromboxane (Tx) qui contribue à amplifier l'agrégation plaquettaire et qui constitue également un puissant vasoconstricteur (167). La formation d'espaces entre les cellules endothéliales contribue aussi à réduire la perfusion tumorale en augmentant la perméabilité vasculaire et donc la fuite des éléments du sang hors des vaisseaux (208, 209). Les veinules sont en grande majorité dépourvues des muscles lisses présents au niveau des artérioles et montrent par conséquent moins de phénomènes de vasoconstriction au cours de la PDT (210). La contraction des vaisseaux est réversible dans le cas où le traitement est administré en dessous d'une certaine dose, de fortes doses induisant des dommages irréversibles (167, 211).

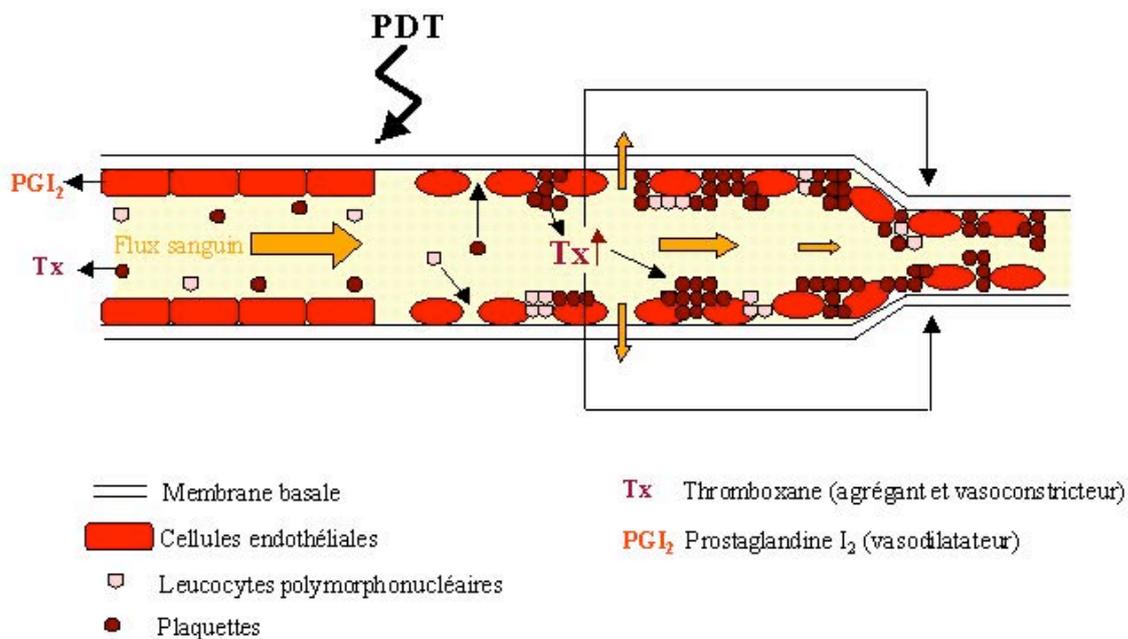


Figure 2.5. Représentation schématique de l'incidence de la PDT sur la vascularisation. La PDT induit la contraction des cellules endothéliales, la fuite des composés du sang hors des vaisseaux, l'agrégation des leucocytes polymorphonucléaires et des plaquettes, et modifie l'équilibre existant entre la production de PGI₂ (vasodilatatrice) par les cellules endothéliales et celle de thromboxane (vasoconstricteur) par les plaquettes en faveur du Tx.

La conséquence majeure des dommages vasculaires induits par la PDT est une réduction de la perfusion du tissu traité. La combinaison de l'occlusion vasculaire et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire affecte profondément la perfusion, de manière temporaire ou définitive (Figure 5). La réduction de la perfusion tumorale en cours d'irradiation accroît l'hypoxie générée par les réactions photodynamiques et peut limiter l'efficacité de la PDT. Cependant, dans la majorité des cas, la diminution de la perfusion tumorale induite par la PDT contribue au contrôle de la tumeur à long terme. Dans le cas d'une diminution ou d'un arrêt provisoire de la perfusion tumorale, il a en effet été montré que le stress oxydatif important généré par le phénomène d'ischémie-reperfusion permettait d'augmenter l'efficacité du traitement. Korbélik *et al.* ont montré sur un modèle de fibrosarcome que le taux tumoral de xanthine oxydase, enzyme clé de l'ischémie-reperfusion, augmentait de 5 fois immédiatement après PDT avec le Photofrin® (212). L'ischémie-reperfusion joue un rôle essentiel dans les processus d'induction de la réponse inflammatoire dont la contribution à l'efficacité de la PDT a été largement décrite (16, 213).

2.6.4.2. Facteurs influençant la réponse vasculaire à la PDT

La réponse vasculaire au traitement photodynamique est multifactorielle et son intensité dépend en particulier de l'intervalle drogue-lumière appliqué et de l'irradiance de la lumière administrée.

2.6.4.2.1. L'intervalle drogue-lumière (IDL)

L'intervalle drogue-lumière détermine la biodistribution du photosensibilisant dans le compartiment vasculaire et dans les cellules tumorales au moment de l'irradiation. Il constitue ainsi un paramètre essentiel dans la contribution relative des dommages vasculaires. L'interdépendance existant entre l'intensité des dommages vasculaires et l'intervalle drogue-lumière semble liée à la différence de solubilité des photosensibilisants et par conséquent, à leur pharmacocinétique (214). Les photosensibilisants modérément ou fortement lipophiles présentent une forte activité vasculaire peu de temps après leur administration, au moment où leur concentration est importante dans le sérum. C'est le cas de la benzoporphyrine dérivée (BPD) dont l'amplitude de l'effet vasculaire est inversement proportionnelle à l'intervalle drogue lumière appliqué. Fingar *et al.* ont ainsi montré que la diminution du diamètre luminal était maximale pour un IDL de 5 min chez des rats porteurs de chondrosarcomes et irradiés de 5 min à 3h après administration de la BPD (215). Des travaux similaires sur des bronches de porc ont également mis en évidence un effet vasculaire important pour l'IDL le plus court

testé (5 min) (216). L'hypericine présente aussi une action vasculaire accrue 30 min après son injection, au moment où sa concentration est maximale dans les vaisseaux de tumeurs RIF-1 induites chez la souris. Cet effet vasculaire est fortement atténué lorsque le photosensibilisant se localise de manière diffuse dans les cellules tumorales, 6h après son injection (217).

Pour tous ces photosensibilisants, l'intensité de la réponse vasculaire a été corrélée à l'efficacité globale de la PDT. La découverte de photosensibilisants à activité exclusivement vasculaire a conduit les chercheurs à les appliquer pour traiter d'autres pathologies que le cancer qui nécessitent la destruction locale de la vascularisation. Un dérivé de la BPD, la BPD-MA (ou verteporfine), est en particulier prometteur dans le traitement de certaines dégénérescences maculaires liées à l'âge (218).

2.6.4.2.2. L'irradiance appliquée

L'effet de l'irradiance de la lumière sur la vasoconstriction et la stase vasculaire a été étudié sur des animaux sensibilisés avec du Photofrin® (25 mg/kg) et irradiés 24h après à 75 ou à 50 mW/cm². Les résultats ont montré une diminution de la réponse vasculaire à la PDT chez le groupe traité avec une irradiance de 50 mW/cm², où aucune modification du diamètre du diamètre des artérioles, des veinules ou de la vascularisation tumorale n'a été mise en évidence, contrairement à ce qui a été observé chez le groupe d'animaux traités à 75 mW/cm² (205). L'intensité de la vasoconstriction ainsi que l'incapacité des vaisseaux à récupérer est proportionnelles à l'irradiance appliquée (210, 219). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'application d'une faible irradiance permet de maintenir l'intégrité vasculaire au cours du traitement photodynamique.

2.6.5. Dommages immunitaires

Parallèlement aux dommages induits aux cellules tumorales et à leur vascularisation, une forte réaction inflammatoire a été mise en évidence après traitement photodynamique. La PDT est associée à une production massive de cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10, le TNF α , et le G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), possédant un puissant pouvoir chimiotactique des cellules de l'inflammation (220-222). Outre l'altération de l'endothélium à l'origine de la production accrue de médiateurs de l'inflammation (223), l'élément majeur déclenchant la réaction inflammatoire serait la photooxydation des lipides membranaires des cellules tumorales (224). Il a en effet été montré que la libération massive

de fragments lipidiques et de métabolites de l'acide arachidonique induisait le recrutement et l'activation des cellules effectrices de l'inflammation (225).

La plupart des cellules du système immunitaire incorporent le photosensibilisant et peuvent subir des dommages suite à l'irradiation (226). Korbelik *et al.* ont cependant montré que le Photofrin® ou la benzoporphyrine dérivée présentaient un pic d'incorporation dans une population de macrophages associés aux tumeurs dans des proportions 9 fois supérieures aux concentrations retrouvées dans les cellules tumorales (227). Cette accumulation préférentielle serait liée à la forte capacité des macrophages à phagocyter le photosensibilisant sous un état agrégé ou en association avec des lipoprotéines plasmatiques.

Une augmentation massive de neutrophiles (200 fois) a été mise en évidence dans les 5 minutes suivant le traitement photodynamique avec le Photofrin® (228). Ces cellules phagocytaires seraient activées au niveau du site irradié afin d'éliminer les débris de cellules générés par la PDT. La présence des neutrophiles serait au moins partiellement dépendante de la présence de G-CSF lui-même induit par l'IL-1 (229). La PDT stimulerait donc l'activité anti-tumorale des neutrophiles avec l'aide de l'IL-1 et du G-CSF. La déplétion de neutrophiles réduit de 70% l'effet curatif de la PDT avec le Photofrin®, démontrant l'importante contribution des neutrophiles à l'efficacité du traitement (226). Des résultats similaires ont été obtenus en ajoutant des cellules de carcinome traitées par PDT à des macrophages *in vitro* (230), et supportent ainsi l'hypothèse selon laquelle les macrophages seraient préférentiellement activés par les débris cellulaires plutôt que directement par la PDT. Ces cellules participent activement à l'effet curatif de la PDT (231). Après phagocytose et traitement des débris cellulaires, les macrophages peuvent fonctionner comme cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (227). Contrairement à d'autres traitements comme la radiothérapie, la PDT induit la formation rapide de débris de cellules susceptibles d'accroître l'incorporation et la présentation des antigènes tumoraux par les cellules présentatrices de l'antigène associées à la tumeurs. Ces événements peuvent ensuite impliquer les lymphocytes, comme décrit par Abdel-Hady après PDT avec l'ALA (232). La réponse immunitaire systémique qui s'ensuit peut induire la destruction des cellules tumorales restantes, la destruction ou la prévention de métastases par développement d'une réponse immunologique à mémoire, ouvrant la voie à la vaccination *in situ* (233-235).

2.7. La thérapie photodynamique en pratique clinique

Des milliers de patients ont été traités par PDT au cours des 20 dernières années, mais la plupart des essais incluaient un petit nombre de patients, ces études étant des phases I et II. Il est alors difficile de tirer des conclusions définitives. Le nombre de centres exploitant cette technologie est réduit car cette procédure requiert non seulement un matériel spécifique mais aussi le concours de physiciens (153). De plus l'interprétation des résultats publiés dépend de beaucoup de variables: type de photosensibilisant, dose de lumière (ou fluence exprimée en Joules), énergie de la lumière (J/cm^2), longueur d'onde, durée d'illumination, concentration du photosensibilisant, intervalle drogue – lumière, méthodes de mesure de la lumière, type de laser, ...

2.7.1 Cancer de l'œsophage

La PDT a montré son efficacité dans les tumeurs de l'oesophage obstructives entraînant une dysphagie. Dans une étude randomisée avec 236 patients, la PDT avec le Photofrin[®] (ester dihématoporphyrine) a montré des résultats similaires à l'utilisation du laser YAG sur la dysphagie mais avec moins de complications (1 % après PDT vs 7 % après laser YAG $p < 0,005$) et un taux supérieur de réponses complètes et partielles supérieures (32 % après PDT vs 20 % après laser YAG, $p < 0,05$) (236). L'association PDT radiothérapie est une alternative thérapeutique chez les patients avec une tumeur avancée de l'œsophage. Une étude non randomisée, a comparé la PDT avec HpD associée à la brachythérapie versus brachythérapie seule, les 2 groupes recevant par ailleurs une radiothérapie externe (237). Les patients du premier groupe avaient une amélioration significative de la dysphagie par rapport au groupe de patients traités par radiothérapie exclusive. Le taux de complications après PDT et radiothérapie étaient de 9 % (4 perforations oesophagiennes et 4 fistules oesotrachéales survenant plusieurs mois après le traitement) et concernaient des patients porteurs de tumeur T4. Pour les auteurs, la PDT était un traitement palliatif efficace, mais nécessitait une meilleure sélection des patients (237). La PDT avec le Photofrin[®] est aussi un traitement efficace lorsque survient de nouvelles obstructions oesophagiennes chez des patients déjà porteur de stent oesophagien (238). La FDA a approuvé l'utilisation du Photofrin[®] pour le traitement palliatif des patients avec des cancers oesophagiens obstructifs ou partiellement obstructifs et ne pouvant pas être traités correctement par le laser YAG (239).

La PDT avec le Photofrin® a montré son efficacité dans le traitement des dysplasies de haut grade et des cancers de l'œsophage T1 non opérables (240-243). Les dysplasies de haut grade disparaissent dans 80 % des cas avec une diminution significative du développement de cancers œsophagiens par rapport à un traitement par oméprazole (9 % versus 19 %)(241). Les petits cancers (Tis ou T1) non opérables peuvent être traités par PDT, avec 84 % de stérilisation avec un recul médian de 2 ans (243, 244). La radiothérapie peut être associée à la PDT si la lésion persiste après 2 séances de PDT, avec 82 % de stérilisation (240). Les séquelles de la PDT sont des sténoses œsophagiennes, survenant dans 12 % et 30 % des cas après respectivement 1 et 2 séances de PDT (240, 242). La surveillance des patients traités pour dysplasie de haut grade est importante car le risque de développer un cancer sous la muqueuse régénérée existe (243).

2.7.2. Cancer pulmonaire non à petites cellules

La PDT est un traitement palliatif efficace des obstructions bronchiques tumorales, même après chimiothérapie ou radiothérapie, permettant une diminution de l'obstruction de plus de 50 % chez plus de 80 % des patients (245). Une étude comparative avec le laser YAG a montré un taux de désobstruction identique mais une durée de réponse plus longue dans le groupe traité par PDT(246). Une invasion des gros vaisseaux ou un antécédent de traitement par radiothérapie et curithérapie sont des contre indications à la PDT car le risque d'hémoptysie fatale est élevé (247).

Les patients présentant une petite tumeur endobronchique et contre indiqués pour une chirurgie ou une radiothérapie en raison d'une insuffisance respiratoire, peuvent être traités par PDT. Les taux de stérilisations varient de 83 à 90 % avec un recul supérieur à 5 ans (248-250).

2.7.3. Les cancers ORL

La PDT avec le Photofrin® est un traitement des cancers in situ et T1 du larynx et de la sphère ORL avec des réponses complètes de 100 % et 80 à 95 % de stérilisation avec un suivi de 37 à 44 mois (251, 252). Les tumeurs plus avancées T2 et T3, répondent au traitement mais récidivent dans un grand nombre de cas (252). Le traitement par PDT doit donc être considéré comme palliatif pour ces tumeurs avancées (239). La PDT peut être une alternative en cas de

récidive locale après un premier traitement par radiothérapie comme l'ont montré Tong et al. (253). Une approche différente des patients présentant une récidive locale est de réaliser la PDT lors de l'exérèse chirurgicale afin d'obtenir des marges saines. Biel et al. ont ainsi traité 10 patients porteurs de récidives par chirurgie suivie de PDT peropératoire. Seul 3 patients sur 10 ont présenté une réévolution (254).

2.7.4. Les tumeurs de vessie

Les tumeurs traitées par PDT sont surtout les carcinomes in situ et les tumeurs pTa et pT1 (154). L'HpD intraveineuse ou sa fraction oligomérique permettent d'obtenir des taux de rémission complète à trois mois variant de 57 (255) à 100 % (256) avec une moyenne de 69 % sur l'ensemble des études (154). Ce taux tombe à 45 %, avec des suivis allant de 3 mois (255) à 110 mois (257). Dans ces études, la majorité des patients avaient déjà été traités préalablement par résection transurétrale, chimiothérapie ou immunothérapie intravésicale ou radiothérapie, ce qui représente un biais défavorable de recrutement. Les effets secondaires sont une cystite inflammatoire habituellement transitoire, mais des nécroses étendues urothéliale et musculaire ont été décrites, conduisant à une microvessie pouvant nécessiter une cystectomie (256). Le problème majeur de la PDT vésicale est de pouvoir standardiser le traitement (154). La PDT trouverait une indication logique pour les tumeurs superficielles multifocales, avec administration d'un photosensibilisant sélectif des tissus tumoraux afin de diminuer les effets secondaires locaux, la voie d'administration intravésicale étant privilégiée afin de réduire les effets secondaires systémiques (154).

2.7.5. Les tumeurs cutanées

La PDT est une excellente technique pour traiter les kératoses actiniques multiples et étendues. La FDA a approuvé son traitement par voie locale grâce à l'acide delta-aminolevulinique ou ALA (239). Son nom de commercialisation est le Levulan® aux Etats Unis (contenant 20 % d'ALA) et Metvix® en Europe (Méthyl ester d'ALA, avec une meilleure biodisponibilité). La PDT par ALA permet de traiter les maladies de Bowen, les carcinomes basocellulaires superficiels avec 87 % de rémission complète avec un recul de 3 à 36 mois (258-260), avec un bon résultat cosmétique dans les localisations cutanées difficiles. Par

contre la PDT a moins d'efficacité pour les basocellulaires nodulaires et n'est pas indiquée pour traiter les carcinomes spinocellulaires.

2.7.6. Les cholangiocarcinomes hilaires

Plusieurs études ont comparés, dans les cholangiocarcinomes hilaires non résécables, le traitement de référence à savoir la prothèse biliaire, à ce même traitement associé à la PDT avec Photofrin® (261-264). La qualité de vie était significativement améliorée dans le groupe PDT car le taux de changement de prothèse pour obstruction était plus faible (263). L'impact sur la survie globale a été montré dans les études rétrospectives et prospectives mais sans que cela n'empêche la progression de la maladie (262, 264). Les survies à 1 an, 2, 3 et 4 ans étaient respectivement de 47 %, 21 %, 11 % et 5 % (262). La seule réserve à l'étude de Ortner et al. (médiane de survie de 493 jours vs 98 jours, $p < 0,0001$), tenait à une survie particulièrement médiocre dans le groupe drainage simple, laissant supposer un drainage inefficace (264). L'étude de Cheon a cependant confirmé ces résultats en montrant une amélioration de la survie dans le groupe traité versus un groupe non traité dont la survie était plus en accord avec les résultats d'un drainage biliaire efficace (558 jours versus 288 jours, $P < 0,02$) (265).

Une nouvelle approche se développe, l'utilisation de la PDT en préopératoire car le taux de récurrence après chirurgie R0 est de 76 %. Le but est d'obtenir des marges saines. Une seule étude a été publiée avec un taux de survie sans récurrence à 1 an de 83 %, toutes les marges étant saines (266).

2.7.7. Les tumeurs du pancréas

Plusieurs études expérimentales ont montré la faisabilité de la PDT sur les tumeurs pancréatiques (267-270). Il est possible de détruire des tumeurs pancréatiques chez le rat sans complications majeures, le tissu pancréatique sain et les structures adjacentes (voies biliaires, vaisseaux, duodénum) cicatrisant (271). Cette protection du tissu sain lors de la PDT des tumeurs pancréatiques est peut être due à une neutralisation du PS dans le tissu pancréatique par une molécule non présente dans la tumeur comme le glutathion (267, 272). Une étude clinique utilisant le Foscan® a été rapportée à propos de 16 patients contre indiqués pour la chirurgie (272). La survie médiane était de 9,5 mois après le traitement et 44 % des patients

étaient vivants à 1 an. Les complications, 2 hémorragies par érosion de l'artère gastro duodénale et 3 sténoses duodénales, ont toutes été traitées médicalement. L'utilisation de la PDT par voie écho endoscopique trans-digestive a récemment fait l'objet d'une étude préliminaire chez l'animal (273). Le traitement local de tumeurs pancréatiques chez des patients inopérables est faisable par PDT mais sa place doit être précisée par rapport à la radio chimiothérapie.

2.7.8. Les autres indications

Les autres indications de la PDT sont les récurrences de carcinome épidermoïde du col utérin au niveau du fond vaginal chez des patientes traitées antérieurement par radiothérapie (274), les extensions pleurales de carcinome pulmonaire (275) avec une médiane de survie de 21 mois (276), mais avec un risque de fistule oesophago-pleurale (277). Des études incluant des carcinomatoses péritonéales d'origines diverses ont montré des médianes de survie de 21 mois (278, 279) mais il est difficile de conclure en l'absence d'études randomisées. Quelques études ont montré un bénéfice de la PDT en per-opératoire après excision de tumeurs cérébrales comme les gliomes ou les glioblastomes malins sur la survie et le taux de récurrence locale (280-282). Des études prospectives randomisées sont en cours.

La PDT semble être un traitement efficace sur les lésions préneoplasiques ou les petits cancers et peut être une alternative efficace en situation palliative dans les stades avancés. L'utilisation peropératoire adjuvante de la PDT après résection chirurgicale de lésions cérébrales ou ORL, mériterait des études supplémentaires. Un des facteurs limitant intervenant dans la faisabilité de la PDT est la pénétration du rayonnement lumineux dans le tissu cible. La pénétration optique des tissus est maximale pour les longueurs d'onde rouges et infrarouges proches (283). La pénétration dans les tissus très pigmentés comme le foie ne dépasse guère 1 à 8 mm selon le photosensibilisant utilisé (283, 284), jusqu'à 10 mm en PDT intersticielle (127). Les photosensibilisants les plus étudiés sont le Photofrin® et la *m*THPC, et sont activés à des longueurs d'onde respectivement de 632 et 652 nm, ce qui limite la pénétration de la lumière dans les tissus. Seul la *m*THPBC, activée avec une longueur d'onde de 740 nm, permet une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus, même fortement pigmentés comme le foie (164). Vogl et al. sont les premiers à avoir rapporté l'utilisation de la *m*THPBC en clinique humaine pour traiter des métastases hépatiques de cancers colorectaux

par PDT intersticielle (18, 285). Le but de notre travail était d'étudier la pharmacocinétique de la *m*THPBC dans le foie sain et tumoral à partir d'un modèle expérimental de xéno greffe hépatique d'une lignée d'adénocarcinome humaine chez le rat nude.

RESULTATS

RESULTATS

1. Etude des lésions biliaires induites par la radiofréquence et prévention de ces lésions

Si le taux de complications biliaires majeures secondaires à une ablathermie par RF est bas (95), c'est parce que les tumeurs centrales ou hilaires proche ou contre les vaisseaux portes et les voies biliaires principales ne sont pas des bonnes indications. Le flux sanguin protège les vaisseaux de gros calibre en évacuant la chaleur produite par la RF (108, 286). Par contre, l'ablathermie par RF au contact des voies biliaires induit des lésions irréversibles, source de complications précoces ou tardives, qui peuvent être fatales (14).

Le but de cette étude est (i) de mettre au point un modèle expérimental de lésions biliaires par RF puis (ii) de prévenir ces lésions en perfusant les voies biliaires par du sérum glucosé froid lors de l'ablathermie par RF.

1.1. Modèle expérimental de lésions biliaires lors de la réalisation d'une ablathermie hépatique par RF

Notre étude de modèle expérimental chez le porc sain a été publiée dans *European Surgical Research* (2004; 36: 88-94) que nous reproduisons ci-après.

Biliary Lesions during Radiofrequency Ablation in Liver

Study on the Pig

F. Marchal^{a,e} D. Elias^b P. Rauch^a A. Leroux^c J. Stinès^d J.L. Verhaeghe^a
F. Guillemin^a J.P. Villemot^e

Departments of ^aSurgery, ^cPathology and ^dRadiology, Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy,
^bDepartment of Surgery, Institut Gustave Roussy, Villejuif, and ^eLaboratory for Experimental Surgery,
Nancy University, School of Medicine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Key Words

Biliary tract damage · Radiofrequency ablation liver ·
Experimental study · Histological lesions

Abstract

Background: Radiofrequency (RF) is a method of in situ destruction of liver tumor. Biliary complications are bile ducts stenosis or biliary abscess. The aim of this work was to study consequences of liver RF on bile ducts. **Methods:** A porcine model of biliary lesions was created using radiofrequency ablation liver. Twenty-two pigs were used for the study. The RF RITA 1500 generator (RITA Medical Systems, Mountain View, Calif., USA) was used for all experiments. The needle was positioned under sonographic control in liver parenchyma beside bile ducts. Two lesions were performed in left liver. Four groups of 5 pigs were treated. The pigs were sacrificed 1 or 3 weeks after the procedure. Pringle maneuver was utilized in half of the RF procedures. An ex vivo cholangiogram was obtained by direct injection into the main bile duct. Samples of RF lesions of liver parenchyma near and at a distance from the RF lesions were taken for pathological studies. **Results:** Radiological lesions were biliary stenosis, with or without upstream bile duct dilatation, or complete interruption of the bile duct, or

extravasation of the radiological contrast agent. Histological lesions of bile ducts were observed near RF lesions and at distance of the RF lesions when a Pringle maneuver was used or when the liver was removed after 3 weeks. **Conclusions:** RF ablation in contact of the intrahepatic bile duct induced biliary lesions. Therefore, it is required to stay away from the bile duct or to protect it when performing RF ablation.

Copyright © 2004 S. Karger AG, Basel

Introduction

Radiofrequency (RF) ablation is a physical way of destroying locally malignant hepatic tumors. The RF current is a sinusoid current of 400–500 kHz that mobilizes the ions contained in the tissue [1]. This ionic excitement causes the heating of the tissue. When temperature exceeds 60°C for a few seconds, the cell deterioration is irreversible due to protein destruction [2, 3]. Hepatic resection is the gold standard treatment for primary and secondary liver cancer. Only 5–20% of the patients, with hepatic metastases or with primary tumors, can undergo resection [4–6]. Today RF ablation of hepatic tumors is reserved to patients who cannot have a resection. They can be inoperable for general reasons (associated pathol-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2004 S. Karger AG, Basel
0014-312X/04/0362-0088\$21.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/esr

Frédéric Marchal, MD
Department of Surgery, Centre Alexis Vautrin
Avenue de Bourgogne
FR-54511 Vandœuvre-lès-Nancy (France)
Tel. +33 3 8359 8451, Fax +33 3 8359 8547, E-Mail f.marchal@nancy.fnclcc.fr

ogies, inadequately viable liver tissue that would remain after operation, etc.), or for technical impossibility (multiple lesions in 2 lobes of the liver, lesions in contact of vascular or biliary structures, lesions centered in the liver). Today's literature shows a morbidity rate of 3–17%, proper to the RF [1, 7–10]. Biliary complications can be either stenosis with dilatation upwards the bile duct [1, 11] or biliary abscesses [12]. The authors recommend a minimum distance of 1.5–2 cm from the bile duct when performing an ablation, without any risk of biliary complication [1, 13–16]. This experiment has been performed in order to make a histological and radiological study concerning the consequences on the intrahepatic bile duct when performing RF ablation in contact of a main intrahepatic bile duct in the pig.

Methods

Animal of Experiment

Twenty-two pigs of butcher French hybrid (54EYL) type, 12–14 weeks old, with an average weight of 32.8 ± 2.1 kg were used. After their arrival, each group of pigs was kept in sheds for 7 days prior to any experiment. All the animals received care in accordance with the legal requirements in France. All the procedures were performed in the laboratory for experimental surgery (UPRES EA 2403) at the Faculty of Medicine of Nancy (Vandœuvre-lès-Nancy). With except for a 12-hour period prior to each anesthetic episode, pigs were allowed ad libitum access to food and water throughout the study.

Radiofrequency Materials

The RF device: RF generator RITA[®] 1500 model (RITA Medical Systems, Inc., Mountain View, Calif., USA), monopolar 460 kHz, 150 W at 50 Ω . Two dispersive electrodes (700-101441; RITA Medical Systems) were placed on the anterior face of the pig back legs. We used a Starburst XL[™] (RITA Medical Systems), 15 gauge, 15 cm long, with 7 retractable arrays. The needle was insulated on its whole length except for the distal 0.5 cm of the tip (radiofrequency energy radiates from the distal 1 cm of the tip) allowing us to ablate the needle track when retracting the electrode at the end of the procedure. Four of the 7 electrode arrays have thermocouples that monitor the tissue temperature in real time. Impedance of the necrosed zone and the power delivered by the generator were displayed in real time on the generator screen. The preoperative settings of the generator (target temperature, impedance, power delivery, time set, control mode, thermocouple selection) were saved on the computer.

Procedure, Anesthesia and Wake-Up

Premedication was performed by injecting intramuscular ketamine hydrochloride (Ketalar[®]; Parke-Davis, Courbevoie, France) associated to midazolam (Hypnovel[®]; Roche, Neuilly-sur-Seine, France) and atropine sulphate (Atropine Laboratory Aguettant[®]; Aguettant, Lyon, France) at respective doses of 22 mg/kg and 0.25 mg. The pig was put on a drip in one of its ear veins. A dose of 2 mg/kg of 1% propofol (Diprivan[®]; Astra-Zeneca, Rueil Malmaison, France) was administrated just before intubation with a catheter of

6.5-French (Willy Rusch, Waiblingen, Germany). The pig was in a dorsal decubitus position. Anesthesia was sustained by halothane (Halothane Belamont[®]; Belamont, Paris, France) concentrated at 1.5%. Ventilation was assisted by a respiratory Monal A[®] type (Compagnie Française de Produits Oxygènes, Paris, France) with a 50% mix air/oxygen. The current volume was 15 ml/kg with a respiratory frequency of 18–20 insufflations per minute. The antibioprophyllaxis was performed by intravenous administration of 750 mg of cefamandol (Kefandol[®]; Lilly France, St Cloud, France) prior to the cutaneous incision, a second identical dose of cefamandol being injected during the closure of the laparotomy. One gram of propacetamol (Pro-dafalgan[®]; Upsa, Agen, France) was administered 20 min before the end of the surgical procedure by intravenous slow perfusion, this in an analgesic aim. Monitoring during anesthesia and wake up was assured by ECG Hewlett Packard 78353A (Agilent Technology, Palo Alto, Calif., USA).

Surgical Procedure

A median laparotomy of 15 cm was performed from the xiphoid process. The hepatic pedicle was isolated on lace when clamping was programmed (hepatic and portal vein). Ultrasound location of the intrahepatic bile ducts was achieved with a linear probe of 7.5 MHz (Focus linear small-parts probe; Siemens, Erlangen, Germany). This probe was connected to Sonoline SL-2[®] (Siemens). The electrode was placed under ultrasound imaging in contact with a bile duct, every bile duct in a pig liver is parallel to and in contact with the vessels of the portal system and the hepatic arterial system [17]. At the end of the procedure, ultrasonographic control confirmed that the ablated zone overlapped the intrahepatic bile duct. Two lesions were created on each pig liver, one on the medial left lobe, the other on the lateral left lobe. After placing the electrode accurately, the RF procedure was activated. The needle array was deployed to 2 cm, the power was set at 50 W and the target temperature was set at 80 °C for a period of 5.5 min. Thirty seconds after the end of this first period, the electrode arrays were deployed to 3 cm, the power was set at 70 W, target temperature at 105 °C during 5 min. Thirty seconds after this second period, the temperatures displayed on the generator were expected to be over 60 °C in order to validate the procedure [18]. This procedure is recommended by the manufacturer of the RF device for a 3-cm tumor ablation in humans. The animals were broken into 4 groups of 5 pigs. Group 1: No clamping of the hepatic pedicle, removal of the liver 1 week after the experiment. Group 2: No clamping of the hepatic pedicle, removal of the liver 3 weeks after experiment. Group 3: Clamping of the hepatic pedicle, liver removal 1 week after experiment. Group 4: Clamping of the hepatic pedicle, liver removal 3 weeks after experiment.

Liver Removal

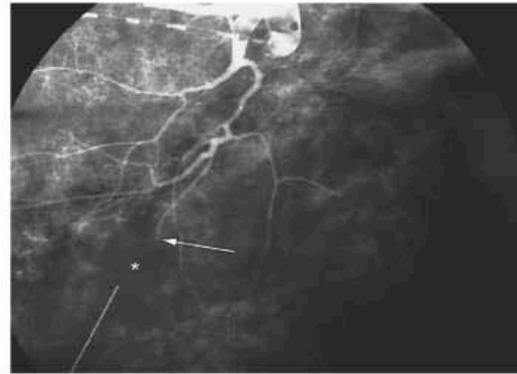
The sacrifice was performed by intravenous injection of 500 mg of thiopental sodic (Pentotal[®]; Abbott, Rungis, France) with 4 mg pancuronium bromide (Pavulon[®]; Rion, France) followed by the injection of 20 ml of potassium chloride at 10% (Fremius Kabi, Sèvres, France).

Radiological Study

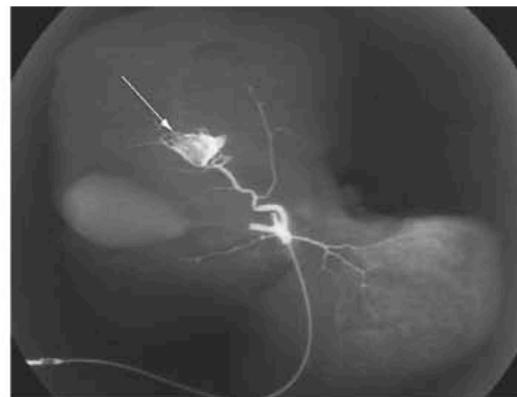
A cholangiography was performed immediately after the liver removal. A cholangiographic drain of 10 French and 25 cm long (Pedinelli[®]; Progrès, Le Plessis Robinson, France) was placed into the choledoch. The cholangiography was done by injecting ioxalate sodium and meglumine concentrated at 320 mg of iodine per ml (Hexa-



1



2



3

Fig. 1. Cholangiogram with two biliary stenoses with upstream dilatation (arrows). Radiofrequency with hepatic pedicle clamping, liver removal 1 week after radiofrequency.

Fig. 2. Cholangiogram with complete interruption of the bile duct image (arrow). Ablation zone (*) after hepatic radiofrequency. Radiofrequency without hepatic pedicle clamping, liver removal 1 week after radiofrequency.

Fig. 3. Cholangiogram with extravasation of radiological contrast agent (arrow). Radiofrequency without hepatic pedicle clamping, liver removal 3 weeks after radiofrequency.

Table 1. Radiological bile duct lesions according to hepatic pedicle clamping

	No clamping	Clamping	p
No lesion	3	1	0.59
Stenosis	4	6	0.71
Stenosis with upstream dilatation	6	6	0.99
Extravasation of contrast liquid	6	4	0.71
Complete interruption of the bile duct	1	3	0.59

Table 2. Radiological bile duct lesions according to hepatic removal date

	Week 1	Week 3	p
No lesion	0	4	0.11
Stenosis	5	5	0.99
Stenosis with upstream dilatation	10	2	0.02
Extravasation of contrast liquid	4	6	0.71
Complete interruption of the bile duct	1	3	0.59

brix®; Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France). Regarding the cholangiography product in the syringe, we added 2 ml of ethylene blue at 1% (Renaudin, Ixassou, France). The ethylene blue allowed viewing of the bile ducts during the histological microscopic dissection prior to fixing. By studying the radiological negatives, we could determine

whether there was a biliary lesion at the ablated zone, with or without any impact on the upper bile duct in the shape of a dilatation. A biliary stenosis was defined by the ratio equal or inferior to 50% of the diameter of the shrunken zone over the diameter of the bile duct situated close to the inferior shrunken zone.

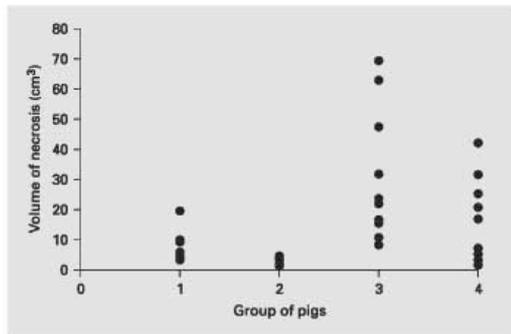


Fig. 4. Distribution of the necrosis volumes (cm³) per pig group. In groups 1 and 3, the liver was removed 1 week after the radiofrequency ablation. In groups 2 and 4, the liver was removed after 3 weeks. The hepatic pedicle had been clamped in groups 3 and 4.

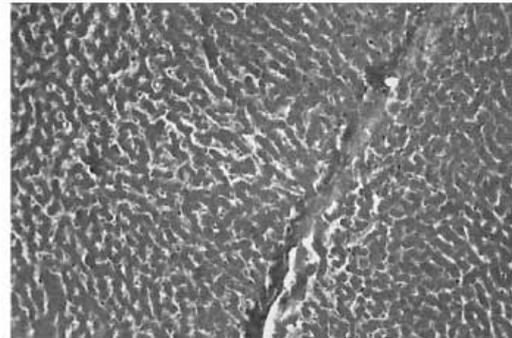


Fig. 5. Histologic appearance of complete necrosis of hepatic parenchyma after radiofrequency (RF). RF performed with hepatic pedicle clamping. Hepatic removal was performed 1 week after RF. Hematoxylin and eosin stain. Cellular phantoms, cellular homogenization. Original magnification $\times 10$.

Histological Study

Each hepatic lesion was sectioned transversally. Necrotic lesion dimensions were determined by caliper measurements. The volume of each necrotic lesion was calculated as $4/3 \times \pi \times (a/2) \times (b/2) \times (c/2)$, where a is the longitudinal diameter, b is the short diameter and c is the thickness. The hepatic sample was fixed by alcohol Bouin liquid (Dubosq-Brasil[®]; Elvetec Services, Genas, France) for 24 h. The studies focused on the ablated lesions, at the periphery of these lesions, up and down the bile ducts at the contact of the lesions, at distance of these lesions on the left liver and on the right liver. The samples were included in paraffin and then cut up in series of 6 μ m. They were colored with saffron hematoxylin-eosin (HES) before microscopic analysis.

Statistics

Data are given as mean \pm SEM. The effective comparison was made by χ^2 test and the average comparison using the Mann-Whitney test. The significance level for all tests was fixed at $p = 0.05$. The software used was BMDP[®] (BMDP Statistical Software, Los Angeles, Calif., USA).

Results

Mortality and Morbidity

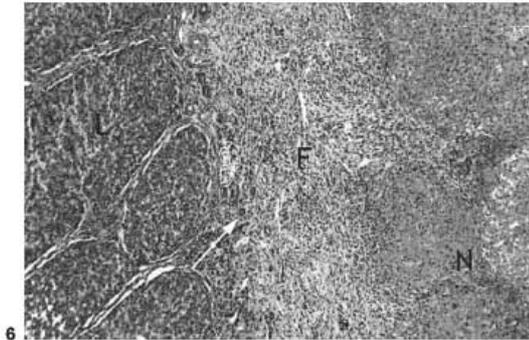
Two pigs died (9%). The first was found dead next to its box 15 days after the experiment, after a fight with other pigs. The second one died 4 days after the experiment, probably due to prolonged hepatic clamping considering its weight. At autopsy, no peritonitis was detected, but the liver showed signs of ischemia. Both pigs were excluded from the histological and radiological studies.

Radiological Study

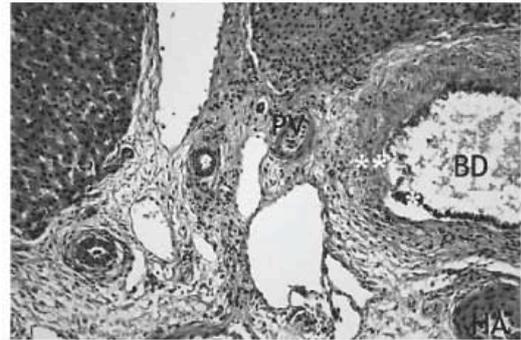
The images showed either biliary stenosis with or without any impact on the upper bile duct in the shape of a dilatation (fig. 1) or complete interruption of the bile duct (fig. 2) or a complete destruction of the bile duct with extravasation of the contrast liquid into the hepatic parenchyma (fig. 3). The clamping of the hepatic pedicle did not influence radiological biliary lesions (table 1). The date of removal of the liver had very little influence on the radiological biliary lesions (table 2).

Histological Study

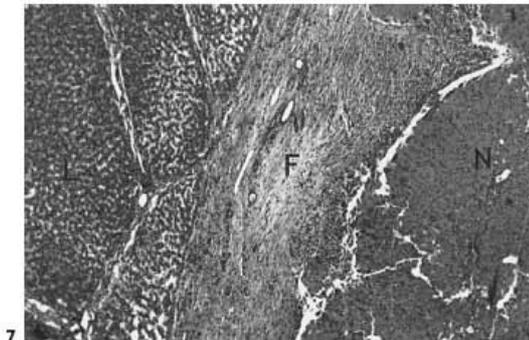
The average necrosis volume after RF ablation calculated according to the hepatic samples issued was 19.0 ± 8.6 cm³ at week 1 and was 9.3 ± 5.1 cm³ at week 3 ($p = 0.075$). The average volume of necrosis according to the clamping was 5.1 ± 1.8 cm³ without clamping and 23.2 ± 8.5 cm³ with clamping ($p = 0.03$) (fig. 4). Histological examination of the necrotic zones on the excised livers at week 1 (fig. 5) showed an aspect of coagulation with persistence of phantom cells without visible nucleus. The bile ducts situated within these necrotic areas had severely damaged walls, the epithelium being desiccated inside the biliary lumen. The hepatic vessels in the necrotic area were preserved. On the hepatic samples performed at week 3, the inflammatory reaction at the periphery of the necrosed zone, described on the week 1 samples (fig. 6), had evolved to fibrosis (fig. 7). In clamped hepatic pedicle cases, the inflammatory reaction around the necrotic area



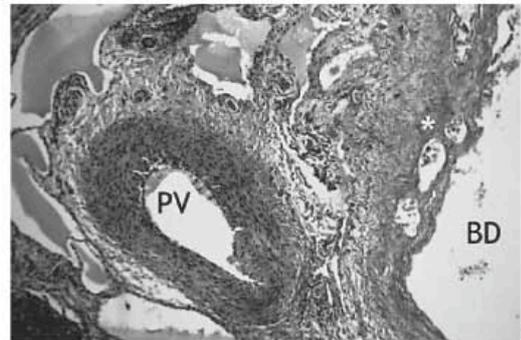
6



8



7



9

Fig. 6. Histologic appearance of necrosis of hepatic parenchyma. Hepatic removal was performed 1 week after radiofrequency (RF). RF performed with hepatic pedicle clamping. Necrosis (N) of hepatic parenchyma, presence of intense macrophagic resorption localized at the peripheral area of the lesion. Fibrosis (F) rich of polymorphic inflammatory elements with reactionary neochoangiogenesis (arrow). Normal parenchyma liver (L). Original magnification $\times 5$.

Fig. 7. Histologic appearance of hepatic parenchyma necrosis, hepatic removal 3 weeks after radiofrequency (RF). RF performed with hepatic pedicle clamping. Hematoxylin and eosin stain. Necrosis (N) was older than in figure 6, with little or none histiocytic crown and neochoangiogenesis, with poorly cellular fibrosis (F). Normal parenchyma liver (L). Original magnification $\times 10$.

Fig. 8. Histologic appearance of damaged bile duct (BD) after hepatic radiofrequency (RF) necrosis without hepatic pedicle clamping. Hepatic removal was performed 1 week after RF. Hematoxylin and eosin stain. Bile duct was histologically damaged remotely from the point where RF was performed. Dislocation of the epithelium (*) and incomplete necrosis of the fibromuscular wall of the bile duct (**). Hepatic arteriole (HA) and portal venule (PV) undamaged. Original magnification $\times 10$.

Fig. 9. Histologic appearance of damaged bile duct (BD) with hepatic radiofrequency (RF) necrosis with hepatic pedicle clamping. Hepatic removal was performed 1 week after RF. Hematoxylin and eosin stain. Bile duct was histologically damaged remotely from the point where RF was performed. Dislocation of the epithelium and complete necrosis of the fibromuscular wall of the bile duct (*). Portal venule (PV) undamaged. Original magnification $\times 10$.

persisted longer since it was observed after 3 weeks. Bile duct lesions were observed on histological examination of the hepatic slices obtained at a distance of 8.9 ± 1.1 cm from the necrotic zone. These bile ducts were in continuity with the ones that were in contact with the necrotic area. The lesions were desquamations of the biliary epithelium into the biliary lumen (fig. 8). When the pedicle

was clamped during the ablation, we noticed a dislocation of the epithelium that at certain spots had completely disappeared, associated with an incomplete or complete necrosis of the fibromuscular wall of the bile duct (fig. 9). The localization of the histological lesions on the biliary tree was influenced by the clamping of the pedicle (table 3) with a bigger proportion of distanced lesions on the

Table 3. Histological bile duct lesions in accordance to hepatic pedicle clamping

	Without clamping	Clamping	p
No lesion	2	0	0.46
Proximal lesions	13	4	0.01
Proximal and distal lesions	5	16	0.002

Table 4. Histological bile duct lesions according to the period of hepatic removal

	Week 1	Week 3	p
No lesions	0	2	0.5
Proximal lesions	13	4	0.01
Proximal and distal lesions	7	14	0.06

biliary tree when the clamping of the pedicle was associated. The liver removal date also influenced the localization of the biliary lesions on the biliary tree (table 4). There were more distal lesions associated to proximal lesions when the liver was removed after 3 weeks.

Discussion

RF ablation in the vicinity of porcine bile ducts enabled us to create an experimental model of stenosis of the intrahepatic bile ducts. This complication, even though it has already been described in the literature [12, 18], has never been the subject of an experimental model. We could not use any primary or secondary tumors for the experimental models since such models are not reliable and validated in big animals [19]. Hepatic tumors have been developed on small animals such as rats or rabbits [20]. But in these models the liver size is too small for RF experimentation. The study concerning the volume of necrosis caused by RF showed a significant decrease of the necrosis volume ($p = 0.001$) in the time (between the 1st and 3rd weeks postablation) as initially explained by McGahan et al. [21]. The inflammatory perilesional reaction observed on the hepatic samples after 1 week was gradually replaced in time by a fibrotic tissue separating the necrosis from the remaining hepatic parenchyma [21]. The average volume of necrosis statistically increased ($p = 0.0001$) when the pedicle had been clamped during the ablation, such as shown in other

experimental studies [22, 26]. Few studies have looked at intrahepatic bile duct lesions in pig during RF ablation near the bile ducts. Patterson et al. [24] described the absence of bile duct lesions when the hepatic vessels at the contact of these bile ducts were not thrombosed. But Hansen et al. [19] reported intrahepatic bile duct lesions when these lesions were associated to thromboses of the hepatic vessels. The pig intrahepatic bile ducts run along and in contact with the intrahepatic vessels, the blood flow evacuates the heat generated in the ablation zone ('cooling effect' or 'heat-sink effect') protecting in this way the bile ducts from the thermal effects of RF [19, 22, 23, 27]. To prevent this cooling effect, we clamped the hepatic pedicle during our experiment. By ablating in the area of the intrahepatic bile duct, we were able to create radiological biliary lesions (stenosis, stenosis with upstream dilatation, interruption of the bile duct, destruction of the bile duct with extravasation of the contrast product). Clamping of the pedicle and removal of the liver did not modify the number or the type of radiologic lesions in a significant way. From 40 necrosed zones performed at the contact of the intrahepatic bile ducts, 36 radiological lesions could be observed. The histological study showed that the initial damages involved first the epithelium of the bile ducts. This epithelium partially or totally desiccated the biliary channel lumen. The fibromuscular wall of the bile ducts was injured by hyperthermia with coagulation of the proteins of the wall close to the biliary epithelium. As a consequence of hyperthermia, the bile duct walls were partially or completely destroyed. This destruction was observed on the cholangiography by an extravasation of the contrast liquid. Such lesions may explain biliary abscesses described in the literature [12]. The radiological images of the biliary stenosis [1] correspond to a scarring fibrosis of the biliary walls. We do not know the intermediate or long term evolution of the desquamated biliary epithelium. Does it regenerate itself over time? Do the bile ducts remain functional? The pedicle clamping and the delay of liver removal modified in a significant way the localization of the lesions on the biliary tree. When the pedicle was clamped or when the hepatic removal was done after 3 weeks, the biliary lesions at a distance from the ablation zone were more frequent and always in continuity with the bile ducts situated within ablation zone. Distal lesions were made of more or less extended desquamation of the epithelium, associated inconsistently with a partial necrosis of the biliary wall. These distal lesions have never been reported in the literature. We can imagine 2 hypotheses concerning the pathogenesis of these distal lesions: either the biliary liquid forms an electric current conduction or the heat generated by the abla-

tions spreads out by convection into the bile ducts, the flow of the biliary liquid is not strong enough to evacuate the heat ('cooling effect') like the hepatic vessels do. These distal lesions were found in 5 cases of 20 when the hepatic pedicle was not clamped and in 16 cases of 20 when the hepatic pedicle was clamped.

In conclusion, RF ablation in contact with intrahepatic bile ducts in pigs consistently induced radiological and histological lesions of the bile ducts. Biliary lesions at a distance from the zone of necrosis were observed when the hepatic pedicle was clamped and when the liver was removed after 3 weeks. This experimental model of bili-

ary lesions during hepatic RF ablation enables us to understand the biliary complications described in the literature [1, 11, 12]. When performing intrahepatic RF ablation, you have to keep a distance from the bile ducts, unless techniques that protect the bile ducts are used [28, 29].

Acknowledgements

The authors thank Liane Goergen for her secretarial assistance, Andreas Tamayo for critical reading of the manuscript and Dr. Jean Pierre Carreaux for technical assistance.

References

- De Baere T, Elias D, Dromain C, Gamal El Din M, Kuoch V, Ducreux M, Boige V, Lassau N, Marteau V, Lasser P, Roche A: Radiofrequency ablation of 100 hepatic metastases with a mean follow-up of more than 1 year. *AJR* 2000; 175:1619-1625.
- Goldberg SN, Gazelle GS, Mueller PR: Thermal ablation therapy for focal malignancy: A unified approach to underlying principles, techniques, and diagnosis imaging guidance. *AJR* 2000; 174:323-331.
- Rhim H, Nahum Goldberg SN, Dodd GD 3rd, Solbiati L, Lim HK, Tonolini M, Cho OK: Essential techniques for successful radiofrequency thermal ablation of malignant hepatic tumors. *RadioGraphics* 2001; 21:S17-S39.
- Fong V, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH: Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *Ann Surg* 1999; 230:309-321.
- Fortner JG, Silva JS, Golbey RB, Cox EB, Maclean BJ: Multivariate analysis of a personal series of 247 consecutive patients with liver metastases from colorectal cancer. I. Treatment by hepatic resection. *Ann Surg* 1984; 199:306-316.
- Akriviadis EA, Llovet JM, Efreimidis SC, Shouval D, Canelo R, Ringe B, Meyers WC: Hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 1998; 85:1319-1331.
- Curley SA, Izzo F, Delrio P, Ellis LM, Granchi J, Vallone P, Fiore F, Pignata S, Daniele B, Cremona F: Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: Results in 123 patients. *Ann Surg* 1999; 230:1-8.
- Curley SA, Izzo F, Ellis LM, Vauthey JN, Vallone P: Radiofrequency ablation of hepatocellular cancer in 110 patients with cirrhosis. *Ann Surg* 2000; 232:381-391.
- Wood TF, Rose M, Chung M, Allegra DP, Foshag LJ, Bilchik AJ: Radiofrequency ablation of 231 unselectable hepatic tumors: Indications, limitations and complications. *Ann Surg Oncol* 2000; 7:593-600.
- Llovet JM, Vilana R, Bru C, Bianchi L, Salmeron JM, Boix L, Ganau S, Sala M, Pages M, Ayuso C, Sole M, Bruin J: Increased risk of tumor after percutaneous radiofrequency ablation for single hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2001; 33:1124-1129.
- Bowles BJ, Machi J, Limm WML, Severino R, Oishi AJ, Furumoto NL, Wong LL, Oishi RH: Safety and efficacy of radiofrequency thermal ablation in advanced liver tumors. *Arch Surg* 2001; 136:864-869.
- Bilchik AJ, Rose DM, Allegra DP, Bostick PJ, Hsueh E, Morton DL: Radiofrequency ablation: A minimally invasive technique with multiple applications. *Cancer J Sci Am* 1999; 5:356-361.
- Dodd GD, Soulen MC, Kane RA, Livraghi T, Lees WR, Yamashita Y, Gillams AR, Karahan OI, Rhim H: Minimally invasive treatment of malignant hepatic tumors: At the threshold of a major breakthrough. *RadioGraphics* 2000; 20:9-27.
- Pearson AS, Izzo F, Fleming D, Ellis LM, Delrio P, Roh MS, Granchi J, Curley SA: Intraoperative radiofrequency ablation or cryoablation for hepatic malignancies. *Am J Surg* 1999; 178:592-599.
- Elias D, De Baere T, Mutillo I, Cavalcanti A, Coyle C, Roche A: Intraoperative use of radiofrequency treatment allows an increase in the rate of curative liver resection. *J Surg Oncol* 1998; 67:190-191.
- Elias D, De Baere T, Smayra T, Ouellet JF, Roche A, Lasser P: Percutaneous radiofrequency thermoablation as an alternative to surgery for treatment of liver tumour recurrence after hepatectomy. *Br J Surg* 2002; 89:752-756.
- Baronne R: Glandes annexes de l'intestin: foie; in Baronne R (ed): *Anatomie Comparée des Mammifères Domestiques*. Paris, Vigot, 1984, pp 507-561.
- De Baere T, Elias D, Ducreux M, Dromain C, Kuoch V, Gamal El Din M, Sotka A, Lasser P, Roche A: Percutaneous radiofrequency ablation of hepatic metastases: Preliminary experience. *Gastroenterol Clin Biol* 1999; 23:1128-1133.
- Hansen PD, Rogers S, Corless CL, Swanstrom LL, Siperstein AE: Radiofrequency ablation lesions in a pig liver model. *J Surg Res* 1999; 87:114-121.
- Panis Y, Nordlinger B: Experimental models for hepatic metastases from colorectal tumors. *Ann Chir* 1991; 45:222-228.
- McGahan JP, Brock JM, Tesluk H, Gu WZ, Schneider P, Browning PD: Hepatic ablation with use of radio-frequency electrocautery in the animal model. *JVIR* 1992; 3:291-297.
- Chinn SB, Lee FT, Kennedy GD, Chinn C, Johnson CD, Winter TC, Warner TF, Mahvi DM: Effect of vascular occlusion on radiofrequency ablation of the liver: results in a porcine model. *AJR* 2001; 176:789-795.
- Goldberg SN, Hahn PF, Tanabe KK, Mueller PR, Schima W, Athanasoulis CA, Compton CC, Solbiati L, Gazelle GS: Percutaneous radiofrequency tissue ablation: Does perfusion-mediated tissue cooling limit coagulation necrosis? *J Vasc Interv Radiol* 1998; 9:101-111.
- Patterson EJ, Scudamore CH, Nagy AG, Buczkowski AG: Radiofrequency ablation of porcine liver in vivo effects of blood flow and treatment time on lesion size. *Ann Surg* 1998; 227:559-565.
- Rossi S, Garbagnati F, De Francesco I, Accocella F, Leonardi L, Quarretti P, Zangrandi A, Paties C, Lencioni R: Relationship between the shape and size of radiofrequency induced thermal lesions and hepatic vascularization. *Tumori* 1999; 85:137-141.
- Shibata T, Nhnobu T, Ogata N: Comparison of the effects of in vivo thermal ablation of pig liver by microwave and radiofrequency coagulation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7:592-598.
- De Baere T, Denys A, Wood BJ, Kardache M, Vilgrain V, Menu Y, Roche A: Radiofrequency liver ablation: Experimental comparative study of water-cooled versus expandable systems. *AJR* 2001; 176:187-192.
- Bilchik AJ, Wood TF, Allegra DP: Radiofrequency ablation of unresectable hepatic malignancies: Lessons learned. *The Oncologist* 2001; 6:24-33.
- Elias D, El Otmány A, Goharin A, Attalah D, De Baere T: Intraductal cooling of the main bile ducts during intraoperative radiofrequency ablation. *J Surg Oncol* 2001; 76:297-300.

1.2. Prévention des lésions biliaires lors de la réalisation d'une ablathermie hépatique par RF au contact des voies intrahépatiques

C'est à partir de l'idée du Dr Elias que l'expérimentation a été élaborée afin de valider le refroidissement des voies biliaires comme moyen de prévention des lésions biliaires. Nous avons pu démontrer l'efficacité du refroidissement des voies biliaires dans la prévention des lésions biliaires au cours de l'ablathermie. Il reste à déterminer quelle serait la température optimale du liquide de perfusion qui permettrait de prévenir les lésions biliaires sans réduire l'effet thérapeutique recherché (le volume de nécrose tumorale) qui pourrait favoriser les récurrences tumorales.

Notre étude a été acceptée pour publication dans *Annals of Surgery*. Nous donnons ce texte in extenso.

Prevention of Biliary Lesions That May Occur During Radiofrequency Ablation of the Liver

Study on the Pig

Frédéric Marchal, MD,*†‡§¶|| Dominique Elias, MD, PhD,† Philippe Rauch, MD,*
Rasa Zarnegar, MD,‡ Agnès Leroux, MD,§ Joseph Stines, MD,|| Jean-Luc Verhaeghe, MD,*
François Guillemain, MD, PhD,* Jean Pierre Carteaux, MD, PhD,¶
and Jean Pierre Villemot, MD, PhD¶

Objective: To prevent bile duct injury by using a cold 5% glucose isotonic solution cooling in the bile ducts when radiofrequency (RF) is performed in a porcine model.

Summary Background Data: Complications that may arise during liver RF ablation include biliary stenosis and abscesses.

Methods: The RITA 1500 generator was used for the experiments. Two lesions were performed in the left liver. The pigs were killed 1 or 3 weeks after the procedure. An ex vivo cholangiogram was obtained by direct injection into the main bile duct. Samples of RF lesions, of liver parenchyma near and at a distance from the RF lesions, underwent pathologic studies. Two groups of 20 pigs each were treated: one without perfusion of the bile ducts and the other with perfusion of cold 5% glucose isotonic solution into the bile ducts. The Pringle maneuver was used in 50% of the RF procedures. Radiologic lesions were classified as biliary stenosis, complete interruption of the bile duct, or extravasation of the radiologic contrast liquid.

Results: Histologic lesions of the bile ducts were observed near the ablated RF lesion site and at a distance from the RF lesions when a Pringle maneuver was performed. Radiologic and histologic lesions of the bile ducts were significantly reduced ($P < 0.0001$) when the bile ducts were cooled.

Conclusions: Cooling of the bile ducts with a cold 5% glucose isotonic solution significantly protects the intrahepatic bile ducts from damages caused by the heat generated by RF when performed close to the bile ducts.

(*Ann Surg* 2006;243: 000–000)

From the Departments of *Surgery, §Pathology, and ||Radiology, Centre Alexis Vautrin, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; †Department of Surgery, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ‡Department of Surgery, Case Western University, University Hospitals of Cleveland, Cleveland, OH; and ¶Laboratoire Chirurgie Expérimentale Nancy University, School of Medicine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Reprints: Frédéric Marchal, MD, Department of Surgery, Centre Alexis Vautrin, Av. de Bourgoigne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.
E-mail: f.marchal@nancy.fnclcc.fr.

Copyright © 2006 by Lippincott Williams & Wilkins
ISSN: 0003-4932/06/24301-0001
DOI: 10.1097/01.sla.0000193831.39362.07

Annals of Surgery • Volume 243, Number 1, January 2006

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

protects intrahepatic bile ducts from damages caused by the heat generated by radiofrequency.

Radiofrequency (RF) ablation is a new technique used to destroy locally malignant hepatic tumors. The RF current is a high frequency sinusoidal current (400–500 kHz) that produces ionic agitation and results in frictional heat, distributed by conduction into the tissue about the electrode.¹ At a temperatures near 60°C, the intracellular proteins and collagen are denatured, lipids are dissolved, and cellular death becomes irreversible. Coagulation starts at 70°C and tissue desiccation at 100°C, thus causing coagulation necrosis of the tumor tissue and the surrounding parenchyma.^{2–4} The morbidity rate of this technique varies according to the studies from 3% to 14%.^{1,5–9} The bile ducts cannot withstand the heating effect, leading to either ductal stenosis with dilation of the upper bile duct or abscess formation.^{10,11} Most authors recommend a minimal distance of 1.5 to 2 cm, from a proximal intrahepatic bile duct, to perform RF ablation without any risk.^{1,12–14}

An experimental model was designed for secondary biliary lesions in pig.¹⁵ RF ablation in proximity to the bile duct consistently induced radiologic and histologic lesions. The radiologic lesions observed were either biliary stenosis with upstream dilation or complete interruption of the bile duct, or destruction of the bile duct with extravasation of contrast. Histologic examination showed desquamation of the biliary epithelium associated with destruction of the biliary duct wall. The aim of this study was to evaluate the role of bile ducts cold 5% glucose perfusion during RF ablation on secondary post-RF biliary lesions.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Forty-four pigs French hybrid 54 EYL (Einville aux Jards, France 54 EYL), 12 to 14 weeks old, with an average weight of 32.8 ± 2.1 kg (range, 22–44.5 kg) were used. All animals received care in accordance with French legal requirements. All procedures were performed in the laboratory for experimental surgery (UPRES EA 2403) of the Faculty of Medicine in Nancy (54500 Vandoeuvre-lès-Nancy). Upon arrival, each group of pigs were kept in sheds for 7 days prior to any experiment.

TABLE 1. Characteristics for the 8 Pig Groups According to Pedicle Clamping, With or Without Cooling of the Intrahepatic Ducts and the Date of Death

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8
No pedicle clamping	X	X			X	X		
Pedicle clamping			X	X			X	X
No biliary cooling	X	X	X	X				
Biliary cooling					X	X	X	X
Death after 1 wk	X		X		X		X	
Death after 3 wk		X		X		X		X

The animals were divided into 8 groups of pigs. Groups 1 to 4 were selected to the experimental model of intrahepatic lesions and groups 5 to 8 to the experimental model with cooling of the hepatic duct. The characteristics of each group are reported in Table 1.

Animal Preparation and Anesthesia

Twenty-four hours before and after RF, the food intake of the animal was restricted with free access to water. The animals were premedicated by injecting intramuscular ketamine hydrochloride (Ketalar, Parke-Davis, Courbevoise, France), midazolam (Hypnovel, Roche, Neuilly-sur-Seine, France), and atropine sulfate (Atropine Laboratory Aquetant, Aquetant, Lyon, France) at respective doses of 22 mg/kg, 1.5 mg/kg, and 0.25 mg. A 6.5-French catheter (Willy Rusch, Waiblingen, Germany) was placed on an ear vein. A dose of 2 mg/kg of 1% propofol (Diprivan, AstraZeneca, Rueil Malmaison, France) was administered just before intubation. The pig was in a dorsal decubitus position.

Anesthesia was maintained with halothane (Halothane Belamont, Belamont, Paris, France) concentrated at 1.5%. Ventilation was performed with a respirator Monal A type (Compagnie Française de Produits Oxygène, Paris, France) with a 50% air/oxygen mix. The tidal volume was 15 mL/kg with a respiratory rate of 18 to 20; 750 mg of cefamandol (Kefandol, Lilly France, St. Cloud, France) was given intravenously prior to the cutaneous incision, with a second identical dose of cefamandol being injected during the closure of the laparotomy. One gram of paracetamol (Pro-dafalgan, Upsa, Agen, France) was administered 20 minutes before the end of the surgical procedure by intravenous slow perfusion, for postoperative analgesia. Monitoring during anesthesia and wake-up was monitored with ECG from Hewlett Packard 78353A (Agilent Technology, Palo Alto, CA).

Surgical Procedure

A 15-cm median laparotomy was performed from the xiphoid process. The hepatic pedicle was isolated on lace when clamping was programmed (hepatic artery and portal vein). The common bile duct was dissected when a choledochotomy was planned; 7.5 MHz linear probe was used to localize the intrahepatic bile ducts (Focus linear small parts probe, Siemens, Erlangen, Germany). The probe was connected to a Sonoline SL-2 ultrasound machine (Siemens, Erlangen, Germany). The RF electrode was placed under ultrasound imaging in contact with a bile duct. Every main

bile ducts in pig liver are parallel to and in contact with the vessels of the portal system and the hepatic arterial system.¹⁶ At the end of the procedure, ultrasound imaging confirmed that the ablated zone overlaps the intrahepatic bile duct. Two lesions were created in each liver: one on the medial left lobe and another on the lateral left lobe. After placing the electrode accurately, the RF procedure was activated. The needle array was deployed to 2 cm, power was set at 50 W, and the target temperature was set at 80°C for a period of 5.5 minutes. Thirty seconds after the end of this first period, the electrode arrays were deployed to 3 cm, the power was set at 70 W, and target temperature at 105°C for a period of 5 minutes. Thirty seconds after the end of this second period, the temperatures displayed on the generator was expected to be greater than 60°C to validate the procedure.¹⁷ This protocol is recommended by the manufacturer of the RF device for a 3-cm tumor ablation in humans.

Cooling of the bile duct was performed by perfusing cold 5% glucose solution (Fresenius Kabi France, Sèvres, France). A transverse choledochotomy enabled the placement of a Seldicath 4F (Plastimed, Saint-Lieu-la-Forêt, France) catheter (4 cm long, section 1.3 mm) that was pushed into the common hepatic bile duct in the hepatic hilum. Selective catheterization, of the left or right hepatic bile ducts, was not performed. The diameter of the intrahepatic bile duct in a 40-kg pig was too small to move the catheter up the bile ducts. Second, the left and right intrahepatic bile ducts in pigs do not join in one left bile duct or one right bile duct, and every bile duct flows separately into the common bile duct. The right bile ducts flow into the common bile duct forming a 90° angle. The left bile ducts meet in a very short, left bile duct with a wider angle. We consequently chose to create 2 lesions on the left liver lobe to have a better cooling quality. The catheter was connected to a 1-L pouch of 5% glucose isotonic solution, connected via a perfusion set with stop cock (Codan, Lensahm, Germany). Through the stop cock, samples of the serum glucose, and temperature measurements could be performed. The isotonic glucose was introduced using a pressure infusor (Infusable Vital Signs, Barnham, UK) allowing fluid delivery control at exactly 90 mL/min. We used 2 pouches per RF procedure. Each procedure lasted 15 minutes, and cooling of the bile ducts was initiated 5 minutes prior to the RF procedure, thereby providing a total cooling time of 20 minutes. The isotonic glucose solution pouches were exchanged before they were completely

emptied. We used 900 mL per pouch: 1800 mL/20 minutes = 90 mL/min. The catheter was fixed at the peritoneum of the hepatic pedicle with a polyamide monofilament 3.0 stitches (Ethilon Johnson&Johnson, Brussels, Belgium). The bile and the glucose solution were drained through the choledochotomy and removed from the peritoneal cavity. The choledochotomy was sutured with separate stitches with a polypropylene 1.0 suture (Prolène Johnson&Johnson, Brussels, Belgium). When the pedicle was clamped using the Pringle maneuver, it was maintained during the 2 RF procedures.

RF System

The RITA 1500: RF generator (RITA Medical Systems, Inc., Mountain View, CA) is a monopolar system rated at 460 kHz 150 W at 50 ohms. Two dispersive electrodes were placed on the anterior face of the pig back legs. We used a Starburst XL (RITA Medical Systems, Inc.) 15 gauge, 15 cm length with 7 retractable arrays. The needle is insulated on its whole length except the distal 0.5 cm of the tip, allowing us to ablate the needle track when retracting the electrode at the end of the procedure. Four of the 7 electrode arrays have thermocouples that monitor tissue temperature in real time. Impedance of the necrotic zone and the power delivered by the generator were displayed in real time on the generator screen. The preoperative settings of the generator (target temperature, impedance, power delivery, time set, control mode, thermocouple selection) were saved on the computer. The RITA generator adjusted the power delivery according to the tissue impedance (the power delivery decreased when the impedance increased) and according to the target temperatures set for the thermocouples situated at the tip of 4 of the 7 arrays that were deployed in the liver. The generator delivered the maximum set power until the target temperature was reached and then automatically adjusted the power to maintain the target temperature at the tip of the 4 thermocouples.¹⁶ The generator calculates the average temperature in the ablation zone. When one of the 4 thermocouples was placed into contact with or inside a cooled hepatic duct, the temperature did not rise over 45°C to 50°C. In such cases, the electrode was removed from the algorithm. As soon as the target temperature was reached, the countdown started.

Temperature Measurement

The temperature of the perfusion liquid was measured as it came out of the refrigerator during setup, and as it was removed from the catheter. A thermocouple thermometry sensor (Digi-Sense Cole Parmer Instrument Company, Chicago, IL) was used for this purpose.

Liver Removal

The pig was premedicated using the same procedure described for the RF application. The death was performed by intravenous injection of 500 mg of thiopental sodium (Penthotal Abbot, Rungis, France) with 4 mg pancuronium bromide (Pavulon, Laboratories Rion, Rion, France), followed by the injection of 20 mL of potassium chloride at 10% (Fresenius Kabi, Sèvres, France).

Data Analyses

Radiologic Study

A cholangiography was performed immediately after the liver removal. A cholangiographic drain 10-French and 25 cm long (Pedinelli, Porgès, Le Plessis Robinson, France) was placed into the common bile duct. The cholangiography was performed by injecting ioxalate sodium and meglumine concentrated at 320 mg of iodine per milliliter (Hexabrix, Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France). Two milliliters of ethylene blue dye at 1% (Renaudin, Ixassou, France) was also added. The ethylene blue dye allowed viewing of the bile ducts during the histologic microscopic dissection prior to fixing. By studying the cholangiograms, we could determine whether there was a biliary lesion at the ablated zone, with or without any impact on the upper bile duct causing dilation. Biliary stenosis was defined by the ratio equal or less than 50% of the diameter of the ablated zone over the diameter of the bile duct situated close to the inferior ablated zone.

Histologic Study

Each hepatic lesion was sectioned transversally. Necrotic lesion dimensions were determined by caliper measurements. The volume of each necrotic lesion was calculated using the following formula: $V = 4/3 \times \Pi \times (a/2) \times (b/2) \times (c/2)$ (where a is the longitudinal diameter, b is the short diameter, and c is the thickness). The hepatic sample was fixed with alcoholic Bouin liquid (Dubosq-Brasil, Elvetec Services, Genas, France) for 24 hours. The studies focused on the ablated lesions, at the periphery of these lesions, up and down the bile ducts in contact with the lesions, and at a distance from the lesions on the left liver and on the right liver. The samples were fixed in paraffin and then cut up in series of 6 μ m. They were colored with saffron hematoxylin and eosin before microscopic analysis.

Statistic Tests

Data are given as mean values \pm SEM. The pigs that died before the hepatic removal were excluded except for the mortality criteria. The effective comparison was made by the χ^2 test and the average comparison using the Mann-Whitney U test. The significance level for all tests was fixed at $P = 0.05$. Statistical analysis was done using BMDP software (BMDP Statistical Software, Inc., Los Angeles, CA).

RESULTS

Postoperative Complications

Four pigs died (9%) before the end of follow-up. The first died 15 days after the experiment, after a fight with other pigs. Hepatic removal was not performed because of the decomposition of the cadaver. The second one died 4 days after the experiment, probably due to prolonged hepatic clamping considering its weight. During the autopsy, no peritonitis was detected, but the liver showed signs of ischemia. The third pig was found dead 6 days after the experiment. It had tracheal injury during intubation resulting in subcutaneous emphysema. Upon awakening and during the first few days after the experiment, the injury did not cause any problems and the autopsy did not show any signs of

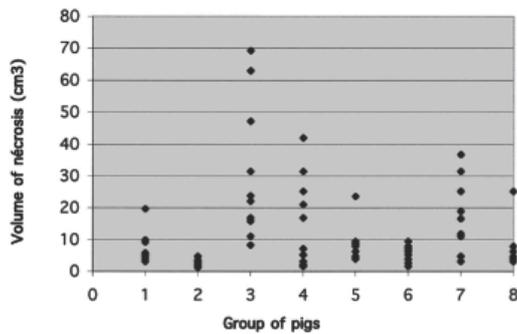


FIGURE 1. Distribution of the necrosed volumes (cm³) per pig group. In groups 1, 3, 5, and 7, the liver was removed 1 week after the RF procedure. In groups 2, 4, 6, and 8, 3 weeks after the RF ablation. Pedicle clamping: groups 3, 4, 7, and 8. Biliary cooling: groups 5–8.

TABLE 2. Radiologic Lesions According to Cooling of the Intrahepatic Ducts

	No Cooling	Cooling	P
No lesion	4	33	0.0001
Stenosis	10	5	0.25
Stenosis and dilatation	12	0	0.0006
Extravasation	10	1	0.01
Interruption of the hepatic duct	4	1	0.4

peritonitis or ischemia. The fourth pig died during the experiment from preoperative cardiac disorders (tachycardia, fibrillation, and heart failure) secondary to a malignant hyperthermia of the halothane. The histologic study of the excised liver showed a shocked liver with diffused distress to the hepatic cells. These 4 pigs were excluded from the radiologic and histologic analysis.

The morbidity rate was 12.5%: 4 subcutaneous abscesses and 1 biliary peritonitis. The biliary peritonitis, secondary to a leak of the choledochotomy suture, was detected when the liver was removed 1 week after the experiment.

The Cooling Impact on the Volume of Necrosis

The average necrosis volume after RF ablation (Fig. 1) after 1 week and after 3 weeks were 16.4 ± 4.8 cm³ and

7.7 ± 2.8 cm³ (P = 0.001), respectively. The average volume of necrosis was 6.2 ± 1.4 cm³ without clamping and 17.9 ± 5.1 cm³ with clamping (P = 0.0005). The necrotic volume was 14.1 ± 5.1 cm³ without cooling and 10 ± 2.7 cm³ with cooling of the bile ducts (P = 0.9, not significant). The average temperature at the beginning of the perfusion was 7.1°C ± 0.8°C with extremes from 2°C to 13°C. The average temperature at the end of the perfusion was 10.1°C ± 0.8°C (SD = 2.6°C) with extremes from 5.5°C to 16.5°C.

The Cooling Impact on the Radiologic Study

We observed that cooling of the bile ducts strongly influenced the radiologic lesions (Table 2). We observed 36 radiologic lesions (90%) among 40 liver ablations without bile ducts cooling and 7 lesions (18%) with bile ducts cooling. Furthermore, no radiologic lesion was observed at distance from the ablated zone when the bile ducts were cooled. Radiologic lesions according to cooling of the intrahepatic ducts and pedicle clamping are reported in Table 3. The clamping of the hepatic pedicle and the date of removal of the liver did not influence radiologic biliary lesions.

Cooling Impact on Histologic Studies

We observed that cooling of the bile ducts strongly influenced the histologic lesions (Table 4). We observed 38 histologic lesions (95%) among 40 ablations without cooling of the bile ducts and 5 histologic lesions with cooling of the bile ducts (13%). We observed no histologic lesions at distance from the ablated zone when the cooling of the bile ducts was performed during the ablation independent of clamping of the pedicle.

The histologic study of the necrotic zones with cooling of the bile ducts showed a certain lack of homogeneity of the necrosis. The necrotic zones in contact with the cooled bile duct were incomplete. Cells structure persisted, but they were not functional since the intracellular cytoplasmic structure had coagulated (Fig. 2A). The necrosis at the center of the lesion was total (Fig. 2B). This lack of homogeneity was only observed when the cooling of the bile duct without clamping of the pedicle was performed. When clamping and cooling were performed, the necrosis was total and accurate, with persistence of some phantoms of cell nucleus.

When the bile duct was cooled (with or without clamping), the histologic study of the bile duct in contact with the necrotic area showed that the integrity of the bile duct had been preserved in 35 of 40 cases (Fig. 3). In 5 cases, we

TABLE 3. Radiologic Lesions According to Cooling of the Intrahepatic Ducts and Pedicle Clamping

	Without Cooling				With Cooling			
	No Pedicle Clamping		Pedicle Clamping		No Pedicle Clamping		Pedicle Clamping	
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8
No lesion	0	3	0	1	9	7	7	10
Stenosis	3	1	2	4	0	3	2	0
Stenosis and dilatation	5	1	5	1	0	0	0	0
Extravasation	2	4	2	2	0	0	1	0
Interruption of the hepatic duct	0	1	1	2	1	0	0	0

TABLE 4. Histologic Lesions According to Cooling of Intrahepatic Ducts

	No Cooling	Cooling	P
No lesion	2	35	0.0001
Proximal lesions	17	5	0.006
Proximal and distal lesions	21	0	0.0001

observed biliary duct lesions in contact with the necrotic area. These lesions were desquamations of the epithelium or glossy aspect of the epithelium. The structure of the bile ducts crossing the necrotic zone was preserved (Fig. 4).

F4
T5
Histologic lesions according to cooling of the intrahepatic ducts and pedicle clamping are reported in Table 5. The localization of the histologic lesions on the biliary tree was influenced by the clamping of the pedicle with a bigger proportion of distanced lesions of the biliary tree when the clamping of the pedicle without cooling was associated. The liver removal date also influenced the localization of the biliary lesions on the biliary tree. There were more distal lesions associated to proximal lesions when the liver was removed after 3 weeks.

DISCUSSION

In 2005, the only possibly curative approach for patients with liver tumor is surgical resection.⁸ However, following extended or repeated hepatectomies or severe cirrhosis, some patients have poor hepatic reserve. To avoid the risk of hepatic failure that can follow hepatic resection in such patients, RF ablation could be an alternative treatment.¹⁴ RF is on the way to be considered as a first-line local palliative

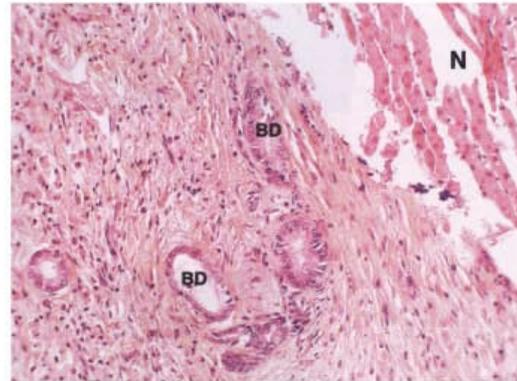


FIGURE 3. Histologic appearance of bile duct (BD) after hepatic radiofrequency (RF) necrosis with hepatic pedicle clamping. The bile ducts were cooled with cold 5% glucose isotonic serum. Hepatic removal was performed 3 weeks after RF (hematoxylin and eosin stain). The bile ducts in contact with the necrotic area were preserved. Necrosis (N) of hepatic parenchyma (original magnification $\times 20$).

therapy for unresectable liver tumors owing to be a safety procedure with acceptable complication rates.^{4,8,14} Mulier et al⁶ described the complications of RF ablation of liver tumors from 82 series found in the literature, published from 1990 to December 2001. The bile ducts represented 1% of the complications in 3670 patients. This rate was probably underestimated since peripheral biliary lesions are often clinically

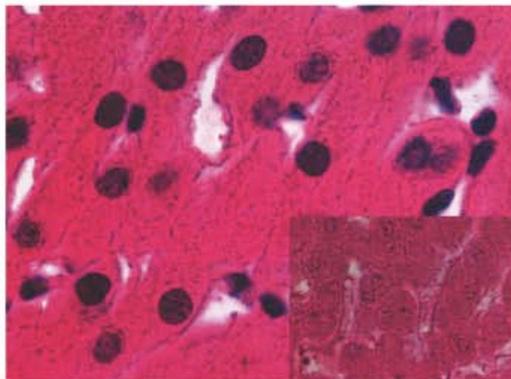


FIGURE 2. A, Histologic appearance of incomplete necrosis of hepatic parenchyma. Radiofrequency was performed with hepatic pedicle clamping. The bile ducts (BD) were cooled with cold 5% glucose isotonic serum. Hepatic removal was performed 1 week after RF (hematoxylin and eosin stain). The cell structures indicated that the intracellular cytoplasmic structures had coagulated (original magnification $\times 40$). B, Histologic appearance in the center of the same area of hepatic necrosis: the necrosis was total (original magnification $\times 40$) (inset).

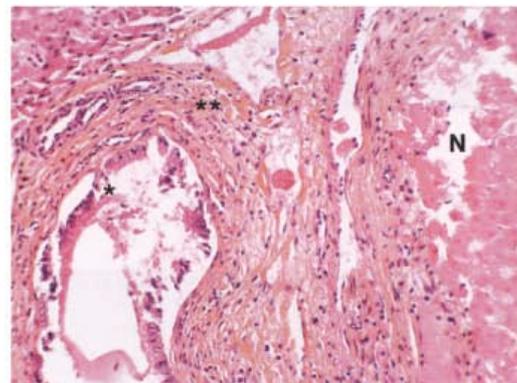


FIGURE 4. Histologic appearance of damaged bile duct (BD) in contact with the hepatic radiofrequency (RF) necrosis. RF was performed with hepatic pedicle clamping. The bile ducts were cooled with cold 5% glucose isotonic serum. Hepatic removal was performed 3 weeks after RF (hematoxylin and eosin stain). *The epithelium was dislocated. **The bile duct wall was preserved. Necrosis (N) of hepatic parenchyma (original magnification $\times 20$).

TABLE 5. Histologic Lesions According to Cooling of the Intrahepatic Ducts and Pedicle Clamping

	Without Cooling				With Cooling			
	No Pedicle Clamping		Pedicle Clamping		No Pedicle Clamping		Pedicle Clamping	
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8
No lesion	0	2	0	0	9	9	8	9
Proximal lesions	9	4	4	0	1	1	2	1
Proximal and distal lesions	1	4	6	10	0	0	0	0

asymptomatic. Furthermore, biliary lesions have delayed presentation up to 4 months after RF.^{5,18}

We observed that cooling the intrahepatic bile ducts with a cold 5% glucose isotonic solution prevented radiologic and histologic lesions during an RF ablation in contact with the intrahepatic bile ducts. Indeed, the radiologic and histologic lesions observed without biliary cooling were not observed anymore when the bile ducts were chilled. The group of pigs that had their intrahepatic bile ducts cooled showed more radiologic biliary lesions (7 cases) than histologic lesions (5 cases). The radiologic lesions associated with no histologic lesions were hepatic ducts that crossed the necrotic zone. Indeed, the bile ducts surrounding the ablated zone seemed protected from the heat, and we observed that only the bile ducts included in the necrosis were damaged. Since liver tumors do not invade the biliary structures but tend to press them back,¹⁹ it may be argued that these radiologic lesions that we observed in the pig^{19,20} would not exist in humans. Intrahepatic bile ducts are more suspected to surround human liver tumors and consequently be more protected from the heat. Interestingly, 3 of these 5 histologic lesions occurred on clamped livers. Elias et al²¹ emphasized that hepatic flow (no pedicle clamping) could prevent the heat diffusion to the bile duct, but with a potentially higher risk of tumor recurrence.^{22,23}

Moreover, the pig intrahepatic bile ducts run along and in contact with the hepatic vessels. The vascular flow is also considered to protect the bile ducts from the thermal effects of RF by dissipating the heat generated in the ablated area ("cooling effect" or "heat-sink effect").^{17,19,20,24,25} To neutralize the "cooling effect" and to evaluate more specifically the role of bile ducts cooling, we also clamped the hepatic pedicle during the present study. The use of pedicle clamping had a great effect on the lesion size. We also observed a relation between pedicle clamping and presence of histologic lesions at longer distance from the RF zone.¹⁵ The tissue reaction created by the ablation continues through 7 days after the procedure;²⁶ thus, the time to remove the liver was fixed at 1 week and 3 weeks after the ablation. This allowed to follow up the evolution of the lesions and particularly the necrosis of the lesions that shrinks and modifies over time.²⁷

We are not aware of other experimental studies in the literature evaluating bile duct protection during RF ablation. However, Seifert et al²⁸ protected bile ducts with hot serum perfusion in a pig *ex vivo* liver model using cryotherapy in vicinity of the bile ducts. This model consisted in the perfusion of the bile duct with a saline-based isotonic serum heated at 37°C, via a catheter introduced through a chole-

dochotomy.²⁸ Cryotherapy (instead of RF), type, and temperature of cooling liquid and bile ducts cooling liquid flow rates were different in this study and make comparison unreliable.

Several authors have proposed different solutions when an ablation was considered near the bile ducts to prevent secondary lesions. Bilchick et al²⁹ recommended placing a stent before the ablation of central lesions dangerous for the bile ducts. Elias et al²¹ reported the cooling of the bile ducts in 3 cases. In follow-up over 3 months, the 3 patients did not show any evidence of biliary complications or local tumor recurrences.

Studies evaluating local recurrences after RF ablation of primary tumors (hepatocellular carcinoma) or secondary tumors (mainly from colorectal tumors) showed a correlation with the size of the tumor (up to 35% for tumors with a diameter over 2–3 cm).^{30–32} Several solutions have been developed to lower the local recurrence rate. These solutions included the use of sodium chloride, either by perfusing the tumor with an isotonic physiologic serum during the RF procedure³³ or by injecting, prior to the procedure, hypertonic physiologic serum into the tumor.³⁴ Sodium chloride, whatever its concentration,³⁴ modifies the electric conductivity inside the hepatic tissue. For this reason, physiologic serum (sodium chloride 0.9 g/100 mL) and ringer lactate (containing sodium chloride 0.6 g/100 mL) were not used in this study to cool the bile ducts. We demonstrated that cooling of the bile ducts with a cold 5% glucose isotonic solution effectively prevented biliary lesions during an ablation. However, the key point is still to set up the optimal bile duct cooling temperature that could prevent biliary lesions but should also guarantee the intended therapeutic effect (tumor necrosis volume and low recurrence rate) at the same time. Another issue to evaluate is to know whether the less complete necrotic zones observed in contact with the cooled hepatic ducts are viable by studying the enzymatic activity of the mitochondria²⁴ or the respiratory metabolism by using a NADH-diaphoresis tinting (nicotinamide adenine dinucleotide-diaphorase).³⁵

CONCLUSION

Cooling of the intrahepatic bile ducts with a cold 5% glucose isotonic solution during an RF ablation of liver tissue in contact with intrahepatic bile ducts protects them from secondary effects of hyperthermia. This protection is effective for the bile ducts situated in contact with the ablated zones and on bile ducts at distance. The total volume of necrosis achieved is not significantly different with or without biliary cooling.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dominique Marius Leprince and Liane Goergen for manuscript assistance, and Yasmine El-sari, Bruno Di-Cientio, and the Radiology and Pathology's staff for technical assistance.

AQ: 5

REFERENCES

- De Baere T, Elias D, Dromain C, et al. Radiofrequency ablation of 100 hepatic metastases with a mean follow-up of more than 1 year. *AJR Am J Roentgenol.* 2000;175:1619–1625.
- Curley SA. Radiofrequency ablation of malignant liver tumors. *Oncologist.* 2001;6:14–23.
- Goldberg SN, Gazelle GS, Dawson SL, et al. Tissue ablation with radiofrequency: effect of probe size, gauge, duration and temperature on lesion volume. *Acad Radiol.* 1995;2:399–404.
- Parikh AA, Curley SA, Fornage BD, et al. Radiofrequency ablation of hepatic metastases. *Semin Oncol.* 2002;29:168–182.
- Machi J, Uchida S, Sumida K, et al. Ultrasound-guided radiofrequency thermal ablation of liver tumors: percutaneous, laparoscopic and open surgical approaches. *J Gastrointest Surg.* 2001;5:477–489.
- Mulier S, Mulier P, Ni Y, et al. Complications of radiofrequency coagulation of liver tumors. *Br J Surg.* 2002;89:1206–1222.
- Curley SA, Izzo F, Delrio P, et al. Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients. *Ann Surg.* 1999;230:1–8.
- Wood TF, Rose M, Chung M, et al. Radiofrequency ablation of 231 unresectable hepatic tumors: indications, limitations and complications. *Ann Surg Oncol.* 2000;7:593–600.
- Stippel DL, Töx U, Gossman A, et al. Successful treatment of radiofrequency-induced biliary lesions by interventional endoscopic retrograde cholangiography (ERC). *Surg Endosc.* 2003;17:1965–1970.
- Bilchik AJ, Rose DM, Allegra DP, et al. Radiofrequency ablation: a minimally invasive technique with multiple applications. *Cancer J Sci Am.* 1999;5:356–361.
- Nordlinger B, Rougier P. Nonsurgical methods for liver metastases including cryotherapy, radiofrequency ablation, and infusional treatment: what's new in 2001? *Curr Opin Oncol.* 2002;14:420–423.
- Dodd GD, Soulen MC, Kane RA, et al. Minimally invasive treatment of malignant hepatic tumors: at the threshold of a major breakthrough. *RadioGraphics.* 2000;20:9–27.
- Pearson AS, Izzo F, Fleming D, et al. Intraoperative radiofrequency ablation or cryoablation for hepatic malignancies. *Am J Surg.* 1999;178:592–599.
- Elias D, De Baere T, Mutillo I, et al. Intraoperative use of radiofrequency treatment allows an increase in the rate of curative liver resection. *J Surg Oncol.* 1998;67:190–191.
- Marchal F, Elias D, Rauch P, et al. Biliary lesions during radiofrequency ablation in liver: study on the pig. *Eur Surg Res.* 2004;36:88–94.
- Baronne R. Glandes annexes de l'intestin: foie. In: Baronne R, ed. *Anatomie comparée des mammifères domestiques.* Paris: Vigot, 1984: 507–561.
- De Baere T, Denys A, Wood BJ, et al. Radiofrequency liver ablation: experimental comparative study of water-cooled versus expandable systems. *AJR Am J Roentgenol.* 2001;176:187–192.
- Livraghi T, Solbiati L, Meloni MF, et al. Treatment of focal liver tumors with percutaneous radio-frequency ablation: complications encountered in a multicenter study. *Radiology.* 2003;226:441–451.
- Hansen PD, Rogers S, Corless CL, et al. Radiofrequency ablation lesions in a pig liver model. *J Surg Res.* 1999;87:114–121.
- Patterson EJ, Scudamore CH, Nagy AG, et al. Radiofrequency ablation of porcine liver in vivo-effects of blood flow and treatment time on lesion size. *Ann Surg.* 1998;227:559–565.
- Elias D, El Otmany A, Goharin A, et al. Intraductal cooling of the main bile ducts during intraoperative radiofrequency ablation. *J Surg Oncol.* 2001;76:297–300.
- Heisterkamp J, Van Hillgersberg R, Ijzermans JNM. Critical temperature and heating time for coagulation damage: implications for interstitial laser coagulation (ILC) of tumors. *Lasers Surg Med.* 1999;25:257–262.
- Prudhomme M, Rouy S, Tang J, et al. Biliary structures lead to tumour recurrences after laser-induced interstitial thermotherapy. *Lasers Surg Med.* 1999;24:269–275.
- Goldberg SN, Hahn PF, Tanabe KK, et al. Percutaneous radiofrequency tissue ablation: does perfusion-mediated tissue cooling limit coagulation necrosis? *J Vasc Interv Radiol.* 1998;9:101–111.
- Chinn SB, Lee FT, Kennedy GD, et al. Effect of vascular occlusion on radiofrequency ablation of the liver: results in a porcine model. *AJR Am J Roentgenol.* 2001;176:789–795.
- Goldberg SN, Gazelle GS, Campton CC, et al. Treatment of intrahepatic malignancy with radiofrequency ablation: radiologic-pathologic correlation. *Cancer.* 2000;88:2452–2463.
- McGahan JP, Brock JM, Tesluk H, et al. Hepatic ablation with use of radio-frequency electrocautery in the animal model. *J Vasc Interv Radiol.* 1992;3:291–297.
- Seifert JK, Dutkowski P, Junginger T, et al. Bile duct warmer in hepatic cryosurgery: a pig liver model. *Cryobiology.* 1997;35:299–302.
- Bilchik AJ, Wood TF, Allegra DP. Radiofrequency ablation of unresectable hepatic malignancies: lessons learned. *Oncologist.* 2001;6: 24–33.
- Solbiati L, Goldberg SN, Ierace T, et al. Hepatic metastases: percutaneous radio-frequency ablation with cooled-tip electrodes. *Radiology.* 1997;205:367–373.
- Livraghi T, Goldberg SN, Lazzaroni S, et al. Hepatocellular carcinoma: radio-frequency ablation of medium and large lesions. *Radiology.* 2000; 214:761–768.
- Goldberg SN, Gazelle GS, Solbiati L, et al. Ablation of liver tumors using percutaneous RF therapy. *AJR Am J Roentgenol.* 1998;170:1023–1028.
- Haensler JM, Strobel D, Wein A, et al. Percutaneous ultrasound guided radio frequency tissue ablation (RFTA) with a new applicator type-treatment of hepatocellular (HCC) and liver metastases. *Ultrasound Med Biol.* 2000;26:2761A.
- Goldberg SN, Ahmed M, Gazelle GS, et al. Radio-frequency thermal ablation with NaCl solution injection: effect of electrical conductivity on tissue heating and coagulation-phantom and porcine liver study. *Radiology.* 2001;219:157–165.
- Neumann RA, Knobler RM, Pieczkowski F, et al. Enzyme histochemical analysis of cell viability after argon laser-induced coagulation necrosis of the skin. *J Am Acad Dermatol.* 1991;25:991–998.

2. Cinétique de distribution intahépatique et intratumorale de la 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorine (*m*-THPBC)

2.1. Modèle expérimental de tumeur hépatique chez le rat athymique à partir d'une lignée de tumeur humaine HT29

La majorité des modèles animaux expérimentaux de tumeurs hépatiques est développée à partir de souris nude, pesant de 20 à 30 g à six-huit semaines de vie (287, 288). Les tumeurs hépatiques sont de petites tailles, de 2 à 4 mm, rendant difficile une mesure *in vivo* de la concentration intratumorale d'un photosensibilisant (288). C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de développer un modèle expérimental chez le rat. Son poids est dix fois plus élevé que celui de la souris. Nous avons pu obtenir des tailles tumorales de 1 à 2 cm avec des volumes de près de 3000 mm³. Ces volumes tumoraux permettent de reconstituer de manière assez similaire des métastases hépatiques; en effet, au delà d'une certaine taille tumorale, la métastase se développe à partir de la périphérie grâce à la néoangiogénèse tumorale, le centre de la métastase étant nécrotique par défaut d'oxygénation. Le choix de la lignée issue d'adénocarcinome colique humain (HT 29) a été dicté par la parfaite maîtrise au sein de notre laboratoire de cette souche tumorale depuis de nombreuses années (173, 289, 290).

Ce modèle expérimental a été publié dans *Oncology Reports* (2005; 14 (5): 1203-1207) et est présenté dans les pages suivantes sous forme d'article.

Development of an HT29 liver metastases model in nude rats

FRÉDÉRIC MARCHAL^{1,2}, N'GUYEN TRAN², SOPHIE MARCHAL¹,
AGNES LEROUX³, CHRISTIAN MARCHAL⁴, LINA BOLOTINE¹,
FRANÇOIS GUILLEMIN¹ and JEAN PIERRE VILLEMOT²

¹Centre Alexis-Vautrin, CRAN UMR 7039 CNRS-UHP-INPL; ²Laboratoire Chirurgie Expérimentale Nancy University, School of Medicine, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy; Departments of ³Pathology and ⁴Radiation Oncology, Centre Alexis Vautrin, Regional Cancer Center, Vandoeuvre-Lès-Nancy, France

Abstract. The liver is the most frequent and fatal site of distant spreading of colorectal cancer. Most liver metastases animal models involve nude mice and an injection of tumour cells through the spleen or portal vein, or orthotopic implantation of tumour cells in the colon wall. The aim of this study was to develop a reliable rat model of liver metastases with human colorectal HT29 cells. Seventy male athymic Rowett nude rats weighing 300 ± 30 g were separated into three groups. The first group (n=20) consisted of untreated rats, rats in the second group (n=20) were immunosuppressed by cyclosporin A, and those in the third group (n=30) were irradiated the day before cell grafting. Tumour cells (2×10^7) were subcapsularly injected into the liver, and rats were sacrificed after 60 days. The livers were excised, and tumours were serially sectioned to determine size and volume, then fixed for histological studies. The take-rate was 55% in the first group, 35% in the second and 74% in the third group. The mean volume of tumours in the first group was 537 ± 162 mm³, 613 ± 232 mm³ in the second group and 2949 ± 629 mm³ in the third group. In conclusion, subcapsular injection of the human colonic HT29 cancer cells into the liver of preoperatively irradiated nude rats is a reliable, reproducible and easily obtained model, which should be useful for preclinical studies.

Introduction

The estimated number of new cases of colorectal cancer in France was 36,257 in 2000, with approximately 16,000

Correspondence to: Dr Frederic Marchal, Department of Surgery, Centre Alexis Vautrin, Av. de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Key words: experimental model, HT29 cells, athymic rat, immunosuppression, liver metastasis, irradiation

deaths (1). Metastasis is a frequent event in colorectal cancer and the most common secondary liver malignancy. More than 50% of patients with colorectal cancer either have at diagnosis or will subsequently develop liver metastases. Surgery is the established standard of care for hepatic colorectal metastases, with a 5-year overall survival rate ranging from 27% to 50% after resection (2,3). Nevertheless, only 10-25% of patients with isolated metastases of the liver are eligible for surgical resection because of an extension of disease or concurrent medical disability (3). For all other patients, treatment is palliative. In recent years, there has been growing interest in local ablative therapy such as radiofrequency as a therapeutic option to control disease in irresectable patients or as an adjunct to liver surgery (4-6).

Optimisation of the new local therapeutics requires experimental models of human colorectal carcinoma liver metastases. The majority of animal models involve athymic mice and an injection of tumour cells through the spleen or portal vein, or orthotopic implantation of tumour cells in the colon wall (7,8). While syngenic models are nicely suited for studying mechanisms of the natural metastatic process, human tumour xenografts may be the preferential model for evaluating new therapies when cytotoxicity is the endpoint (8). Another important issue for evaluating the effect of local therapy is the size of the liver and metastases, and using small animals such as mice is therefore not always relevant.

There are only limited data on the development of hepatic metastases from human colorectal cancers in experimental animals. A metastatic human colorectal model was reported by Vogel *et al* in 1998 (9) and consisted of injecting human colorectal HT29 cells into the portal venous system of athymic rats. However, only 50% of the rats injected with HT29 cells developed liver metastases of 3-4 mm after 60 days. The aim of this study was to develop a human colorectal carcinoma (HT29) liver metastases model with a better tumour take-rate and a tumour size superior to 1 cm.

Materials and methods

Animals. A total of 70 male athymic Rowett nude rats (Hsd: RH-mu) (Harlan UK Ltd., Shaw's Farm, Oxon, UK) weighing

Table I. Hepatic metastasis take-rate, mean of tumor appearance delay and tumor volume.

	No. of rats	No. of tumour-bearing rats (%)	Mean tumour appearance delay (days)	Mean tumour volume (mm ³)
Untreated nude rats	20	11 (55%)	96±28	537±162
Athymic rats + cyclosporine A	20	7 (35%)	100±48	613±232
Pre-irradiated nude rats	30	22 (74%)	72±13 ^a	2949±629 ^a

^aDifferences are statistically significant compared with the group of untreated nude rats (p=0.0300 and 0.0001, respectively).

300±30 g were used in these experiments. The animals were kept in special pathogen-free conditions in a laminar flow cabinet with constant temperature (24-26°C), humidity (40-50%) and 12 h light/dark cycle. The animals had free access to food and water. The experiments were approved by the Animal Welfare Committee of the Faculty of Medicine in Nancy (Vandoeuvre-lès-Nancy, France), and the animals received care in accordance with established guidelines of FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

Tumour cell line. Colorectal tumour-derived human cell line HT29 was obtained from the ATCC cell collection and regularly controlled for mycoplasma contamination. Cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS; PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), 1% penicillin (10 000 IU), streptomycin (10 000 µg/ml) and 1% 200 mM glutamin (Life Technologies). Cells were kept at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, trypsinized and re-seeded into fresh medium every 7 days. One week before treatment, 2x10⁴ cells/ml were seeded in 175 cm² flasks. Just before tumour cell implantation, cells were trypsinized, counted and resuspended in 0.5 ml 5% glucose solution to obtain 1 to 3x10⁸ cells/ml.

Experimental groups. The rats were anaesthetised with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (45 mg/kg body weight; Sanofi, Libourne, France) and placed in a supine position on an animal board in order to maintain body temperature at 25-30°C. A 3-cm median laparotomy was performed, and the liver was mobilised and exposed. A single cell suspension of 0.5 ml containing 2x10⁷ tumour cells was prepared and subcapsularly injected into the liver through a catheter 29 G (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium) in order to obtain a unique tumour. Hemostasis was achieved by gentle compression of the liver. When the rats awoke, each was isolated in a separate cage with food and water. The rats were treated prophylactically with amoxicillin-clavulanate (Augmentin®; GlaxoSmithKline, Marly-le-Roi, France) in 0.35 mg/ml drinking water for 2 weeks. The animals were monitored daily over a period of 60 days. The general condition of animals deteriorated progressively with cachexy and apathy while developing a growing tumour.

The 70 rats used for the study were divided into 3 groups. In the first group (n=20), the rats were grafted without any prior treatment. In the second group (n=20), a pump (Osmotic pump 2ML4 Alzet®; Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) was intra-abdominally implanted after the graft. This pump delivered cyclosporine A (Sandimmun® 50 mg/ml; Novartis Pharma SAS, Rueil-Malmaison, France) at a dose of 20 mg/kg per day for 4 weeks. In the third group (n=30), rats were given 3.5 Gy whole body irradiation using a particle accelerator (Gamma 1.25 MeV photons), Theratron 780C® (Theratronics, MDS Nordion, Ottawa, Canada), the day before the liver graft. The source was at a distance of 100 cm from the rat.

Histological study. Animals were sacrificed on day 60 and autopsied, and the livers were removed. Each hepatic tumour was sectioned transversally. Tumour dimensions were determined using caliper measurements. The volume of each tumour was calculated as $\Pi x(axb^2)/6$, where 'a' is the maximal tumour diameter, 'b' is the minimal tumour diameter. The hepatic sample was fixed with alcohol Bouin liquid (Dubosq-Brasil®; Elvetec Services, Genas, France) for 24 h. The samples were embedded in paraffin (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France), then cut into sections of 6 microns, and coloured with saffron hematoxylin-eosin (HES; Fisher) before microscopic analysis.

Statistical analysis. The data were presented as mean ± standard deviations. A Student's t-test and Chi-square test were used to measure possible differences between the groups. Statistical significance was accepted when P<0.05. The data were analyzed and compared using Staviw 5.0® (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA).

Results

General observations. There were no complications related to the surgical procedure and no rats died prematurely. The incidence of carcinomatosis (multiple metastases outside the liver) in our model was only 2%. The average body weight increase in animals without metastases (n=30) was 70.0±8.3 g, whereas animals with hepatic metastases (n=40) lost an average of 50.0±10.5 g.

Intergroup variations in the development of liver metastasis in athymic rats. Table I demonstrates that in the first group



Figure 1. Liver tumour from HT-29 cell line. Liver parenchyma (L) with tumour (T) composed of tubular and villous structures lined by stratified columnar cells, and neoplastic embolus (E) in liver parenchyma. Hematoxylin and eosin; original magnification, x6.3. (Inset) Neoplastic intravascular embolus (IVE) in the liver pedicle. Hematoxylin and eosin; original magnification, x10.

(rats without pre-treatment), the take-rate of liver metastasis was 55% (11/20) and not significantly different compared to the take-rate of 35% (7/20) in the second group pretreated with cyclosporin A ($P=0.20$). Among the three tested groups, the best take-rate of 74% (22/30) was observed for the third group of rats pretreated with whole body irradiation. However, the tumour take-rate for this group was not statistically different from the group of non-pretreated rats ($P=0.18$); the significant difference was found between pre-irradiated and CyA-immunosuppressed rat groups ($P=0.007$).

Along with the highest take-rate of colorectal hepatic metastasis in the group of pre-irradiated rats, this group also revealed the shortest delay in tumour growth compared to the group of non-pretreated rats (72 vs. 96 days; $p=0.03$). A similar delay was noted for the group of CyA-immunosuppressed rats (100 ± 48 days) and group of non-pretreated rats ($P=0.8$).

Another parameter to consider was the volume of the developed hepatic tumour. The mean volume of tumours in the first group was 537 ± 162 mm³ and did not differ from that in the second group (613 ± 232 mm³; $P=0.36$). Compared to the rats in the first and second groups, the largest tumours were registered in the group of pre-irradiated rats with a mean tumour volume of 2949 ± 629 mm³ ($P<0.0001$).

Histopathological examination. Fig. 1 displays a moderately differentiated adenocarcinoma with invasion of the liver parenchyma (Fig. 1) Histological examination of tumours showed the formation of glandular structures, with a few fibrous connective tissue. Necrotic areas were found in the center of the larger tumours. We also observed tumour invasion into the normal liver vasculature.

Discussion

The liver is the most common site of distant metastases from colorectal cancer (2,3). The development of local therapeutic approaches to liver metastases requires a simple, reliable, and economical animal model. Our studies have led to the development of a rapid and reproducible model of liver metastases in which human colorectal tumour-derived cells can be engrafted into the liver.

The natural course of human disease is closely imitated in the chemical induction of rat colonic cancer, but a 12-30-week induction time of a bowel tumour and late occurrence of liver metastases restrict the use of this model (7,10). Inoculation of tumour cells in the large bowel wall shortens this time, but the incidence and size of the hepatic metastases have been variable after both rodent or human tumour cell injection (11). Likewise, an enhanced metastatic potential required serial cell selection to achieve a reliable hepatic tumour graft (12). Another problem with large bowel wall inoculations is the primary tumour must be removed in a second laparotomy to obtain isolated hepatic metastases (7). Intrasplenic or intraportal cell injection has the advantage of portal spread and a fairly simple surgical procedure, but does not always cause hepatic metastases (7,9). Direct hepatic inoculation proposed in the present study is likely to be artificial in view of metastasis spreading, however, the histological characteristics (Fig. 1) are consistent with the tumour from which the cell line was originally derived. The human colonic adenocarcinoma cell line, used in the present model, is potentially better suited for studies with human applications than animal-derived tumours.

Models of hepatic metastases from human colonic cancer were established in athymic mice, with a high tumour take-

rate (7). However, for *in vivo* experimentation, athymic rats more readily allow surgical procedures and/or repeated blood sampling and can carry a much greater tumour burden (13). The limiting factor in athymic rats is their relative immunocompetence compared to athymic mice. Previous studies on athymic rats given subcutaneous injections of human tumour material have shown reduced take-rates compared to nude mice and a tendency toward spontaneous tumour regression (14,15). To surmount the existing immunoreactivity, two pretreatments for athymic rats were employed in our study, either whole body irradiation with 3.5 Gy or *i.p.* injection of cyclosporin A for 4 weeks. Pretreatment with γ -radiation resulted in a tumour take-rate of 75% and was significantly greater compared to CyA-immunosuppressed rats that exhibited a take-rate of 35% ($P=0.007$). Pre-irradiated group also demonstrated a strong trend toward better tumour output compared to the group of non-pretreated animals. All examined tumours had a cytology and histology consistent with those of parent tumours from which the cell line was derived (Fig. 1). Intraperitoneal injection of cyclosporin A for 4 weeks had no effect on take-rates and tumour size in comparison with the group of non-pretreated rats. The use of cyclosporin A as an adjuvant immunosuppression failed when tumours were moderately or well-differentiated (16,17). On the other hand, cyclosporin A increases take-rates of aggressive tumours such as sarcomas, leukemia cell lines or cell lines from chemical induction of rat colonic cancer (16,18). The HT29 cell line was established from a moderately differentiated human colon adenocarcinoma, and this could explain the absence of different take-rates and tumour sizes between groups of nude rats with or without administration of cyclosporin A.

Evidence presented here that the whole-body irradiation significantly increased tumour take-rates is consistent with previous reports showing increased take-rates for subcutaneous or intracerebral tumour xenografts after irradiation in athymic rats (9,19). The choice of 3.5 Gy for the irradiation dose was a compromise between the required immunosuppression and low toxicity. No lethality was observed for irradiated rats. This approach demonstrated better tumour yield than that obtained with several serial-cell selection (9,12). The mechanism by which irradiation facilitates ectopic or ortotopic tumour establishment in nude rats is not fully known. Since natural killer cells, macrophages, and plasma cells are relatively resistant to γ -radiation, it seems more likely that damage by irradiation to some B- or T-like cell populations might be relevant (13,20).

The reason for take-rates of <100% in irradiated rats implanted with HT29 cells could be due to immune recovery in some rats, more stringent growth requirements of this cell line, incomplete expulsion of tumour cells from the syringe, or accidental mechanical dislodging of implanted cells from their liver implantation into the abdominal cavity through the puncture point. Previous studies of human tumour cells xenografted in nude rats showed that most tumour grafts tend to regress after a certain size or age (14,15), presumably due to an immunological response. Such trend was not evident in the group of irradiated rats, especially if rats were irradiated just before cells were grafted (13,14).

There is only one study that reports development of liver metastases with the HT29 cell line in nude rats (9). The cell suspension was injected into the portal vein, and the take-rate was 50% with parental HT29 cells and 60% with a variant cell line after two cycles of selection of liver metastases from parental HT29 cells. The size of metastases ranged from 2 to 4 mm at 60 days. The model delineated in the present study exhibits a much better tumour take-rate and, more importantly, a much larger size (1-2 cm) thus rendering relevant investigations of new therapeutic modalities for the treatment of colon metastasis in the liver.

In conclusion, subcapsular injection of the human colonic cancer cell line HT29 in the liver of preoperatively irradiated nude rats induced hepatic metastasis in 75% of cases. With a mean time of 72 days for palpable tumour growth together with a tumour volume of approximately 3000 mm³, the proposed model should be particularly useful for preclinical animal studies in which complicated surgery or large volumes of tumour are required.

Acknowledgements

This work was supported by Alexis Vautrin Cancer Center Funds and French Ligue Nationale contre le Cancer.

References

1. Bouvier AM, Remontet L, Jouglu E, Launoy G, Grosclaude P, Buemi A, Tretarre B, Velten M, Dancourt V, Menegoz F, Guizard AV, Macé Lesec'h J, Peng J, Bercelli P, Arveux P, Estève J and Faivre J: Incidence of gastrointestinal cancers in France. *Gastroenterol Clin Biol* 28: 877-881, 2004.
2. Ohlsson B, Stenrarn U and Tranberg KG: Resection of colorectal liver metastases: 25-year experience. *World J Surg* 22: 268-276, 1998.
3. Fong V, Fortner J, Sun RL, Brennan MF and Blumgart LH: Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *Ann Surg* 230: 309-321, 1999.
4. Elias D, Goharin A, El Otmayn A, Taieb J, Duvillard P, Lasser P and De Baere T: Usefulness of intraoperative radiofrequency thermoablation of liver tumours associated or not with hepatectomy. *Eur J Surg Oncol* 26: 763-769, 2000.
5. Gargea A, Lloyd TD, Aylott C, Maddern G and Berry DP: The emergent role of focal liver ablation techniques in the treatment of primary and secondary liver tumours. *Eur J Cancer* 39: 2150-2164, 2003.
6. Marchal F, Elias D, Rauch P, Leroux A, Stines J, Verhaeghe JL, Guillemin F and Villemot JP: Biliary lesions during radiofrequency ablation in liver. Study on the pig. *Eur Surg Res* 36: 88-94, 2004.
7. Panis Y and Nordlinger B: Experimental models for hepatic metastases from colon and rectum tumours. *Ann Chir* 45: 222-228, 1991.
8. Brand ML, Casillas S, Dietz DW, Milson JW and Vladisavljevic A: Development of a reliable colorectal cancer liver metastasis model. *J Surg Res* 63: 425-432, 1996.
9. Vogel I, Shen Y, Soeth E, Juhl H, Kremer B, Kalthoff H and Henne-Bruns D: A human carcinoma model in athymic rats reflecting solid and disseminated colorectal metastases. *Langenbeck's Arch Surg* 383: 466-473, 1998.
10. Gilbert AM: Experimental colorectal cancer as a model of human disease. *Ann R Coll Surg Engl* 69: 48-53, 1987.
11. Graft W, Sundin A, Glimelius B, Ahlström H and Carlsson J: Induction and quantification of hepatic metastases from a human colonic cancer in the nude rat. *Eur J Surg Oncol* 18: 608-614, 1992.
12. Wang M, Vogel II and Kalthoff HO: Correlation between metastatic potential and variants from colorectal tumor cell line HT-29. *World J Gastroenterol* 9: 2627-2631, 2004.

13. Howard RB, Chu H, Zeligman BE, Marcell T, Bunn PA, McLemore TL, Mulvin DW, Cowen ME and Johnston MR: Irradiated nude rat model for orthotopic human lung cancers. *Cancer Res* 51: 3274-3280, 1991.
14. Shouval D, Schuger L, Levij IS, Reid LM, Neeman Z and Shafritz DA: Comparative morphology and tumorigenicity of human hepatocellular carcinoma cell lines in athymic rats and mice. *Virchows Arch* 412: 595-606, 1988.
15. Linden CJ and Johansson L: Progressive growth of a human pleural mesothelioma xenografted to athymic rats and mice. *Br J Cancer* 58: 614-618, 1988.
16. Eccles SA, Heckford SE and Alexander P: Effect of cyclosporin A on the growth and spontaneous metastasis of syngenic animal tumours. *Br J Cancer* 42: 252-259, 1980.
17. Topal B, Roskams T, Fevery J and Penninckx F: Aggregated colon cancer cells have a higher metastatic efficiency in the liver compared with nonaggregated cells: an experimental study. *J Surg Res* 112: 31-37, 2003.
18. Panis Y, Ribeiro J, Chretien Y and Nordlinger B: Dormant liver metastases: an experimental study. *Br J Surg* 79: 221-223, 1992.
19. Beauchesne P, Bertrand S, Revel R, Pialat J, Brunon J, Mornex F and Doré JF: Development of an intracerebral glioma model in whole body irradiated hairless rats. *Anticancer Res* 20: 703-706, 2000.
20. Farnsworth A, Wotherspoon JS and Dorssh SE: Post-irradiation recovery of lymphoid cells in the rat. *Transplantation* 46: 418-425, 1988.

2.2. Pharmacocinétique intrahépatique et intratumorale de la *m*-THPBC par spectroscopie de diffusion élastique et par extraction

L'application de la thérapie photodynamique sur le foie, est limitée par l'absorption importante du tissu dans l'intervalle spectral ultraviolet (UV)-visible, jusqu'aux longueurs d'onde supérieures à 620 nm. Elle est consécutive au fort taux d'hémoglobine et d'oxyhémoglobine. De ce fait, si la bande d'absorption du photosensibilisant (PS) est située dans la région d'absorption de l'hémoglobine, la probabilité d'absorption des photons par le photosensibilisant est faible, et le traitement devient inefficace. La recherche d'un PS aux propriétés photo-physiques optimales pour son utilisation dans le foie est en conséquence importante. La *m*-THPBC, qui présente un fort pic d'absorption dans le proche infrarouge (IR) (environ 740 nm), rend son usage particulièrement intéressant car dans cette bande d'absorption, le foie est relativement transparent et l'efficacité photodynamique de la *m*-THPBC est élevée.

La Figure 2.1. reporte dans la bande spectrale UV-visible-IR proche, les spectres d'absorption de l'hémoglobine diluée dans l'eau pure et de la *m*-THPBC diluée dans le méthanol. L'hémoglobine possède deux bandes d'absorption: la bande de Soret, qui couvre l'UV proche à la longueur d'onde de 450 nm, et le Q-band compris entre 480 et 650 nm. Dans la région rouge et proche infrarouge (640–660 nm), l'absorption de l'hémoglobine est relativement faible. La déoxyhémoglobine possède encore une faible bande d'absorption autour d'un pic maximum à 760 nm. La *m*-THPBC présente trois bandes d'absorption: de 330 à 390 nm dans le proche UV, de 500 à 530 nm (avec un pic à 516 nm) dans le visible et de 710 à 755 nm (avec un pic à 735 nm) dans le proche infrarouge. L'efficacité du traitement dépend entre autres de la concentration du PS dans le tissu illuminé. En général, le traitement est plus efficace quand la concentration de PS est élevée ou suffisamment importante. Des études cinétiques sont donc essentielles afin de définir l'intervalle optimal entre l'injection du PS et l'application de la lumière. Bien que la fluorescence de la *m*-THPBC puisse être excitée dans les 3 bandes d'absorption décrites, le pic de fluorescence est trop proche du pic d'absorption, pour effectuer la pharmacocinétique de la *m*-THPBC par fluorescence dans le foie.

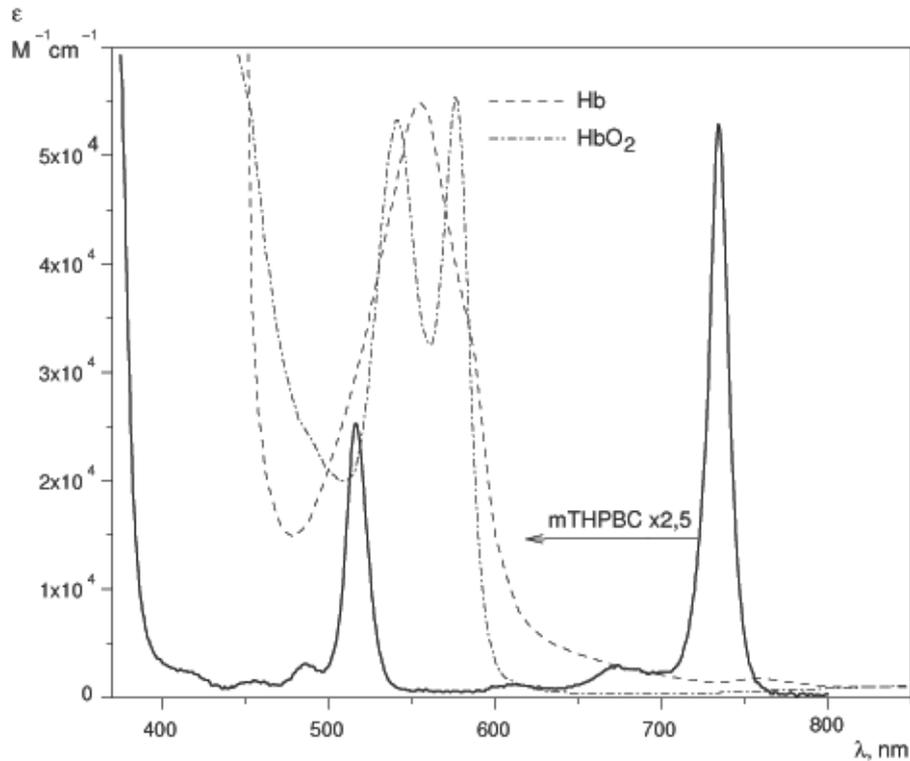


Figure 2.1. Spectres d'absorption de l'oxyhémoglobine (HbO_2), déoxyhémoglobine (Hb) dans l'eau pure, de 5,10,15,20-Tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (*m*-THPBC) dans le méthanol.

2.2.1. Techniques de mesure de la concentration intratissulaire d'un photosensibilisant

Il existe deux types de méthodes de mesure de la concentration d'un photosensibilisant: les méthodes invasives (par extraction ou micro-dialyse) et les méthodes non-invasives (par les méthodes de "pharmacocinétique optique" ESS (*Elastic Scattering Spectroscopy*) ou LIFS (*Light Induced Fluorescence Spectroscopy*)). La concentration d'un PS peut être mesurée par l'extraction chimique d'un échantillon et la mesure de l'intensité de fluorescence (291). Dans le cas de produits fluorescents, cette méthode est considérée comme la méthode de référence "gold standard". Dans le cas d'études pré-cliniques chez l'animal, cette méthode présente le désavantage de ne pas pouvoir être renouvelée sur le même animal du fait de son caractère invasif. Il existe une demande pour mesurer la concentration de médicaments de façon non-invasive et en temps réel. Dans le cas où la molécule est

fluorescente (la plupart des photosensibilisants utilisés en PDT), on peut envisager les méthodes de LIFS.(292-294). Ces techniques ont néanmoins des restrictions importantes:

- la fluorescence des PS peut être contaminée par la fluorescence des fluorophores endogènes,

- la valeur du signal peut dépendre d'une façon non-linéaire de la concentration du fluorophore,

- la concentration de la drogue ne peut être estimée qu'en surface de l'organe étudié.

Les mesures de changement relatif de concentration par comparaison d'intensité de fluorescence sont simples, mais les estimations de concentration ne le sont pas (295).

2.2.2. Spectroscopie de diffusion élastique (ESS)

La diffusion est définie comme le changement de direction de la propagation de la lumière dans un milieu avec une distribution non-homogène de coefficient de réfraction (milieu trouble). Dans le cas où la fréquence de la lumière diffusée ne change pas, ce phénomène s'appelle diffusion élastique (ES, *Elastic Scattering*). La spectroscopie de diffusion élastique (*Elastic Scattering Spectroscopy*, ESS) est un domaine de la spectroscopie qui étudie l'interaction lumière – tissu par l'analyse de la lumière diffusée. L'étude de la lumière rétro-diffusée (la part de lumière dont le sens de sa propagation a changé et est diffusée en sens inverse) s'appelle "spectroscopie de réflectance diffuse" (*Diffuse Reflectance Spectroscopy*).

La méthode de spectroscopie de diffusion élastique est basée sur l'enregistrement de la lumière diffusée. Cette méthode est basée sur l'analyse de spectres acquis par une fibre optique d'acquisition sur une zone très limitée. Chaque spectre correspond à l'exploration d'un volume tissulaire dont la dimension est déterminée par la dimension de la fibre ou la surface du spot du système optique. La forme du spectre dépend des paramètres de diffusion et d'absorption des tissus. Le spectre de la lumière diffusée contient l'information concernant la structure du tissu (propriétés de diffusion) et sa composition chimique (propriétés d'absorption). Donc la spectroscopie de diffusion élastique nous permet de détecter des changements de propriétés de diffusion et d'absorption de la lumière dans les tissus. Ces changements sont en relations avec la taille des noyaux et des cellules, la vascularisation et l'oxygénation, des altérations structurelles ou encore des différences de concentration de chromophores.

La technique de spectroscopie à ondes continues est la plus simple à réaliser. Un

système d'enregistrement de ESS est constitué en règle générale de trois parties: la source d'illumination, le système de distribution et d'acquisition de la lumière et un système d'acquisition et de traitement du signal.

Un appareil utilisable pour l'étude des propriétés des tissus biologiques et la mesure de concentration de PS par l'analyse des spectres de diffusion élastique et de fluorescence *in vivo* dans l'intervalle spectral du visible–infrarouge proche a été mis au point. C'est le Dr Vadzim N Chalau qui a réalisé cet appareil dans le cadre d'une thèse doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine. La validation des paramètres techniques de l'appareil a été menée sur des fantôme et *in vivo* sur un modèle animal (296).

2.2.3. Description de l'appareil de mesure

Le spectromètre destiné à l'enregistrement des spectres de fluorescence et de réflectance diffuse résolue dans l'espace *in vivo* est constitué de trois modules (Figure 2.2.) :

- un module physique et électronique de contrôle de la source de lumière;
- un module capteur multicanaux à base de fibres optiques;
- un module de spectrométrie piloté par un ordinateur et ses programmes informatiques associés.

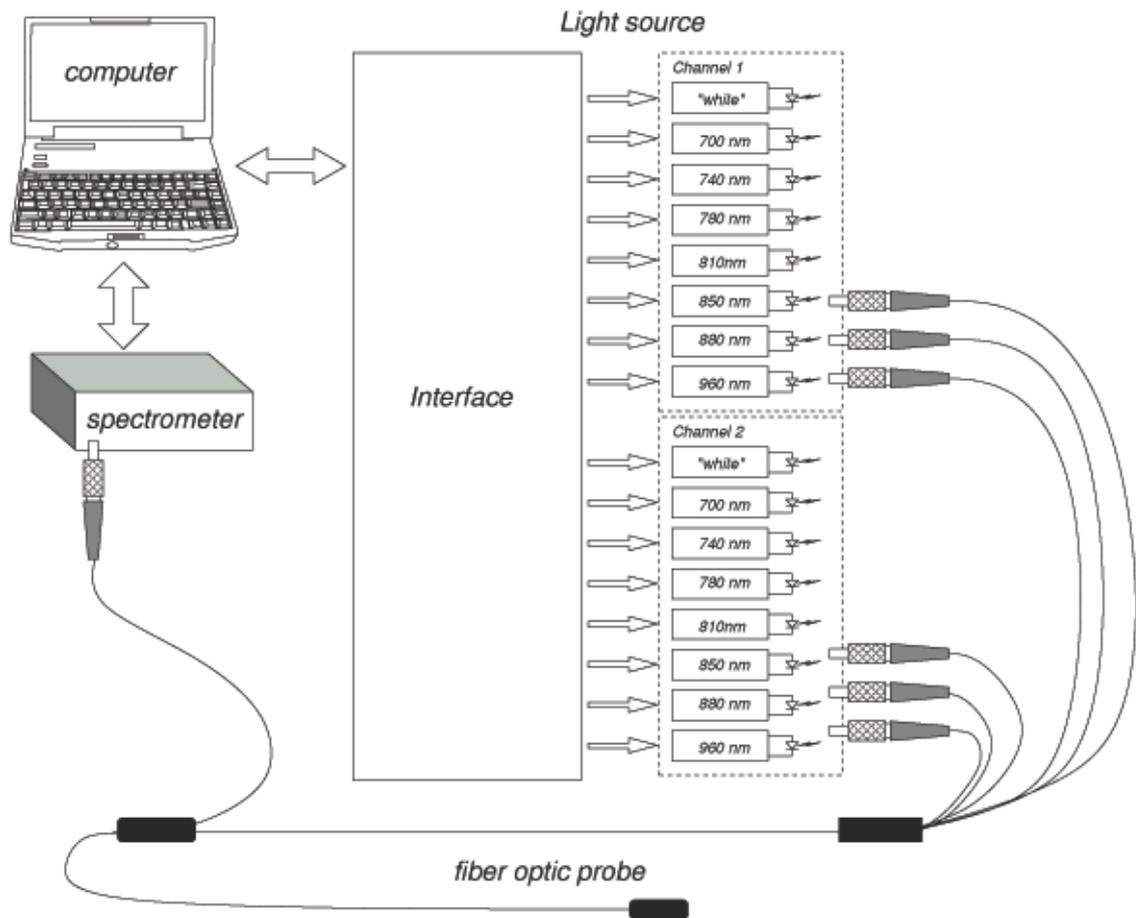


Figure 2.2. Schéma de l'appareil de mesure par analyse des spectres de diffusion élastique et de fluorescence

2.2.3.1. Module "Source de Lumière"

Ce module est constitué de plusieurs sources de lumière LED's émettant à des longueurs d'onde d'émission différentes, de différents régulateurs d'intensité et d'une interface électronique de communication entre le module physique et l'ordinateur.

La source d'illumination est composée de 2 canaux de 8 diodes émettrices de lumière (light emitting diode ou LED). Chaque LED est alimentée par sa propre source de courant stabilisée. La lumière visible est générée par une LED blanche (450 – 700 nm) (Radiospares, Beauvais, France). Dans le proche IR, la combinaison de LED (Roithner Lasertechnik, Vienne, Autriche) émettant à des longueurs d'onde de 700, 740, 780, 810, 850, 880 et 960 nm a permis de réaliser une source de lumière avec un spectre allant de 440 à 1000 nm. La

puissance en sortie de fibre est de 20 à 50 μW .

2.2.3.2. Sonde à fibres optiques

Une sonde multifibre en forme de Y a été développée. La sonde est constituée de 7 fibres optiques de 250 μm de diamètre externe, la distance maximale entre les fibres étant de 0,5 mm. 2 canaux de 3 fibres d'illumination séparés de la fibre d'acquisition respectivement de 1,74 mm et 0,53 mm ont été constitués (Figure 2.3.). Les extrémités proximales des fibres étaient connectées aux modules LED's.

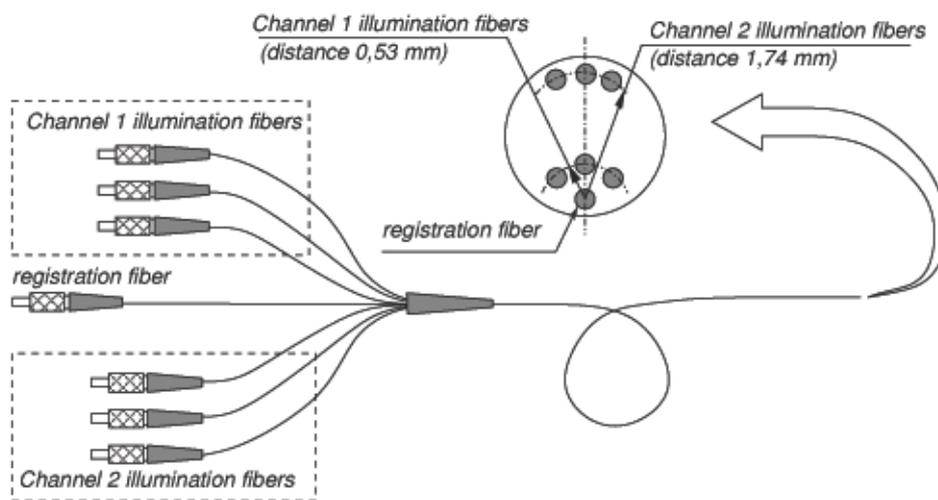


Figure 2.3. Schéma de la sonde à fibres optiques

2.2.3.3. Module de spectrométrie, ordinateur et programmes informatiques associés

Le spectromètre utilisé est un instrument standard du marché, conçu à base d'un capteur CCD et portant la référence Avantes USB2000 (Avantes, Soerense, Netherlands) dont l'intervalle spectral est de 300 à 1100 nm (selon les données du fabricant).

Un logiciel spécifique de commande de la commutation de la source de lumière, d'acquisition et de traitement du signal a été développé. Le programme informatique est écrit en Visual Basic et interfacé avec Excel (Microsoft Excel, USA). Cette méthode nous permet de réaliser le logiciel prototype et nous permet d'utiliser toutes les possibilités d'Excel pour traiter les données sans programmation supplémentaire.

Les résultats de l'étude pharmacocinétique de la *m*-THPBC au niveau hépatique et intratumoral (modèle xéno greffe HT29 chez le rat athymique) ont été soumis à publication ("Journal of Biomedical Optics"). Ces résultats sont présentés dans les pages suivantes sous la forme du manuscrit original.

Pharmacokinetics of bacteriochlorin photosensibilizer 5,10,15,20-tetrakis (*m*-hydroxyphenyl) bacteriochlorin (mTHPBC) in normal rat liver tissue and in an experimental HT 29 tumour rat liver: study with space resolved diffuse reflectance spectroscopy

F. Marchal, V. Chalau, S. Marchal, N. Tran, HP. Lassalle, A. Leroux, L. Bolotine, F. Guillemin

Frédéric Marchal, Vadim Chalau, Sophie Marchal, Henry Pierre Lassale, Lina Bolotine, François Guillemin

Centre Alexis-Vautrin, CRAN UMR 7039 CNRS-UHP-INPL, Vandoeuvre-les-Nancy, 54511 France

Frédéric Marchal, N'Guyen Tran

Laboratoire Chirurgie Expérimentale Nancy University, School of Medicine, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Vadim Chalau, National Medical Laser Centre, Academic Division of Surgical Specialities, Royal Free and University College Medical School, University College London, 67-73 Riding House Street, London, U.K.

Address reprint requests to: Frederic Marchal, MD, Department of Surgery, Centre Alexis Vautrin, Av. de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Tel: 00.33(0)3.83.59.84.51 ; fax: 00.33(0)3.83.59.85.47

E-mail: f.marchal@nancy.fnclcc.fr

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the pharmacokinetics of mTHPBC in normal rat liver tissue and in an experimental HT29 tumour rat liver after intra venous injection of mTHPBC, using tissue extraction techniques and non invasive Elastic-Scattering Spectroscopy (ESS). The analysis of resolution and sensitivity of the spectrometer was performed on the basis of measurements on liquid phantoms with optical properties simulating the optical properties of biological tissues. The maximum mTHPBC accumulation in the liver was at 4 hours after photosensitizer injection followed by a regular decrease with time. The correlation between ESS and tissue extraction techniques was very good ($R^2 = 0.993$). At 4 and 24 hours after photosensitizer injection, the concentration values measured in tumor were respectively 0.58 ± 0.59 and 0.31 ± 0.36 $\mu\text{g/g}$ tissue. At these time points, mTHPBC levels in healthy hepatic tissue were respectively 3.70 ± 2.27 and 1.82 ± 1.83 $\mu\text{g/g}$. In conclusion, ESS has the potential to provide quantitative, *in vivo*, site-specific measurements of mTHPBC concentration in liver and HT29 tumour. mTHPBC had a better selectivity for normal liver tissue than for HT29 liver tumour. We suggest that the mTHPBC-mediated PDT effect could be largely mediated via vascular damage in peripheral liver tissue surrounding the tumour and that the selectivity of the treatment could not be based on differential tumour drug uptake.

Keywords: mTHPBC, Elastic-Scattering Spectroscopy, Liver metastasis, Colorectal neoplasms, Rat nude, Photodynamic therapy.

INTRODUCTION

Colorectal cancers present the first cause of malignant-neoplasm-related deaths mortality in males and females in Western Europe and the United States. Namely, 36.000 new cases are detected annually in France and 130.200 in the United States.¹ Although curative excision of the primary tumour is possible in many colon cancer patients without detectable metastasis, about half of these patients die from hepatic metastasis within a few years. In selected patients (20 –25 %) with colorectal liver metastases, hepatic resection offers a 25 – 38 % 5-year survival rate.²

Photodynamic therapy (PDT) use of combination of a photosensitising drug and light to cause selective damage to the target tissue.³ This therapy results in a sequence of photochemical and photobiologic processes that cause irreversibles photodamage to tumor tissues.⁴ A photosensibiliser can target directly, inducing necrosis or apoptosis.⁵ Alternatively, by the targeting of tumour vasculature (or indeed of healthy surrounding vasculature), the tumour can be starved of oxygen-carrying blood. Thus, together with inflammatory and immune responses, damage to the tumour can be maximised by use of PDT.⁶ The effect of the PDT depends on a multitude of parameters including the tissue and tumour optical properties, the drug dose, light activation wavelenght, light intensity, light dose and time interval between drug and light administration. PDT has mainly been used to treat superficially located lesions such as skin, oesophagus, bladder, head and neck and lung tumours.³ Most photosensibilizers currently used in PDT are activated by light in the red region of the visible spectrum, which has a limited penetration in tissues.⁴ New photosensibilizers has been developed in oder to make interstitial treatment of solid tumours more feasible, especially in highly pigmented tissues, like the liver.⁷ The bacteriochlorin

photosensibilizer 5,10,15,20-tetrakis (*m*-hydroxyphenyl) bacteriochlorin (mTHPBC) has a very strong absorbance peak at 734 nm.⁸ Activation of mTHPBC at near-infrared wavelength significantly increases light penetration and thus treatment volumes in most tissues.⁷ If properties of this new photosensibilizer was studied in normal liver tissue,^{7,9} there is no study in literature about properties of mTHPBC in tumour liver.

The problem of determining in vivo tissue concentrations of photosensibiliser is especially important for PDT treatment. There are very few minimally invasive or non-invasive methods for determining drug concentrations in tissue.¹⁰ Fluorescence measurement of tissue concentration of photosensibiliser can provide informations, however some of the PDT drugs are nor fluorescent, and therefore can not be measured by fluorescence techniques. Futhermore, the light intensity to be measured is larger, and photobleaching is not an issue.¹⁰ For modest intensities, the predominant responses of tissue to light are scattering and absorption. Elastic-scattering spectroscopy refers to broadband white-light measurements, wherein seperate illuminating and collecting fibres are placing in direct optical contact with the tissue. This method was applied to the measurement of PDT drugs concentrations in tissue.¹¹ In this study, we used a simple and accurate steady-state spectroscopic method of measuring mTHPBC concentration.

The purpose of this study was to determine the pharmakokinetics of mTHPBC in normal rat liver tissue and in an experimental HT 29 tumour rat liver after intra venous injection of mTHPBC, using tissue extraction techniques and non invasive Elastic-Scattering Spectroscopy (ESS).

MATERIALS AND METHODS

Animals and tumour model

A total of 26 male athymic Rowett nude rats (Hsd: RH-mu) (Harlan United Kingdom Limited, Shaw's Farm, Oxon, UK), weighing 300 ± 30 g, were used in these experiments. The animals were kept in special pathogen-free conditions in a laminar flow cabinet with constant temperature (24–26 °C), humidity (40–50%) and 12 h light/dark cycle. The animals had free access to food and water. The experiments were approved by the Animal Welfare Committee of the Faculty of Medicine in Nancy (54500 Vandoeuvre-lès-Nancy), and the animals received care in accordance with established guidelines of FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

Colorectal tumor-derived human cell line HT29 was obtained from ATCC cell collection and regularly controlled for mycoplasma contamination. Cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10 % heat-inactivated Foetal Calf Serum (FCS, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), 1% penicillin (10 000 IU), streptomycin (10 000 µg/ml) and 1 % 200 mM glutamin (Life Technologies). Cells were kept at 37°C in a 5 % CO₂ humidified atmosphere, trypsinized and re-seeded into fresh medium every 7 days. One week before treatment, 2×10^4 cells/ml were seeded in 175 cm² flasks. Just before tumor cell implantation, cells were trypsinized, counted and resuspended in 0.5 ml 5 % glucose solution to obtain 1 to 3×10^8 cells/ml.

The rats were irradiated the day before the liver graft with a dose of 3,5 Gy, using a particle accelerator (Gamma1.25 MeV photons), Theratron 780C[®]

(Theratronics, MDS Nordion, Ottawa, Canada) . At laparotomy, A single cell suspension of 0.5 ml containing 2×10^7 tumour cells was injected subcapsularly in the liver through a needle 29 G (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium) in order to obtain a unique tumor. When the rats awoke, each was isolated in a cage with food and water. The rats were treated prophylactically with amoxicillin-clavulanate (Augmentin[®], GlaxoSmithKline, Marly-le-Roi, France) at 0.35 mg/ml drinking water for 2 weeks. Two months after tumour cells injection, tumours had reached a diameter of approximately 10 - 12 mm. All surgical procedures were performed under general anesthetics. Photosensibilizer was injected via a vein of the tail.

Drug

5,10,15,20-Tetrakis-(*m*-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (mTHPBC) (Biolitec Pharma Ltd, Edimburg, UK) was dissolved in 60 % 1,2-propanediol and 40 % ethanol (96%) (vol. / vol.) and administered at a dose of 0.5 mg kg⁻¹ body weight.

Non invasive Elastic-Scattering Spectroscopy measurements

An optic-fibers based system was developed and applied to the registration of spatially resolved diffuse reflectance spectra. The device consists of the three principal parts: light source, optic-fibers probe, data acquisition and processing system.

Light source: The source of illumination includes two identical sets (channels) of 8 LEDs modules, each with individual current stabilisers, and shared electronic computer interface 5 (Figure 1). Visible light (450–700 nm) is generated by a "white" LED (Radiospares, Beauvais, France). In the near InfraRed (NIR) band, we combined a set of LEDs peaking up at wavelengths 700, 740, 780, 810, 850, 880 and

960 nm with spectral half-bandwidth of 40–60 nm (Roithner Lasertechnik, Vienna, Austria). This technical concept permits to obtain a light source with spectral range 440–1000 nm and with a shape easily adaptable to specific measurement conditions. The maximal registered wavelength is 960 nm, since the silicon-CCD based spectrometer has a limited sensitivity in the near IR spectral range. A specific optical coupling was built-up to allow injection of LEDs light into the fiber through standard barrel connector SMA 905. The power of optical irradiation at the output of the fiber probe is about 20–50 μW .

Optic Fibers probe: A multi-fibers Y-shaped probe was specifically developed (Figure 2). The probe is made of 7 optical fibers with approximate core diameters of 200 μm , cladding diameters about 250 μm and numerical apertures of 0.22. Using optical fibers with cladding diameter of 250 μm , the maximal possible distance between fibers centers is 1.75 mm. Moreover, the exterior cladding diameter also limits the minimal possible distance between the centers of the fibers, in our case to a value of 250 μm if they were in close contact. But this is difficult to achieve with acceptable precision and stability of the fibers positioning and we finally choose a minimal distance of 0.5 mm as more appropriate to our technological development capabilities. The registration fiber collects the diffused light and is connected to the spectrograph. The 6 other illumination fibers are split into two groups of 3 fibers and placed at concentric distances of $0.53 \pm 0,04$ mm (group 1) and $1.74 \pm 0,03$ mm (group 2) respectively from the registration fiber. Real distances were measured by macrophotography. Because of the limited spectral bandwidth of LEDs (except of "white" LED), we used each group of 3 fibers to combine the intensity spectra of 3 LEDs and therefore to obtain a broadened spectrum light source (100–180 nm

instead of 40–60 nm for a single LED). On assumption that studied medium is semi-infinite optically homogeneous and isotropic medium, it is irrelevant that the fibers in one group are not located in the same point if the distances between the irradiation and acquisition fibers are equivalent. Therefore proposed solution is equal to the point light source and its spectrum is equal to the sum of the spectra of three equidistant sources.

Figure 1. Schematic diagram of the experimental system used for non invasive Elastic-Scattering Spectroscopy measurements

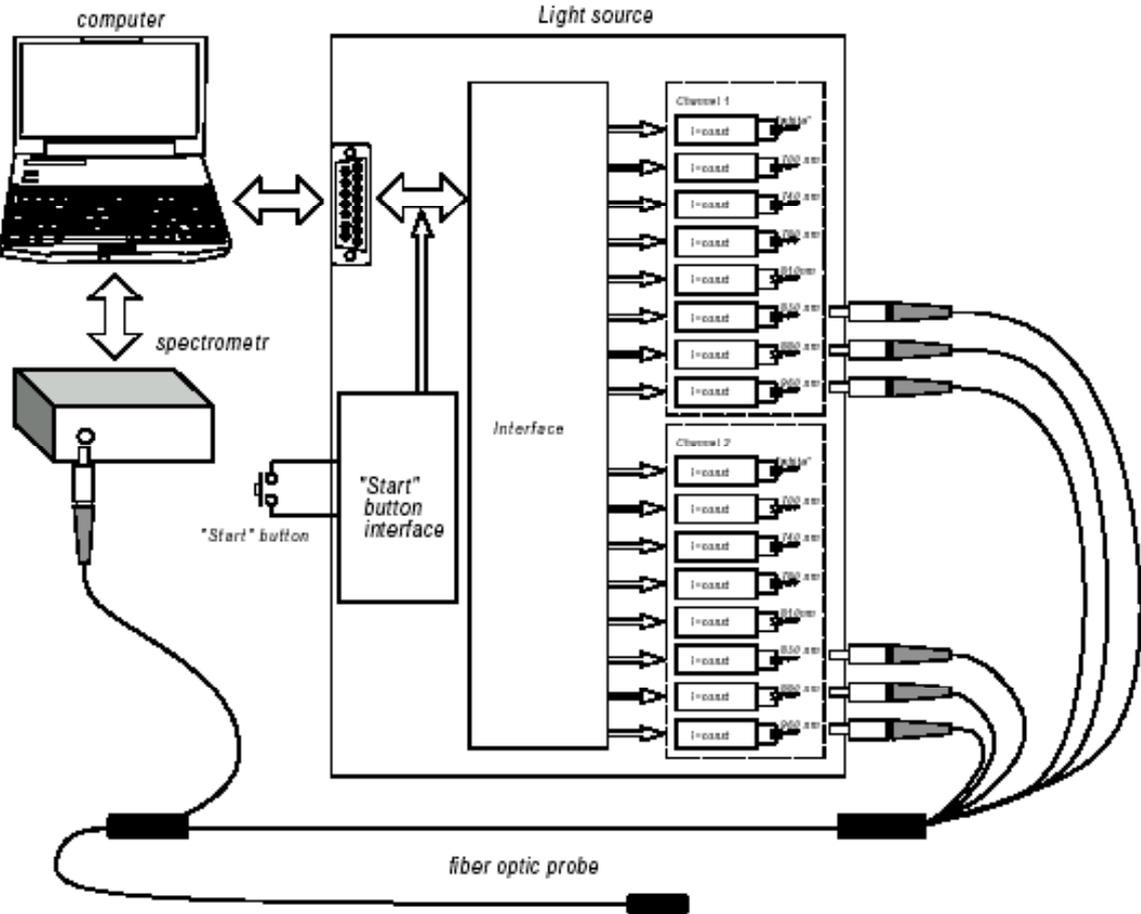
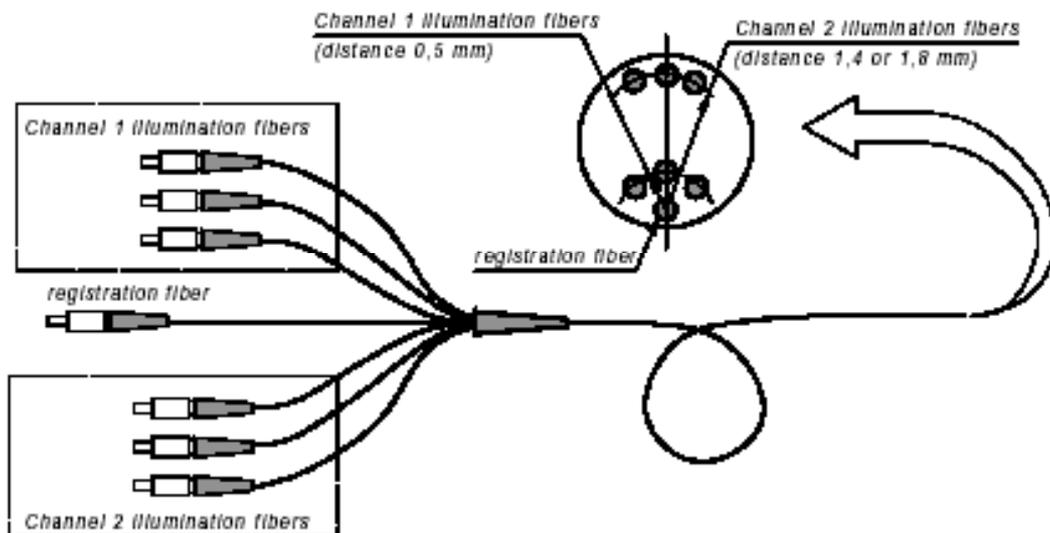


Figure 2. Schematic diagram of the multi-fibers Y-shaped probe used for non invasive Elastic-Scattering Spectroscopy measurements

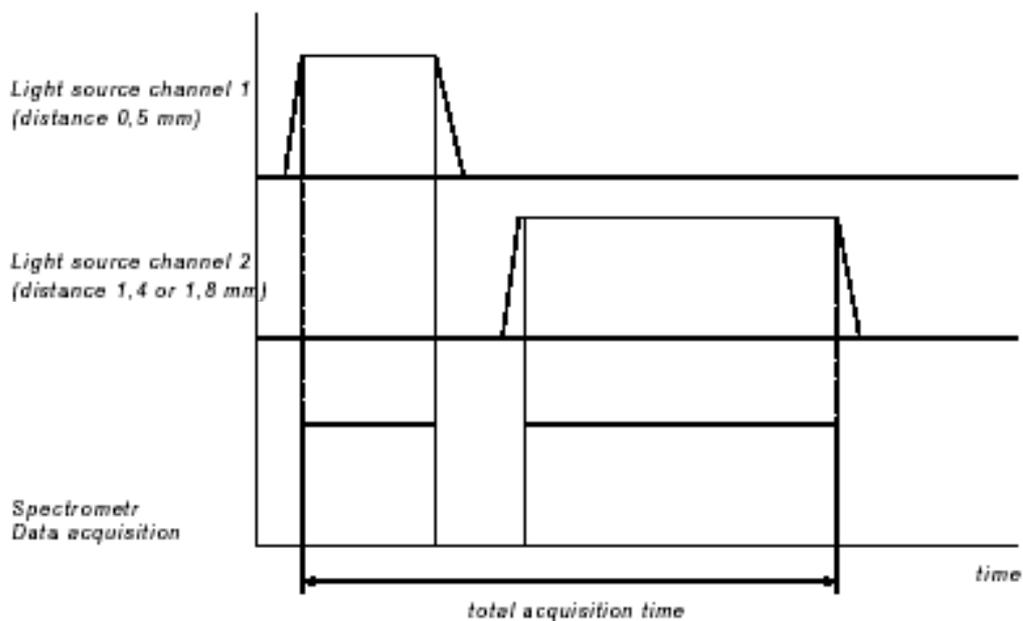


Spectrometer and system control: Compact CCD based spectrograph Avantes USB 2000 with spectral range 380-1000 nm (Avantes, Soerense, Netherlands) was used for registration of the animal tissues and phantoms diffuse reflectance spectra in the spectral range of 500–968 nm. A specific program was developed on a PC computer to synchronise the measurements with the spectrometer and light sources controls, as well as to perform preliminary correction and processing of spectra.

Measurements principle: To measure the diffuse reflectance spectra, illumination light channels 1 and 2 connected to the 3-fibers groups 1 and 2 respectively, are alternatively switched on and off. Channel 1 alone (shortest distance) is switched on first and the corresponding spectrum is registered, then

channel 2 alone (longest distance) is switched on and the second spectrum is acquired. Thus, the total acquisition time at the two distances is equal to the sum of registration time required for each spectrum. The signal intensity obtained at 0.53 mm distance is higher than the one at 1.74 mm so that registration time of Channel 1 can be shortened, thus decreasing the total measuring time. The spectrograph sensitivity and the power of light source allowed us to keep a total acquisition time value less than 2 s. The time diagrams of acquisition are displayed in the Figure 3.

Figure 3. Time diagram explained the data acquisition by the experimental system



Phantom model: The analysis of resolution and sensitivity of the device was performed on the basis of measurements on liquid phantoms with optical properties simulating the optical properties of biological tissues. We used Intralipid-20% (Fresenius Kabi AG, Bad-Homburg, Germany), analogue to Intralipid-10%, which is a

medium for intravenous nutrition, moreover widely used as a diffusing medium for optical phantoms.^{12,13} Optical parameters μ_s (scattering coefficient), g (anisotropy factor) and μ'_s (reduced scattering coefficient) for Intralipid-20% were calculated from equations stated in for Intralipid-10% assuming,¹³ that concentration of scattering particles in it is more twice. Absorption coefficient of Intralipid was estimated to be negligible (0.027 cm⁻¹ at 633 nm).¹² As light absorber we used Indian ink (Lefranc & Bourgeois, Le Mans, France). Indian ink was diluted in water (1:100 vol/vol) and the absorption coefficient μ_a of obtained basic solution, further used to phantom preparation, in the visible and near IR range was measured with a Lambda Bio spectrometer (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) while its scattering properties were assumed to be negligible. Desired phantom absorption coefficient was obtained then by the dilution of this basic solution. In the visible and near infrared regions, biological tissues like muscle or tumours exhibit three regions with highly different optical properties, defined mostly by haemoglobin absorption. The spectral regions 400–470 nm and 500–650 nm are characterized by strong absorption of Soret's band and of Q-bands of haemoglobin respectively, while 650–960 nm has relatively weak absorption compared to the diffusion of the tissues ("therapeutic window"). Consequently, we focused this experimental work in the spectral regions 500–650 nm and 650–960 nm because the signal from rat tissues at shorter wavelengths was too weak so it was impossible to acquire a spectrum during an acceptable acquisition time. For further analysis, we then selected two wavelengths of interest at 562 nm in the visible and at 830 nm in the near IR. Wavelength 562 nm was chosen because it corresponds to the maximum peak of absorption of biological tissues in the visible spectral range. Wavelength 830 nm was chosen as a midpoint in the minimal absorption spectral band of tissues, between the haemoglobin weak absorption peak

at 760 nm and the water absorption peak at 976 nm.

Animal models

Reflectance spectra (R) were registered when tumours were 1–2 cm in diameter, i.e. on 2 months after inoculation of tumour cells. Rats were injected with 0.5 mg/kg m-THPBC, and the measurements of m-THPBC diffuse reflectance intensities (D) were realized in a direct contact with healthy liver tissue at the selected time intervals after drug administration. The D coefficient is defined with values of diffuse reflectance R at a given wavelength λ .

$$D(\lambda) = \log \frac{R_{liver}(\lambda)}{R_{(liver+mTHPBC)}(\lambda)} \quad (0.1)$$

Immediately after *in vivo* measurements, the animals were sacrificed for determination of m-THPBC concentration by chemical extraction.

Extraction assays

The solubilization technique for photosensitizer quantification in *ex vivo* tissue samples published by Lilge and coworkers¹⁴ was used with slight modifications to quantify m-THPBC amount in liver and tumor by subsequent fluorometry. Briefly, each frozen tissue sample of approximately 0.4 g wet weight was chopped into small pieces, immersed in 2 ml of Solvable™ (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) in a 15 ml plastic tissue culture tube and placed, in dark, into a shaking water bath at 50°C for 1 h. One ml of the resulting homogenate was then retired and placed in a tube at 4°C was added in the tube. The tubes containing the remaining tissue were returned to bath for a further 1 h after the addition of one ml of Solvable™. After 2 h incubation, all the tissue was solubilized. To avoid strong absorption (optical densities

must be inferior to 0.1), 0.2 ml homogenate sample was diluted with 0.8 ml water. The resulting solution was then analyzed by fluorometry with an excitation wavelength 514 nm and an emission wavelength ranged from 600 to 800 nm.

Control samples were liver and tumor samples without mTHPBC. The control homogenate was used to monitor the blank value and then to establish a calibration curve by adding known amount of mTHPBC from 0.01 to 0.5 $\mu\text{g/ml}$. An additional internal calibration was performed by adding a known quantity of mTHPBC into a control sample before the incubation period in order to verify that no mTHPBC was lost during this step.

Statistical analysis

A two-population independent t-test was performed to characterise the differences in intensity spectra between healthy and tumor tissues for rats. Differences were considered as statistically significant for $p < 0.05$. The data were analyzed and compared using Staviiew 5.0[®] (Abacus Concepts, Berkeley, California, USA).

RESULTS

Liver spectral properties at the wavelength of 740 nm: The theory of the measurements of m-THPBC concentration required the knowledge of two optical parameters, absorption coefficient μ_a and reduced scattering coefficient μ'_s . These coefficients were obtained by comparison of the spatial distribution of scattered light in the turbid medium in the phantoms (Table 1) and in the liver tissue (Table 2) with the known parameters. The spectrums of the liver and the values R of the phantom are displayed in the Figure 4. The measured coefficients at 740 nm in the rat liver were 0.19 ± 0.01 and 7.5 ± 0.3 for μ_a and μ'_s respectively (Table 1). The resolution of our device, or its ability to distinguish the difference in changes μ_a and μ_s is limited by the noise and instability of spectrometer and light source. In the phantom study five successively measured spectra in the same solution demonstrated an error between 0.3–0.75% for both distances for acquisition time less than 1 second and signal drift of the order of 1% for a time interval of several minutes between 2 consecutive measurements. Reliable difference in the spectrum magnitude, which can be distinguished by our device with Intralipid phantoms, is 1.75 % if time of acquisition is not more than 1 second and with a treatment of the signal to improve the ratio signal/noise. This limit is defined by imperfection of the system "light source – spectrometer": non-stability of the parameters, noise, non-linear progression of the spectrum. The sensitivity of the system is: $D_{min} = \log(4096/(4096-4096 \times 0.0175)) = 0.0076 \approx 0.01$, with concentration of mTHPBC $c_{min} \approx 0.1 \mu\text{g/g}$. We could consider this value as the minimal level of detection.

Table 1. Absorption (μ_a) and reduced scattering (μ'_s) coefficients obtained for rat liver tissue like phantoms at wavelength 740 nm.

Intralipid (%)	MR5 (%)	μ_a (cm ⁻¹)	μ'_s ^a (cm ⁻¹)	g ^a	μ'_s ^a (cm ⁻¹)
0.69 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.19 ± 0.01	22.8 ± 0.9	0.67	7.5 ± 0.3

Values are given ± standard deviation.

^a Values were calculated with published formulas^{12,13}

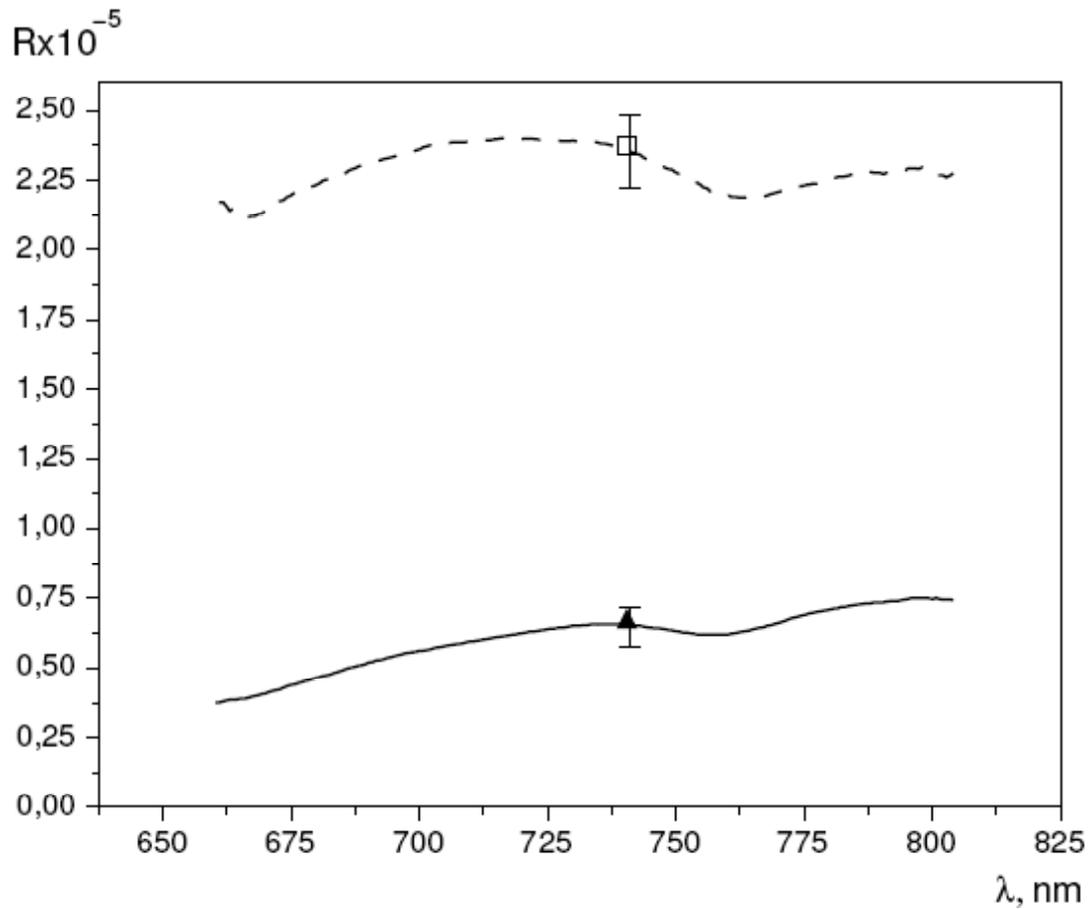
Table 2. Diffuse reflectance spectra values R (± Standard Deviation) of rat liver and phantom (Intralipid - Indian Ink) at wavelength 740nm measured at two distance between the fibers, 0.53 and 1.74 mm

Distance (mm)	R _{liver}	R _{phantom}	Difference ^a (%)
0.53	2.35 (± 0.13) x 10 ⁻⁵	2.273 (± 0.004) x 10 ⁻⁵	3.4
1.74	0.62 (± 0.03) x 10 ⁻⁵	0.619 (± 0.002) x 10 ⁻⁵	0.6

^a difference = (R_{liver} - R_{phantom}) / R_{phantom} x 100 %

$${}^a \text{ difference} = \frac{(R_{\text{liver}} - R_{\text{phantom}})}{R_{\text{phantom}}} \times 100\%$$

Figure 4. Spectrums of the Steady-State Space Resolved Diffuse Reflectance Spectroscopy and values of R (\pm standard deviation) for liver and phantom at wavelength 740 nm. The measures were performed at the distance between the fibers of 0.53 and 1.74 mm.



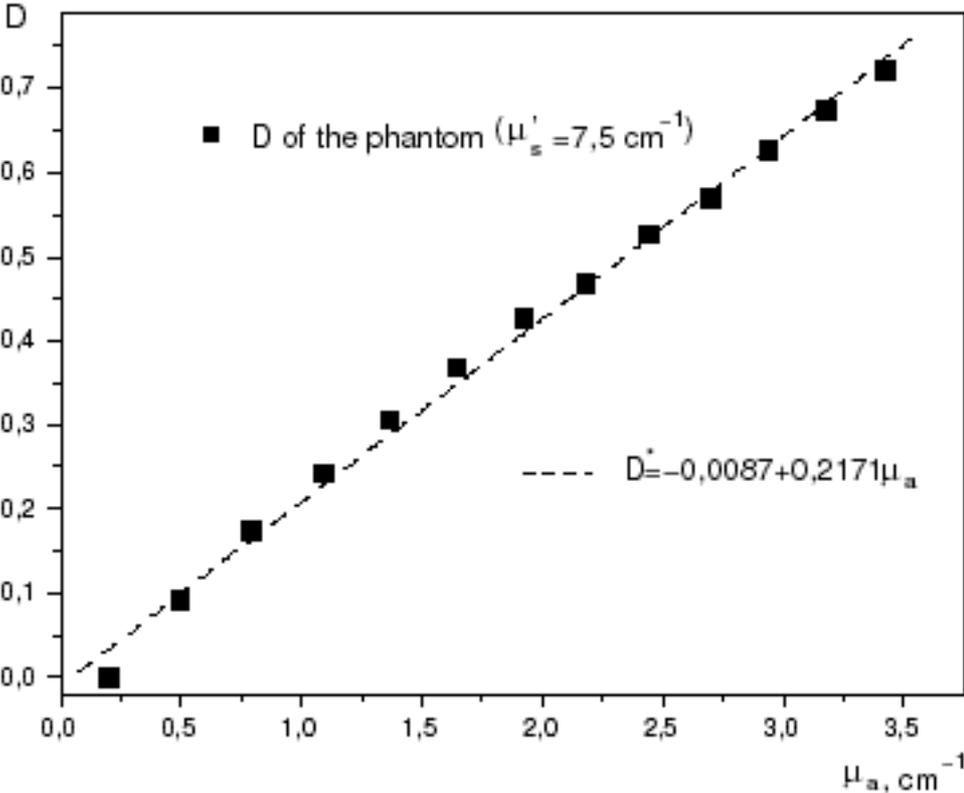
Distance 0.53 mm: - - - Liver in vivo, □ phantom

Distance 1.74 mm: — liver in vivo, Δ phantom

Linearity between parameter D and μ_a in turbid medium and in liver and

evaluation of the average photon pathway: The direct in vivo measurements of D and μ_a in the liver meets many difficulties, therefore we simulated behavior of these two parameters with the Intralipid phantoms, keeping the μ'_s as a constant value (7.5 cm^{-1}) and varying μ_a . The variations in D with respect to μ_a are displayed in the Figure 5 and demonstrate the good linearity within the μ_a interval from 0.5 till 3.5 cm^{-1} .

Figure 5. Variations in D with respect to μ_a with μ'_s constant and equivalent 7.5 cm^{-1} of turbid medium



D* Approximation by linear function ($R^2 = 0.996$)

Thus, the average pathway of the photon in the investigated turbid medium is constant and could be estimated by using the modified law of Lambert-Bear as $L \approx 2.3026 \times \Delta D / \Delta \mu_a$. The computed value of L in the liver was 50 mm.

The absolute error from measurements of diffuse reflectance R is 1.75 % with optimal conditions (acquisition time inferior to 1 s, level of the signal close to the saturation level of the spectrometer).

$$\Delta R = 0.0175 \cdot R_0 \quad (0.2)$$

Where R_0 is the value R being in optimal conditions.

The relative error of D:

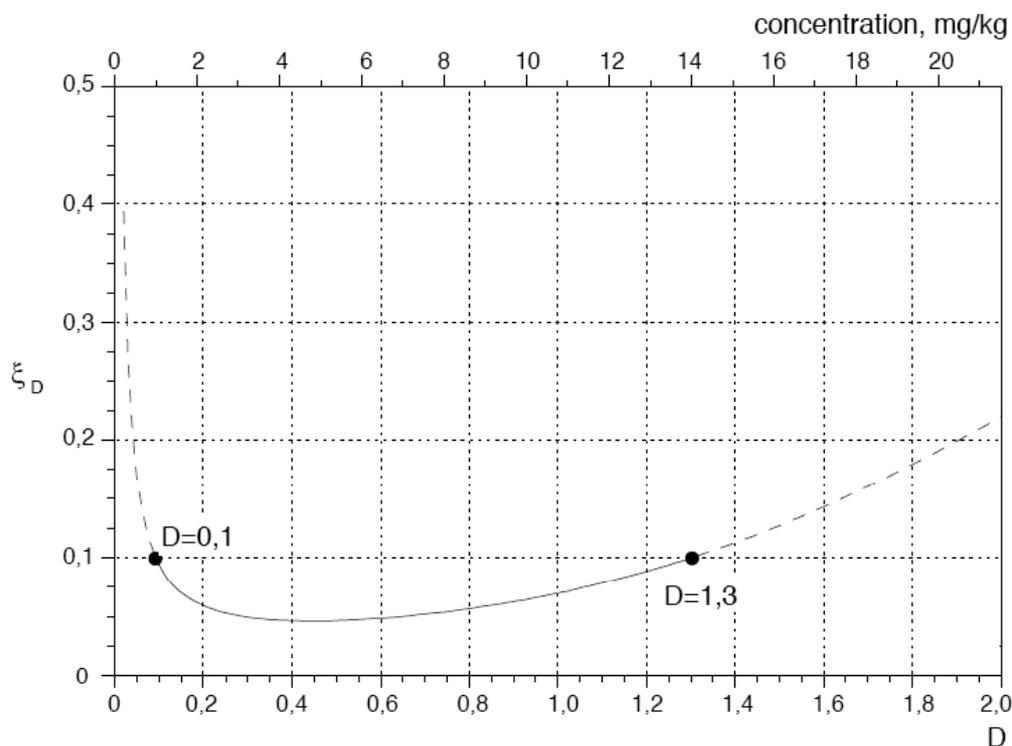
$$\xi_D = \Delta D / D = \frac{\log(1 + 0.0175 \cdot 10^D)}{D} \quad (0.3)$$

The relative accuracy ξ_D according to the values D is displayed in Figure 6. ξ_D allows to estimate the interval of values D where spectroscopic accuracy of measurements is acceptable. *In vivo*, the error is more important owing of the influence of the geometric conditions of measurements: cleanliness of the sensor, quality of the surface area of the organ and quality of the contact between the sensor and the organ. *In vivo*, we accepted as accuracy a relative error of D at wavelength of 740 nm inferior to 10 %. The accuracy of measurements of D is the best in the interval $D = 0.1 - 1.3$. In concentration of mTHPBC in the liver (c_{dr}) defined by Steady-State Space Resolved Diffuse Reflectance Spectroscopy, it corresponds to $1.1 - 14 \mu\text{g/g}$.

$$c_{dr} \cong 10.76 \cdot D \quad (0.4)$$

The best accuracy of measurement (error $\leq 5\%$) is in the interval $D = 0.3 - 0.6$ or for concentration between $3.3 - 6.6 \mu\text{g/g}$ (Figure 6).

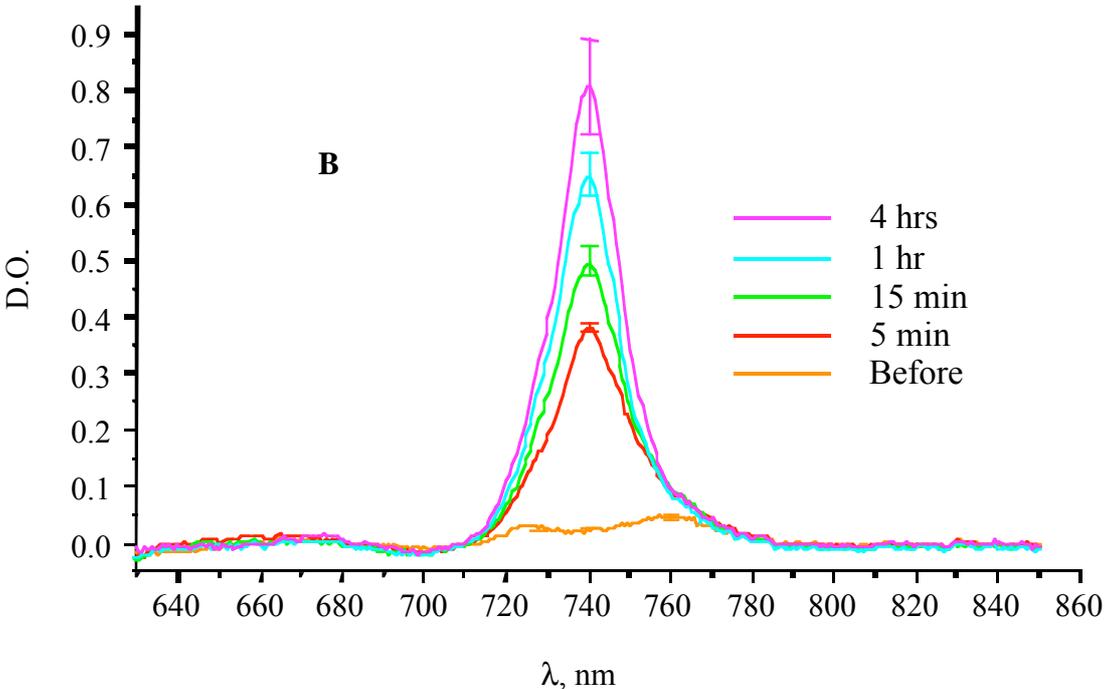
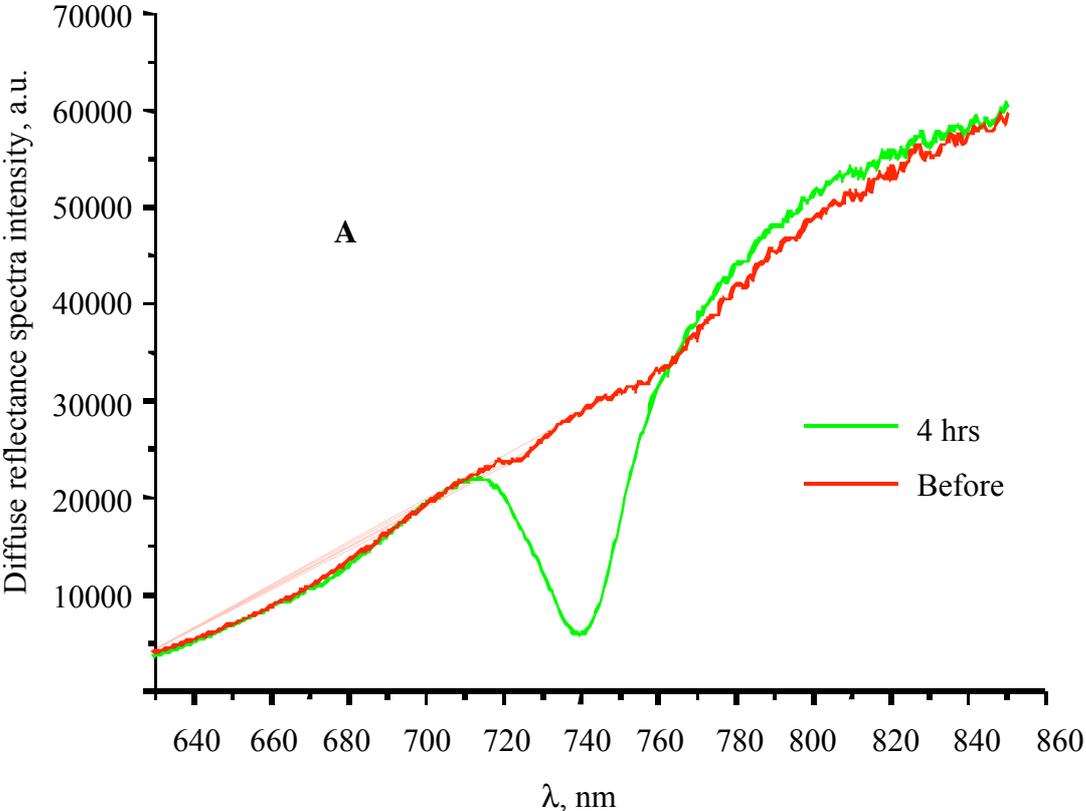
Figure 6. Relative accuracy ξ of measurements of D (low abscissa scale) or of the concentration of mTHPBC in the liver (high abscissa scale).



— interval of better accuracy of measurements (relative accuracy $\xi \leq 10\%$)

Changes of ESS spectrum after mTHPBC injection: Diffuse reflectance spectra, obtained from liver before and 4 hours after mTHPBC injection, are plotted in the Figure 7A. As compared with spectra obtained from liver without mTHPBC, mTHPBC absorption was observed between 700 and 760 nm with a maximum value (R) at 740 nm. From these data, D values were calculated by using the formula (1.1). mTHPBC absorption spectra D, reconstructed from reflectance spectra obtained from 5 min to 4 hours after mTHPBC injection, were displayed in the Figure 7B. D values increased with time suggesting an accumulation of mTHPBC in liver.

Figure 7. A: Diffuse reflectance spectra obtained *in vivo* in rat liver before and 4 hours after intravenous injection of 0.5 mg/kg mTHPBC. Distance between fibers : 1.74 mm. **B:** mTHPBC absorption spectra restored from diffuse reflectance data obtained *in vivo* in rat liver at different time after mTHPBC injection.



Comparison of mTHPBC pharmacokinetic data obtained by *in vivo* ESS and

spectrofluorimetry performed on tissue extracts: From 2 to 24 hours after

mTHPBC injection, ESS measurements (D) on liver were followed by chemical tissue extraction to evaluate, by spectrofluorimetry, mTHPBC concentration (C). The

pharmacokinetic curves plotted from the data obtained by the two techniques are

displayed in the Figure 8A and 8B. A similar kinetic profile was observed with a

maximum mTHPBC accumulation in the liver at 4 hours after photosensitizer injection

followed by a regular decrease with time. At 24 hours, the hepatic mTHPBC

concentration measured by spectrofluorimetry was 0.53 ± 0.49 $\mu\text{g/g}$ tissue,

corresponding at a value of 0.04 ± 0.04 for the ESS measurement. Mean values of C

and D as well as the ratio C/D are listed in table 3. With time, the ratio C/D is

constant (mean = 14.0 ± 0.7) and confirms the perfect correlation ($R^2 = 0.993$)

between the two techniques. Moreover, the concentration values of mTHPBC

calculated by using the formula described in material and method from ESS data (C_d)

are very close of those determined by spectrofluorimetry (Table 3)

Figure 8. mTHPBC pharmacokinetic values measured *in vivo* in rat liver by ESS (A) and in hepatic tissue extract by spectrofluorimetry (B). Each point represents the mean of measurement performed in at least three rats.

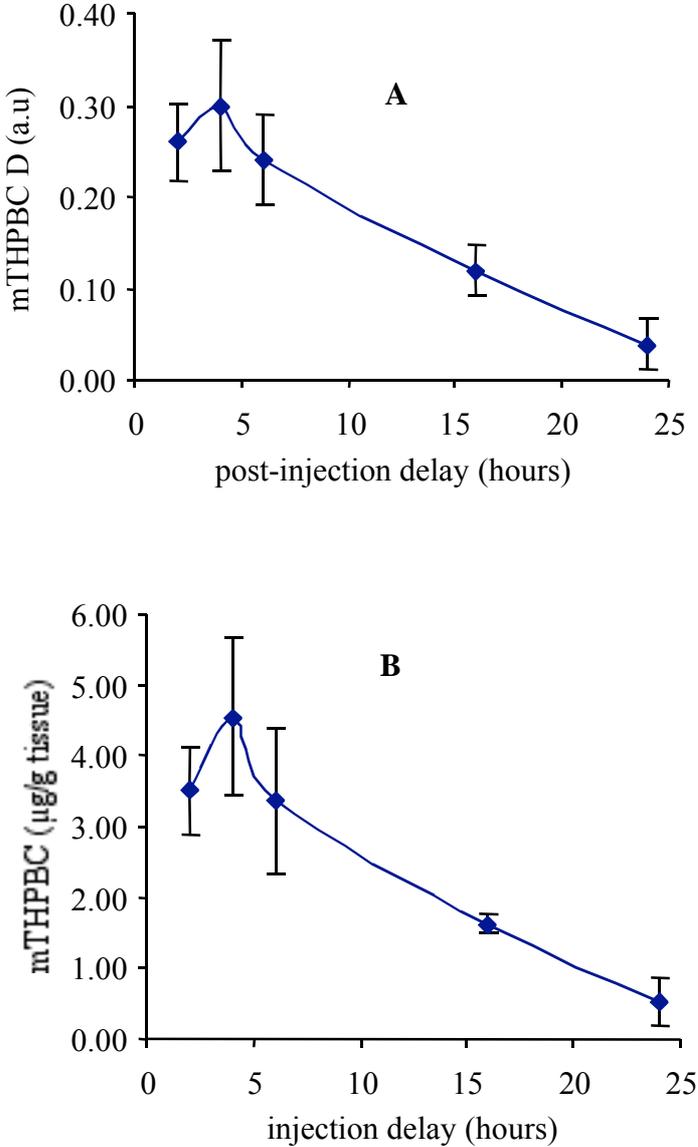


Table 3. Correlation between mTHPBC diffuse reflectance intensities (D) and concentrations (C_d) calculated from ESS data and concentration values measured by spectrofluorimetry after chemical tissue extraction(C)

Post-injection delay (hrs)	ESS		Spectrofluorimetry	Ratio
	D	C_d , $\mu\text{g/g}$ tissue	C, $\mu\text{g/g}$ tissue	C/D
2	0.26 ± 0.06	2.92 ± 0.64	3.52 ± 0.87	13.5
4	0.30 ± 0.11	3.24 ± 1.19	4.54 ± 1.56	15.1
6	0.24 ± 0.06	2.70 ± 0.65	3.37 ± 1.46	14.0
16	0.12 ± 0.05	1.30 ± 0.54	1.63 ± 0.21	13.6
24	0.04 ± 0.04	0.43 ± 0.43	0.53 ± 0.49	13.6
			Mean \pm S.D.	14.0 ± 0.7

Determination of mTHPBC accumulation in tumor and healthy liver: ESS

measurements were performed at 4 and 24 hours after mTHPBC injection in hepatic tumor obtained from colon adenocarcinoma cells and healthy hepatic tissue. The data, given in table 4, suggest that a low level of mTHPBC was accumulated in tumor at 4 hours ($D= 0.07 \pm 0.06$) and was not significantly modified 20 hours later ($D = 0.04 \pm 0.02$). Over this time period mTHPBC level decreased in the healthy tissue from 0.41 ± 0.11 to 0.18 ± 0.07 but remained higher than in tumor. These results were confirmed by the determination of mTHPBC concentration in tumor by

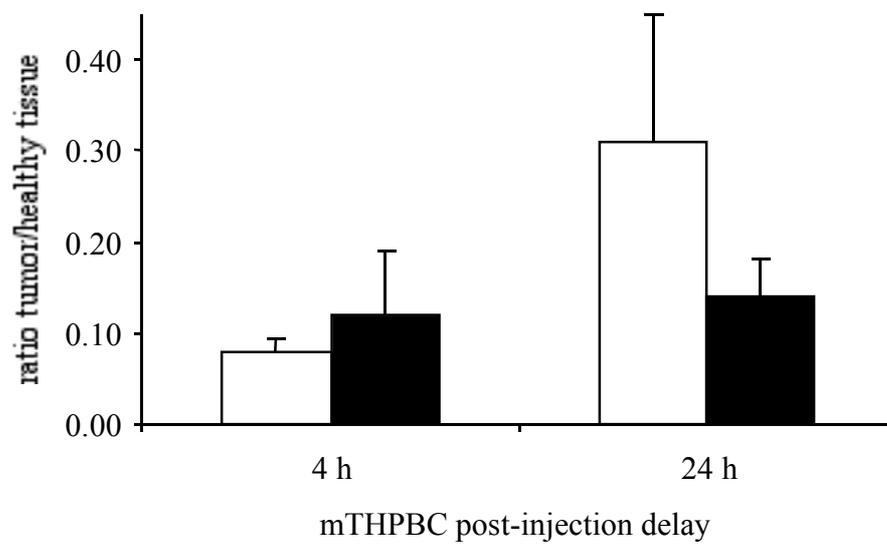
spectrofluorimetry after chemical tissue extraction. At 4 and 24 hours after photosensitizer injection, the concentration values measured in tumor were respectively 0.58 ± 0.59 and 0.31 ± 0.36 $\mu\text{g/g}$ tissue (table 4). At these time points, mTHPBC levels in healthy hepatic tissue were respectively 3.70 ± 2.27 and 1.82 ± 1.83 $\mu\text{g/g}$.

Table 4. mTHPBC diffuse reflectance intensities measured by ESS (D) and concentration values measured by spectrofluorimetry (C) in tumor tissue and healthy hepatic tissue, at 4 and 24 hours after mTHPBC injection

Post-injection delay (hrs)	D		C	
	$\mu\text{g/g}$ tissue			
	tumor	liver	tumor	liver
4	0.03 ± 0.02	0.41 ± 0.11	0.58 ± 0.59	3.70 ± 2.27
24	0.04 ± 0.02	0.18 ± 0.07	0.31 ± 0.36	1.82 ± 1.83

The decrease of mTHPBC in the liver produced an enhancement in the ratio of mTHPBC content between tumor and healthy hepatic tissue which remains largely inferior to 1 (figure 9).

Figure 9. Ratio between the quantities of mTHPBC measured in tumor and in healthy hepatic tissue by ESS (white) and by spectrofluorimetry (black) at 4 hours and 24 hours after mTHPBC injection. Each point represents the mean of measurement performed in three rats.



DISCUSSION

Measurements of the photosensibilizer concentration in tumour and in normal tissue before photodynamic therapy (PDT) is critical for improving the therapeutic index. The intensity of the light applied to the tumor must be adjusted according to the photosensibilizer concentration of tissue in order to avoid overtreatment or undertreatment.¹¹ The ability to track the location and time-history of compound concentrations in tissue non-invasively would be advantageous for the development of new photosensibilizer.¹⁰ There has been very little published on optical measurement of tissue concentrations of photosensitizer. Our aim in this study was to develop a new device to perform measures of photosensibilizer concentration in vivo. The use of a small probe is advantageous for making localized measurements and measurements can be made rapidly. We had good correlation between the measure of concentration of mTHPBC with our new device in the liver and in tumour and the results with extraction method ("the gold standard"). Our results were similar with results of literature.^{15,16} Our device needs more development to be used in endoscopic application. For compatibility with most of the standard endoscopes, the maximal diameter of our probe should be less than 2 mm. Actually, measurement of local photosensitizer concentration just before PDT with concomitant adjustment of the light dose would improve the treatment for each patient.^{11,17-19}

There are two limits to our device. The live experimental models (animals) are non-static objects with permanent movements due to the physiological activity such as respiration, peristaltic or occasional non-controlled movements. These perturbations can lead to change in the probe positioning and in the measuring conditions during the acquisition and consequently produce artefacts in the acquired data. To reduce the influence of these motion artefacts, the acquisition time has to be

as short as possible.²⁰ However, the duration of the registration is also restricted by the sensibility of the device and by the light source power. Therefore, the maximum acceptable acquisition time that allows keeping the motion artefacts at a reasonably low value is not more than a few seconds. One more factor limiting the possibility of *in vivo* detection of spectral differences between biological tissues is their structural non-homogeneity existing in any organ. The standard deviations of our spectral data, which is at least 10 times higher than the standard deviations of the intensity spectra in the case of standard measurement, can possibly be explained by this phenomenon. Signal instability (both in spectra shape and intensity level) observed in the phantom study, with intervals of several minutes between measurements, can be explained not only by instability of light source or spectrograph, but also by imperfect properties of the mixture of Intralipid and Indian ink based phantoms. These modifications are probably due to adhesion and aggregation of Intralipid and Indian ink on the distal probe tip, because often simple cleaning of probe tip and steering of phantom container lead to signal normalisation. Therefore, reliable difference in the spectrum magnitude, which can be distinguished by our device with Intralipid phantoms, is 1.75 %. The resolution was defined as the change of optical coefficients leading to a change in diffuse reflectance spectra intensity at 1.75%. Although the specific optical modules we developed showed moderate efficacy of light injection into the optical fiber, the combination "light source power-spectrometer sensitivity" is sufficient for *in vivo* application. The LED modules with wavelength 830 nm, manufactured for telecommunication applications and used as reference for our device, have an efficacy at least ten times higher than our self-made modules for the same wavelengths. Furthermore, increasing light injection efficiency should ameliorate the device performance by decreasing the acquisition time. The accuracy

of the device developed in our study is similar from other in literature, 10 –13 % for Nichols et al.²¹ and 4 – 14 % for Canpolat et al.¹¹

The bacteriochlorin photosensitizer 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (*m*-THPBC) is a member of a family of related tetrahydroxyphenyl compounds, which includes the well-known compound 5,10,15,20-Tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (*m*-THPBC) chlorin (*m*-THPC).²² *m*-THPBC has a strong absorbance in the red region (740 nm).^{23,24} In view of the weak absorbance of tissues at this wavelength, this offers promising therapeutic perspectives for PDT of deep tumours and pigmented tissues. Pre-clinical studies have demonstrated that the area of necrosis is by far the largest after irradiation of *m*-THPBC-sensitised liver ($93 \pm 8 \text{ mm}^2$) compared to corresponding treatment with *m*-THPC ($26 \pm 4 \text{ mm}^2$) or with Photofrin ($34 \pm 11 \text{ mm}^2$).⁷ Although it shows the greatest bioactivity, the bacteriochlorin has not been get an important development because of concerns about its relative instability.^{8,24,25} Rovers et al.²⁶ demonstrated that the threshold for liver damage using *m*THPBC is mainly determined by the tissue concentration and less by the light dose administered. Of utmost importance in PDT is the time interval between drug administration and light irradiation. In treatment of tumour the DL-interval will determine the selectivity of the PDT treatment, as a difference in tissue kinetics will in most cases lead to preferential tumor tissue concentrations at later time intervals.^{27,28}

The use of PDT for liver neoplasms has been limited as most photosensitizers are efficiently accumulated in normal liver tissue, not leading to selective uptake into malignant tissue. Also, liver tissue, being a highly pigmented tissue, limits deep penetration of light and thus treatment volumes.²⁹ We studied the *m*THPBC

distribution in a xenograft human HT29 cells line in a rat liver at different times after intravenous administration, using *ex vivo* tissue extractions and *in vivo* fluorescence measurements. Both methods showed different mTHPBC pharmacokinetics in liver and tumour tissue. The concentration increased both in normal and tumoral tissues in the first fourth hours and decreased after. The results of our study confirmed that concentration of mTHPBC are always higher in normal liver tissue than in HT29 liver tumour. It could be explained by the size of the tumours. The tumours measured 1 to 2 cm of diameter, with necrotic area in the center of the tumours, and with lesser vascularisation in such big tumours. Also the concentration of the mTHPBC is inferior in the tumour in comparison with the normal liver tissue which is richly vascularised. These results were in opposition with those of Rovers et al. who used mTHPC in a model of liver tumour rat with CC531 cell line.²⁹ The mTHPC decreased rapidly in liver tissue, whereas mTHPC in tumour tissue remained high up to 48 h after injection. Like Rovers et al.²⁹, we believe drug selectivity is less important, as damage to a rim of normal tissue is tolerated and even preferred in treatment of cancerous tissue, with destruction of the peripheral neovascularization.^{30,31} Some authors suggest that the PDT effect, in both tumours and normal tissues, is largely mediated via vascular damage and that the selectivity of PDT is not based on differential tumour drug uptake.^{30,32} Of utmost importance is presence of enough photosensibilizer in tumour tissue to effectively eradicate tumour cells. Our results of mTHPBC pharmacokinetics in liver and tumour tissue suggest that we could illuminate shortly after mTHPBC injection. Drug injection and light illumination could be performed the same day, limiting hospitalization times.

In conclusion, we have demonstrated that elastic-scattering spectroscopy has the potential to provide quantitative, *in vivo*, site-specific measurements of mTHPBC concentration in liver and HT29 tumour. Our study has demonstrated a pronounced dissociation between tumour drug levels of the mTHPBC and liver tissue drug levels, with a better selectivity for normal liver tissue than for HT29 liver tumour. We suggest that the mTHPBC-mediated PDT effect could be largely mediated via vascular damage in peripheral liver tissue surrounding the tumour and that the selectivity of the treatment could not be based on differential tumour drug uptake.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Alexis Vautrin Cancer Center Funds and French Ligue Nationale contre le Cancer. We gratefully acknowledge Biolitec Pharma Ltd. for providing the mTHPBC.

REFERENCES

1. C. Hill and F. Doyon, "Frequency of cancer in France: 2004 update," *Bull Cancer* **91**, 9-14 (2004).
2. Y. Fong, M. A. Cohen, G. J. Fortner, W. E. Enker, A. D. Turnbull and D. G. Coit, "Liver resection for colorectal metastases," *J Clin Oncol* **15**, 938-946 (1997).
3. S. B. Brown, E. A. Brown and I. Walker, "The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment," *Lancet Oncol* **5**, 497-508 (2004).
4. T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korblick, J. Moan and Q. Peng, "Photodynamic therapy," *J Natl Cancer Inst* **90**, 889-905 (1998).

5. N. L. Oleinick, R. L. Morris and I. Belichenko, "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how," *Photochem Photobiol Sci* **1**, 1-21 (2002).
6. B. W. Henderson and T. J. Dougherty, "How does photodynamic therapy work?," *Photochem Photobiol* **55**, 145-57 (1992).
7. J. P. Rovers, M. L. de Jode and M. F. Grahn, "Significantly increased lesion size by using the near-infrared photosensitizer 5,10,15,20-tetrakis (m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin in interstitial photodynamic therapy of normal rat liver tissue," *Lasers Surg Med* **27**, 235-40 (2000).
8. M. F. Grahn, A. McGuinness, R. Benzie, R. Boyle, M. L. de Jode, M. G. Dilkes, B. Abbas and N. S. Williams, "Intracellular uptake, absorption spectrum and stability of the bacteriochlorin photosensibilizer 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl) bacteriochlorin (mTHPBC). Comparison with 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl) chlorin (mTHBC)," *J Photochem Photobiol B: Biol* **37**, 261-266 (1997).
9. J. P. Rovers, A. E. Saarnak, M. de Jode, H. J. Sterenborg, O. T. Terpstra and M. F. Grahn, "Biodistribution and bioactivity of tetra-pegylated meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin compared to native meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in a rat liver tumor model," *Photochem Photobiol* **71**, 211-7 (2000).
10. J. R. Mourant, T. M. Johnson, G. Los and I. J. Bigio, "Non-invasive measurement of chemotherapy drug concentrations in tissue: preliminary demonstrations of in vivo measurements," *Phys Med Biol* **44**, 1397-1417 (1999).
11. M. Canpolat and J. R. Mourant, "Monitoring photosensitizer concentration by use of a fiber-optic probe with a small source-detector separation," *Appl Optics* **39**, 6508-6514 (2000).
12. S. T. Flock, S. L. Jacques, B. C. Wilson, W. M. Star and M. J. van Gemert, "Optical properties of intralipid: a phantom medium for light propagation studies," *Lasers Surg Med* **12**, 510-519 (1992).

13. H. van Staveren, C. Moes, J. van Marle, S. Prahl and M. J. van Gemert, "Light scattering in intralipid-10 % in the wavelength range of 400 - 1100 nm," *Appl Optics* **30**, 4507-4514 (1991).
14. L. Lilge, C. D. O'Carroll and B. C. Wilson, "A solubilization technique for photosensitizer quantification in ex vivo tissue samples," *J Photochem Photobiol B: Biol* **39**, 229-235 (1997).
15. V. Tuchin, "Light scattering methods and instruments for medical diagnosis," Chapter in *Tutorial texts in optical engineering*, SPIE Press, Bellingham, (2000).
16. R. Weersink, J. Hayward, K. Diamond and M. Patterson, "Accuracy of noninvasive in vivo measurements of photosensitizer uptake based on a diffusion model of reflectance spectroscopy," *Photochem Photobiol* **66**, 326-335 (1997).
17. B. C. Wilson, M. S. Patterson and L. Lilge, "Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a new paradigm," *Lasers Med Sci* **12**, 182-189 (1997).
18. D. R. Braichotte, J. F. Savary, P. Monnier and H. E. van den Bergh, "Optimizing light dosimetry in photodynamic therapy of early stage carcinomas of the esophagus using fluorescence spectroscopy," *Lasers Surg Med* **19**, 340-6 (1996).
19. F. Guillemain, O. A'Amar, H. Rezzoug, D. Lignon, F. Jaffry, C. Abdalnour, L. Muller, E. Yvround, J. L. Merlin, Y. Granjon, L. Bolotina-Bezdetnaya, N. Zeghari, K. Khemis, M. Barbari-Heyob, A. Meunier-Reynes, A. Potapenko, D. Notter and C. Vigneron, "Optical instrumentation suitable for real time dosimetry during photodynamic therapy," Chapter in *Optical Biopsies*, R. Cubeddu, S. R. Mordon and K. Svanberg, 92-99, Proc. SPIE, (1995).
20. J. S. Dam, T. Dalgaard, P. E. Fabricius and S. Andersson-Engels, "Multiple polynomial regression method for determination of biomedical optical properties from integrating sphere measurements," *Appl Optics* **39**, 1202-1209 (2000).

21. M. Nichols, E. Hull and T. Foster, "Design and testing of a white-light, steady-state diffuse reflectance spectrometer for determination of optical properties of highly scattering systems," *Appl Optics* **36**, 93-104 (1997).
22. R. Bonnett, R. D. White, U. J. Winfield and M. C. Berembaum, "Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers," *Biochem J* **261**, 277-280 (1989).
23. R. Bonnett, P. Charlesworth, B. D. Djelal, S. Foley, M. D.J. and T. G. Truscott, "Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (m-THPBC): a comparative study," *J Chem Soc Perkin Trans 2*, 325-328 (1999).
24. H. P. Lassalle, L. Bezdetnaya, V. Iani, A. Juzeniene, F. Guillemin and J. Moan, "photodegradation and phototransformation of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (*m*-THPBC) in solution," *Photochem Photobiol Sci* **3**, 999-1005 (2004).
25. R. Bonnett, "Photosensitizers of the porphyrin and phtalocyanine series for photodynamic therapy," *Chem Soc Rev* **24**, 19-33 (1995).
26. J. P. Rovers, M. L. de Jode, H. Rezzoug and M. F. Grahn, " *In vivo* photodynamic characteristics of the near-infrared photosensitizer 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin," *Photochem photobiol* **72**, 358-364 (2000).
27. F. A. Stewart and Y. Oussoren, "Functional and histological bladder damage in mice after photodynamic therapy: the influence of sensitiser dose and time of administration," *Br J Cancer* **68**, 673-7 (1993).
28. J. van den Boogert, R. van Hillegersber g, H. J. van Staveren, R. W. de Bruin, H. van Dekken, P. D. Siersema and H. W. Tilanus, "Timing of illumination is essential for effective and safe photodynamic therapy: a study in the normal rat oesophagus," *Br J Cancer* **79**, 825-30 (1999).

29. J. P. Rovers, A. E. Saarnak, A. Molina, J. J. Schuitmaker, H. J. Sterenborg and O. T. Terpstra, "Effective treatment of liver metastases with photodynamic therapy, using the second-generation photosensitizer meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC), in a rat model," *Br J Cancer* **81**, 600-8 (1999).
30. V. H. Fingar, S. W. Taber, P. S. Haydon, L. T. Harrison, S. J. Kempf and T. J. Wieman, "Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a view and comparison of effect in pre-clinical and clinical models at the University of Louisville," *In Vivo* **14**, 93-100 (2000).
31. V. H. Fingar, T. J. Wieman, S. A. Wiehle and P. B. Cerrito, "The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion," *Cancer Res* **52**, 4914-21 (1992).
32. P. Cramers, M. Ruevekamp, H. Oppelaar, O. Dalesio, P. Baas and F. A. Stewart, "Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy," *Br J Cancer* **88**, 283-90 (2003).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La chirurgie reste le traitement de référence des métastases hépatiques de cancers colorectaux mais proportionnellement peu de patients sont éligibles (6). L'ablathermie par radiofréquence est une alternative pour le traitement des tumeurs hépatiques irrésécables, et peut-être dans le futur pour les tumeurs résécables. L'efficacité de la RF a été démontrée pour un grand nombre de patients (plus de 6000) (297). La RF peut être réalisée par voie percutanée, coelioscopique ou en peropératoire en association avec des résections hépatiques. La RF est considérée comme une procédure avec un faible taux de mortalité, de 0 à 1,6 % et un taux de complications compris entre 2,4 et 9,8 % (95, 96, 297). Ces chiffres indiquent que même si la RF est une procédure sûre, le risque de complications, parfois mortelles, existe. Les lésions difficiles à traiter par RF sont les lésions centrales car proche des vaisseaux et des voies biliaires. Le taux de récurrence locale lorsqu'une RF est réalisée au contact des gros vaisseaux varie de 33 % pour les veines sus hépatiques à 100 % pour la veine cave inférieure (298). Le taux de complications biliaires varie de 1 à 20 % (92, 95, 96, 112, 113, 297). Afin de pouvoir traiter les lésions centrales sans risquer des complications biliaires précoces ou tardives, plusieurs techniques ont été développées. Bilchick *et al.* (299) ont placé des stents biliaires par voie endoscopique avant l'ablathermie afin de prévenir les sténoses. Stippel *et al.* (300) ont traité les complications biliaires une fois celle-ci installées, en plaçant des stents dans les voies biliaires sténosées. Elias *et al.* sont les premiers à avoir rapporté la perfusion des voies biliaires par du sérum froid afin de les protéger des effets thermiques de l'ablathermie par RF (301). Le but de notre travail était de démontrer, à partir d'un modèle expérimental de lésions biliaires chez le porc, que l'on pouvait réaliser une ablathermie par RF au contact des voies biliaires intrahépatiques sans conséquence pour ces dernières si on les perfusait par du sérum glucosé froid.

Depuis la soumission de notre étude à *Annals of Surgery*, plusieurs études expérimentales concernant la même thématique ont été publiées dans la littérature (Tableau 4). La première a été rapportée par Raman *et al.* (302). Sept porcs ont été utilisés au total dont 3 témoins. Ils ont été sacrifiés à la 48^{ième} heure, ne permettant qu'une étude des lésions immédiates biliaires et non à distance dans le temps. Aucun clampage pédiculaire n'a été réalisé pour éliminer le "cooling effect". La perfusion de sérum salé froid ne permettait qu'une protection partielle

(lésions de l'épithélium biliaire à type de desquamation) et variable des voies biliaires (302) alors que dans notre expérimentation, il n'y avait pas de lésion histologique dans 35 cas sur 40. Cette différence était peut être due à leur débit de perfusion, 26 ml/mn, inférieur au notre (90 ml/mn). L'intérêt de leur étude est que pour un porc, les auteurs ont perfusé les voies biliaires avec du sérum à température ambiante (25 °C). Il n'y avait alors aucune différence avec le groupe témoin de 3 porcs. L'effet protecteur de la perfusion est dû à son caractère froid lorsque le débit de perfusion est faible.

Une deuxième étude à propos du refroidissement des voies biliaires intrahépatiques chez le porc a été publiée (303). Elle a montré que l'efficacité de la RF était maintenue lors du cooling avec du sérum salé à 8 °C. Toutefois les auteurs n'ont pas pu conclure quant à la protection des voies biliaires car les animaux ont été sacrifiés immédiatement après la procédure. Or les lésions biliaires se développent dans les semaines suivant l'ablathermie comme nous l'avons montré dans notre première publication (304).

La dernière étude concernait 12 porcs qui étaient randomisés entre perfusion des voies biliaires par du sérum salé isotonique à 21 ° C à un débit de 100 – 120 ml/min et pas de perfusion lors d'une ablathermie par RF au contact des voies biliaires (305). Le suivi était réalisé par une IRM effectuée le lendemain de la procédure afin de valider la bonne position de la zone d'ablathermie par rapport aux voies biliaires. Une deuxième IRM était réalisée au 28^{ème} jour afin de visualiser les sténoses biliaires. Dans le groupe perfusé, un porc avait une sténose biliaire contre 5 dans le groupe non perfusé (P = 0,04). La température des voies biliaires était significativement plus basse dans le groupe perfusé (21 versus 38 ° C, P < 0,001).

Tableau 4. Séries de la littérature concernant le refroidissement des voies biliaires lors d'une ablathermie hépatique par radiofréquence chez le porc

Référence	N	Liquide	Température (°C)	Débit (ml/min)	Date S	Protection
Raman (302)	6	Sérum salé	6 – 8	26	J2	Partielle*
Jersenius (303)	20	Sérum salé	8	40	J0	nd
Stippel (305)	12	Sérum salé	21	120	J28	Efficace [§]
Notre étude	40	Sérum glucosé	7,1 +/- 0,8	90	J8 et J21	Efficace [¶]

N: nombre de porcs, nd: non déterminée, J: jour, S: sacrifice

* P < 0,05, § P = 0,04, ¶ P < 0,0001

Notre étude se distingue des précédentes par le nombre plus important de sujets, par la classification des différentes lésions radiologiques et histologiques que l'on peut observer, et par l'utilisation d'un clampage pédiculaire dans 50 % des cas. De l'étude de la littérature et de notre série, nous pouvons tirer plusieurs enseignements:

- L'impact du clampage pédiculaire: le clampage pédiculaire a un impact sur les lésions biliaires avec une diffusion de ces lésions sur l'arbre biliaire en amont de la zone d'ablathermie, ce qui n'avait jamais été rapporté dans la littérature. Pour Jersenius et al. (303), le refroidissement biliaire n'a aucun impact sur la taille et la qualité de la nécrose de la zone d'ablathermie. Toutefois aucun clampage pédiculaire n'avait été effectué et donc le "cooling effect" n'a pu être éliminé. Dans notre étude, le volume des zones de nécrose était plus petit en cas de refroidissement biliaire, $14,1 \pm 5,1 \text{ cm}^3$ versus $10 \pm 2,7 \text{ cm}^3$ mais cela n'était pas significatif (P = 0,9). Par contre les zones de nécrose étaient inhomogènes en présence d'un refroidissement biliaire, les structures cellulaires étaient toutefois altérées de façon irréversible. L'association refroidissement biliaire et clampage pédiculaire permettait d'obtenir des zones de nécrose homogène sans augmenter le nombre de lésions sur l'arbre biliaire. En pratique clinique, il faut peut-être éviter un clampage pédiculaire comme le soulignait Elias *et al.* (306) afin que le flux sanguin

protège la voie biliaire par refroidissement (échangeur thermique), mais il y a un risque probablement plus important de récurrence tumorale au contact de la voie biliaire (52, 307). Toutefois, ce risque n'a pas été vérifié dans la série clinique de 13 patients (une seule récurrence locale sur un foie de cirrhose) (306).

- Le débit et la température du liquide de perfusion: la question est de déterminer ces 2 paramètres afin d'obtenir un bon compromis entre protection biliaire et efficacité de la RF sur la tumeur. Elias et al. (306) ont utilisé du Ringer lactate à 4° C avec une pression de 300 mmHg. Raman et al. (302) ont utilisé du sérum salé à 6 – 8° C avec un débit de 26 ml/min, Jersenius et al. (303) du sérum salé à 8° C avec un débit de 40 ml/min alors que Stippel et al. (305) ont utilisé du sérum salé isotonique à température ambiante (21° C) avec un débit de 100 – 120 ml/min et une pression de 200 mmHg. La protection biliaire semble efficace même avec un liquide à température ambiante, pour peu que le débit soit suffisant. Ainsi Raman et al. (302) ont perfusé les voies biliaires avec du sérum salé à température ambiante mais avec un débit faible (26 ml/min) et n'ont pas trouvé de différence par rapport au groupe contrôle non perfusé. Notre étude a montré que si on utilisait du sérum glucosé froid avec un débit de 90 ml/min, on risquait de diminuer l'efficacité de la RF. Par contre, un clampage pédiculaire restait possible. En résumé, le liquide de refroidissement biliaire doit avoir un débit suffisant, autour de 100 ml/min. Sa température peut être proche de la température ambiante, afin de ne pas altérer l'effet de la RF sur la tumeur mais elle doit être froide, entre 4 et 7° C si l'on associe un clampage pédiculaire.
- Le type de liquide de perfusion: le type de liquide de perfusion, pourvu qu'il soit isotonique, ne semble pas influencer les résultats. Le facteur le plus important semble être le débit de perfusion.

L'enthousiasme initial pour la RF a été tempéré par les résultats des études à long terme qui ont mis en évidence un taux de récurrence locale important dans le traitement des tumeurs de plus de 3,5 cm de diamètre. Pour des traitements percutanés de métastases de cancers colorectaux d'un diamètre supérieur à 2,5 cm, des taux de récurrence locale de 35 % à 89 % ont été rapportés (46, 84, 92, 308). Le taux de récurrence locale après RF dépend de plusieurs facteurs. Ils sont en rapport avec la lésion comme la taille tumorale, le type histologique de tumeur, la localisation (sous capsulaire versus intraparenchymateuse, situation par rapport aux gros vaisseaux), et dépendent aussi de l'opérateur (expérience) et du mode de réalisation de la

RF (percutané versus peropératoire, clamage vasculaire, souhait d'obtenir des marges de 1 cm) (298). En analyse multivariée, le taux de récurrence locale est plus faible lorsque la lésion fait moins de 3 cm de diamètre ($P < 0,001$) et lorsque l'approche est chirurgicale ($P < 0,001$). Le taux de récurrence locale augmente avec la taille tumorale. La RF est capable de détruire le centre de la tumeur mais la récurrence se fait la plupart du temps à partir de la périphérie de la lésion. La fréquence de résidus tumoraux dans le parenchyme entourant la zone d'ablation suggère que des foyers tumoraux non traités persistent (309). C'est pourquoi il est important de détruire une couronne de tissu sain de 1 cm autour de la tumeur à l'image de la chirurgie qui passe au large des lésions. Plusieurs solutions ont été imaginées pour augmenter le volume de destruction tumorale. La première consiste à injecter du sérum salé hypertonique au sein de la tumeur afin d'augmenter la diffusion du courant électrique et donc le volume de destruction tumorale induit par la RF (33, 310). Une autre stratégie pour augmenter la performance de la RF est d'y associer une perfusion intraveineuse de chimiothérapie, comme la doxorubicine véhiculée par des liposomes (310, 311). L'équipe de Goldberg a montré que l'on pouvait ainsi augmenter de 25 à 30 % le volume de nécrose (312). L'accumulation des liposomes se fait préférentiellement dans le tissu environnant la zone d'ablation, zone où se situent les résidus tumoraux (313). L'hyperthermie augmente la perméabilité vasculaire et donc augmente la concentration locale de l'agent cytotoxique (309, 313). En résumé, l'association de 2 techniques de destruction tumorale devrait permettre d'augmenter la taille de destruction tumorale, en potentialisant les effets indirects de l'hyperthermie (30). L'action de la PDT est aussi potentialisée par l'hyperthermie (314-317). Nous avons donc imaginé associer la PDT par *m*THPBC à la RF dans le traitement des métastases colorectales.

Nous avons dans un premier temps réalisé la mise au point d'un modèle expérimental de métastase hépatique de volume suffisamment important pour pouvoir tester la RF et la PDT. Ce modèle, inexistant dans la littérature, était nécessaire pour avoir des conditions locales aussi proches que possible de la réalité clinique. Puis il a fallu déterminer la pharmacocinétique de la *m*THPBC dans le foie et la tumeur. L'extraction chimique avec mesure de fluorescence est la technique de référence pour déterminer la concentration d'un photosensibilisant dans un tissu. Toutefois cette technique est invasive et n'est pas applicable en temps réel. Le frein au développement de la PDT, outre sa technicité et la nécessité d'une équipe pluridisciplinaire, est l'absence de dosimétrie en temps réel. C'est pourquoi il a été développé un spectromètre de diffusion élastique, en collaboration avec le Dr V. Chalau. Cet appareil permet de réaliser une dosimétrie en temps réel. Nous avons montré la fiabilité des mesures en les comparant au test de référence qu'est l'extraction chimique. Le coefficient de

corrélation entre les résultats de mesures par les 2 techniques était de 0,997. Cet appareil, en raison de son faible diamètre au niveau de la fibre (1,8 mm) permettra une utilisation à travers un canal opérateur d'endoscope.

Le photosensibilisant (PS) idéal doit se concentrer dans le tissu tumoral (sélectivité), avoir une demi-vie courte pour limiter les effets secondaires et être excitable dans le rouge et le proche infra rouge pour mieux pénétrer les tissus en profondeur. En effet, le facteur limitant pour traiter des tumeurs larges, profondément situées, est principalement la capacité de la lumière à pénétrer en profondeur (159). La *mTHPBC* est un PS dont l'excitation se fait dans le proche infra rouge (740 nm) (157), permettant une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus, en particulier dans le foie (159, 164). Le photoblanchiment de la *mTHPBC* est plus rapide que pour la *mTHPC* (165, 318), et la *mTHPBC* est moins stable dans l'eau (158), diminuant la phototoxicité de la *mTHPBC*. Nous avons montré que la cinétique d'accumulation dans le foie avait un pic à la quatrième heure puis un plateau comme pour la *mTHPC* (158). Toutefois la cinétique d'accumulation dans le foie tumoral, en particulier dans des métastases hépatiques de cancers colorectaux, n'avaient pas été décrite. Nous avons montré que la cinétique d'accumulation de la *mTHPBC* était plus grande dans le foie sain que dans les métastases, au contraire de la *mTHPC* (319). Cela s'explique par la vascularisation importante du foie alors que les métastases, de part leur grand volume, ont une vascularisation intratumorale faible et sont plutôt nécrotiques en leur centre. Le PS s'accumule donc plutôt en périphérie et peu dans la tumeur. Dans l'étude de Rovers et al., les métastases hépatiques mesuraient de 5 à 7 mm (319), alors que pour notre modèle animal, la taille des lésions variaient de 10 à 20 mm. Une autre raison possible de cette différence de sélectivité entre la *mTHPBC* et la *mTHPC* pour la tumeur est probablement due à un site différent de fixation, la *mTHPBC* se fixant au niveau de la néovascularisation tumorale et la *mTHPC* au niveau tumoral (320). Le pic d'absorption de la *mTHPBC* est maximal à la 4^{ème} heure, aussi bien dans le foie sain que dans les métastases, puis décroît avec le temps pour devenir indétectable à la 48^{ème} heure. La PDT avec *mTHPBC* doit donc se réaliser 4 heures après l'injection intraveineuse du PS. Cette donnée a été confirmée par l'étude clinique multicentrique de van Duijnhoven et al. (321) qui montrait un plateau atteint entre la quatrième et la sixième heure pour les concentrations plasmatiques de *mTHPBC* après injection intraveineuse, mais avec une décroissance beaucoup plus lente, sur 14 jours. Cette différence de cinétique du PS entre le modèle murin et l'expérimentation clinique a été aussi retrouvé pour l'étude de la *mTHPC* ou Foscan[®] (322). La sélectivité plus faible de la *mTHPBC* pour la tumeur que pour le tissu

environnant peut paraître comme un obstacle à l'utilisation de ce PS. Toutefois, pour Cramers et al., les dommages vasculaires secondaire à la PDT auraient plus d'importance que la sélectivité tumorale du PS pour expliquer les effets létales de la PDT (322). En effet, il n'a pas été retrouvé de corrélation entre la taux intratumoral du PS et l'effet de la PDT mais il a été retrouvé une corrélation avec le taux plasmatique du PS (323). La destruction de la néovascularisation péri tumorale aurait pour conséquence une ischémie de la tumeur et sa destruction secondaire (320, 324). Les néovaisseaux tumoraux sont plus sensibles à la PDT que les vaisseaux normaux (205). West et al. ont montré que les cellules endothéliales étaient plus sensibles à la PDT que les cellules d'adénocarcinomes (325). Cette vascularisation péri tumorale représente donc une cible pour la PDT.

La chimiothérapie agit sur les cellules cancéreuses et natives saines, mais pas sur la néovascularisation tumorale. Lorsque la chimiothérapie est interrompue, les métastases progressent à nouveau. C'est le rationnel pour administrer des anti angiogénèses en même temps que la chimiothérapie (326). Par ailleurs, lorsque l'on agit sur 2 cibles différentes en même temps (comme par exemple la néovascularisation tumorale et les cellules tumorales), l'efficacité thérapeutique se trouve renforcée (288). C'est pourquoi, l'association RF, détruisant la tumeur, et PDT, avec son action anti angiogénèse locale, devrait permettre un meilleur contrôle local des métastases hépatiques, en particulier pour les lésions d'un diamètre supérieur à 3 cm. De plus, l'action de la PDT est potentialisée par l'hyperthermie (314, 327). L'association PDT et hyperthermie, même si elle n'est pas à chaque fois synergique, est au moins additive pour les effets cytotoxiques (328, 329). Le but du travail qui suivra cette thèse sera de valider cette hypothèse. A partir du modèle expérimental de xénogreffes que l'on a développé chez le rat nude, l'action conjuguée de la RF et de la PDT avec la *m*THPBC sera testée. Cinq groupes de 5 rats chacun seront constitués. Le premier groupe ne recevra aucun traitement et sera le groupe témoin. Le deuxième groupe sera traité par RF seule, le troisième par PDT seule, le quatrième par RF puis PDT, le cinquième par PDT puis RF. Le suivi sera iconographique et histologique. L'acquisition d'un micro-PET (positron emission tomography) début 2006 par le service des Isotopes de Brabois (Pr. G. Karcher) permettra le suivi iconographique. Une première acquisition sera effectuée avant le traitement puis d'autres seront réalisées dans le cadre du suivi post thérapeutique avant la validation histologique. Une expérience préliminaire sur un morpho-PET classique a permis de valider la captation du traceur (2-fluoro-2-deoxy-D-glucose) par la tumeur hépatique (Figure 1.1.).

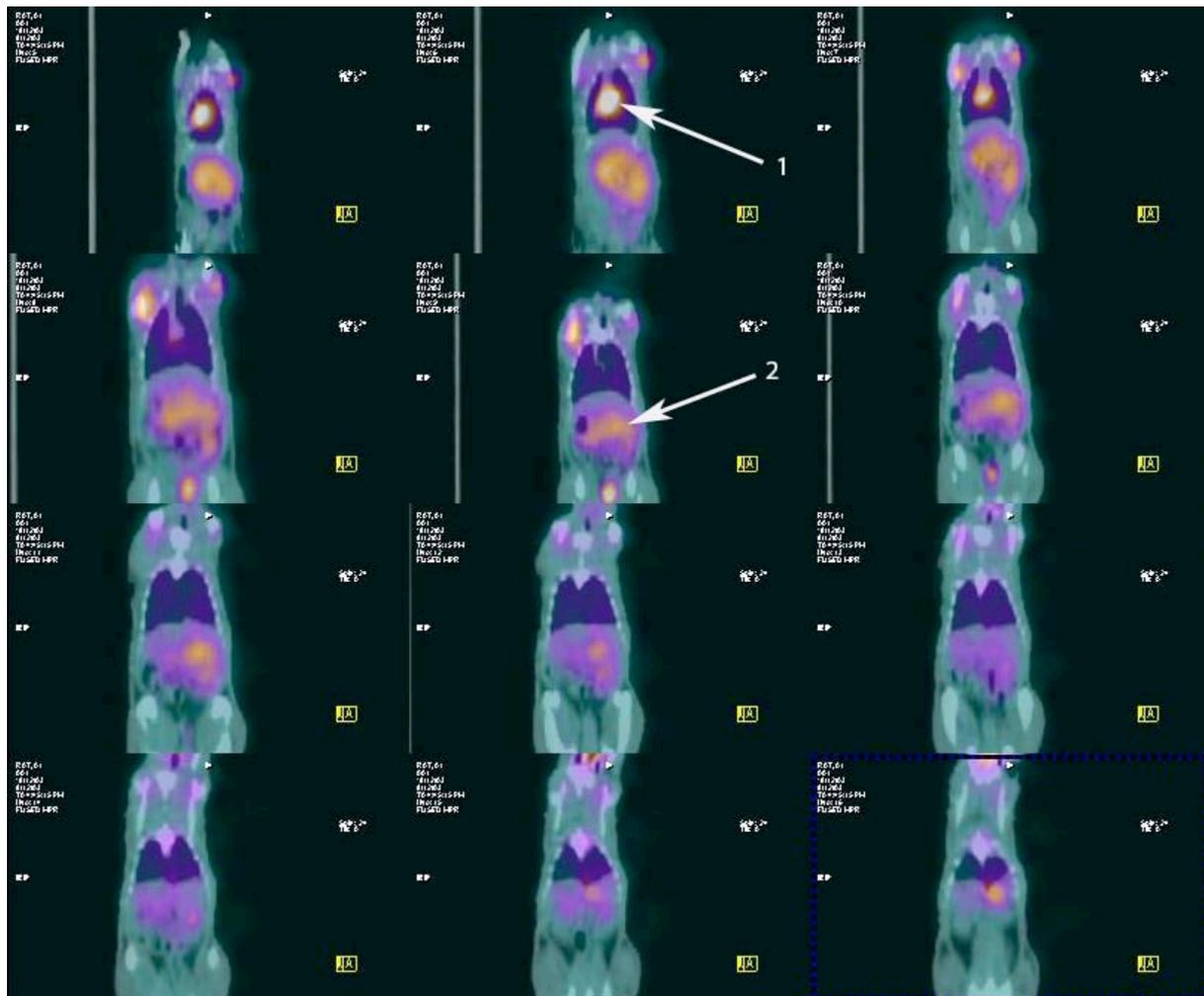


Figure 1.1. Morpho-PET 2 mois après xéno greffe d'une lignée de tumeur humaine HT29 chez le rat athymique. (1): fixation myocardique (2): fixation tumorale intrahépatique

Une des limites de la RF est la destruction au contact des gros vaisseaux. Le flux sanguin entraîne une déperdition de chaleur et donc diminue l'effet thérapeutique, avec 100 % de récurrence locale au contact de la veine cave inférieure (298). La PDT s'affranchit de ce problème car son action n'est pas basée sur l'hyperthermie mais sur des réactions impliquant la présence d'oxygène, ce qui contre indique par ailleurs tout clampage pédiculaire (321). La destruction in situ de tumeurs situées au contact de gros vaisseaux peut être un autre axe de recherche de la PDT.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

En conclusion, le modèle expérimental de sténose des voies biliaires intrahépatiques chez le porc est un modèle fiable et reproductible. Des lésions des voies biliaires à distance de la zone d'ablathermie ont été observées, lésions plus fréquentes encore après clampage pédiculaire lors de la procédure d'ablathermie par radiofréquence.

Le refroidissement des voies biliaires intrahépatiques par du sérum glucosé 5 % froid lors d'une ablathermie par radiofréquence au contact d'une voie biliaire intrahépatique protège cette voie biliaire des effets secondaires de l'hyperthermie. Cette protection des voies biliaires est efficace pour les canaux biliaires situés au contact des zones d'ablathermie et pour les canaux biliaires situés à distance. Les volumes de nécrose ainsi obtenus par radiofréquence ne sont pas significativement différents en présence ou non d'un refroidissement biliaire. L'étude histologique de la périphérie des zones de nécrose au contact des voies biliaires refroidies montre une nécrose moins complète qu'au centre, sans que l'on ne sache si ces plages périphériques de nécrose sont viables ou non. Il reste encore à déterminer la température idéale du liquide de perfusion en fonction du débit de perfusion.

La deuxième partie de notre travail a consisté à étudier la pharmacocinétique d'un nouveau photosensibilisant de deuxième génération, la *m*THPBC ou Bactériochlorine®. Un nouveau modèle de métastase hépatique chez le rat nude a été développé à partir de cellules d'une lignée d'adénocarcinome humain HT29. L'obtention de lésions de près de 3000 mm³ permet de tester les techniques de destruction locale dans des conditions plus proches de la réalité clinique. L'étude pharmacocinétique de la *m*THPBC a été réalisée grâce au développement d'un spectromètre de diffusion élastique. Les mesures obtenues ont été corrélées aux mesures réalisées par extraction chimique, la technique de référence. Le développement de ce spectromètre de diffusion élastique doit se poursuivre car il permet de réaliser une dosimétrie per procédure lors de la PDT et donc de mieux adapter les constantes de la lumière en fonction de la concentration intratissulaire du photosensibilisant. Le pic de concentration de la *m*THPBC est obtenue à la 4^{ème} heure après l'injection et décroît très rapidement dans le temps pour devenir indétectable à la 48^{ème} heure. Cette cinétique rapide devrait permettre de diminuer les effets secondaires de la PDT comme la photosensibilisation cutanée. La sélectivité de la *m*THPBC plus importante pour le foie sain que pour les

métastases pourrait être un frein à l'utilisation de ce photosensibilisant. Ceci s'explique par le caractère nécrotique des métastases avec peu de vascularisation intratumorale donc une plus faible concentration intratumorale du photosensibilisant par rapport au tissu sain environnant. Cette cinétique devrait être mise à profit pour favoriser l'action antiangiogénique de la PDT lors du traitement des métastases hépatiques.

Les perspectives de ce travail sont l'association de la PDT et de la RF pour le traitement des métastases hépatiques de taille supérieure à 3 cm. La RF permettra de détruire la partie centrale de la lésion et la PDT, dont l'effet est potentialisé par l'hyperthermie, permettra de détruire la périphérie de la lésion, zone où se situe la néoangiogénèse péri-tumorale.

REFERENCES

REFERENCES

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
2. Hill C, Doyon F. The frequency of cancer in France in year 2000, and trends since 1950. *Bull Cancer* 2005;92:7-11.
3. Remontet L, Estève J, Bouvier AM, Grosclaude P, Launoy G, Menegoz F, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2003;51:3-30.
4. Bouvier AM, Remontet L, Jouglu E, Launoy G, Grosclaude P, Buemi A, et al. Incidence of gastrointestinal cancers in France. *Gastroenterol Clin Biol* 2004;28:877-81.
5. Hugh TJ, Kinsella AR, Poston GJ. Management strategies for colorectal liver metastases--Part II. Review. *Surg Oncol* 1997;6:31-48.
6. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *Ann Surg* 1999;230:309-21.
7. Blumgart LH, Fong Y. Surgical options in the treatment of hepatic metastasis from colorectal cancer. *Curr Probl Surg* 1995;32:333-421.
8. Fortner JG, Silva JS, Golbey RB, Cox EB, Maclean BJ. Multivariate analysis of a personal series of 247 consecutive patients with liver metastases from colorectal cancer. I. Treatment by hepatic resection. *Ann Surg* 1984;199:306-16.
9. Yamamoto J, Kosuge T, Shimada S, Moriya Y, Suihara K. Repeat liver resection for recurrent colorectal liver metastases. *Am J Surg* 1999;178:275-81.

10. Livraghi T, Goldberg SN, Monti F, Bizzini A, Lazzaroni G, Meloni F, et al. Saline-enhanced radio-frequency tissue ablation in the treatment of liver metastases. *Radiology* 1997;202:205-10.
11. Rossi S, Fornari F, Buscarini E. Percutaneous ultrasound-guided radiofrequency electrocautery for the treatment of small hepatocellular carcinoma. *J Interv Radiol* 1993;8:97-103.
12. McGahan JP, Schneider P, Brock J, Tesluk H. Treatment of liver tumors by percutaneous radiofrequency electrocautery. *Semin Interv Radiol* 1993;10:143-9.
13. Curley SA, Marra P, Beaty K, Ellis LM, Vauthey JN, Abdalla EK, et al. Early and late complications after radiofrequency ablation of malignant liver tumors in 608 patients. *Ann Surg* 2004;239:450-8.
14. Rhim H, Yoon KH, Lee JM, Cho Y, Cho JS, Kim SH, et al. Major complications after radio-frequency thermal ablation of hepatic tumors: spectrum of imaging findings. *Radiographics* 2003;23:123-34; discussion 34-6.
15. Rhim H, Dodd GD, 3rd, Chintapalli KN, Wood BJ, Dupuy DE, Hvizda JL, et al. Radiofrequency thermal ablation of abdominal tumors: lessons learned from complications. *Radiographics* 2004;24:41-52.
16. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:889-905.
17. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol* 2004;5:497-508.
18. Vogl TJ, Eichler K, Mack MG, Zangos S, Herzog C, Thalhammer A, et al. Interstitial photodynamic laser therapy in interventional oncology. *Eur Radiol* 2004;14:1063-73.

19. Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol* 2002;3:487-97.
20. Storm F. *Hyperthermia in cancer therapy*. Boston, G.K. Hall Medical Publishers, 1983.
21. Dickson JA, Calderwood SK. Temperature range and selective sensitivity of tumors to hyperthermia: a critical review. *Ann N Y Acad Sci* 1980;335:180-205.
22. Rhim H, Dodd GD. Radiofrequency thermal ablation of liver tumors. *J Clin Ultrasound* 1999;27:221-9.
23. Huang S, Jordan N, Graham A. Closed-chest catheter desiccation of atrioventricular junction using radiofrequency energy - a new method of catheter ablation. *Circulation* 1985;72:III-389 (abstract).
24. Huang S. Advances in applications of radiofrequency current to catheter ablation therapy. *Pace* 1991;14:28-42.
25. Schulman C, Vanden-Bossche M. Hyperthermia and thermotherapy of benign prostatic hyperplasia: a critical review. *Eur Urol* 1993;23:53-9.
26. Haines DE. The biophysics of radiofrequency catheter ablation in the heart: the importance of temperature monitoring. *Pace* 1993;16:586-91.
27. McGahan JP, Browning PD, Brock JM, Tesluk H. Hepatic ablation using radiofrequency electrocautery. *Invest Radiol* 1990;25:267-70.
28. Organ LW. Electrophysiologic principles of radiofrequency lesion making. *Appl Neurophysiol* 1976-1977;39:69-76.
29. Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Christophi C. Focal hyperthermia produces progressive tumor necrosis independent of the initial thermal effects. *J Gastrointest Surg* 2005;9:410-7.

30. Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Mechanisms of focal heat destruction of liver tumors. *J Surg Res* 2005;127:208-23.
31. Muralidharan V, Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Christophi C. Effect of interstitial laser hyperthermia in a murine model of colorectal liver metastases: scanning electron microscopic study. *World J Surg* 2004;28:33-7.
32. Wheatley DN, Kerr C, Gregory DW. Heat-induced damage to HeLa-S3 cells: correlation of viability, permeability, osmosensitivity, phase-contrast light-, scanning electron- and transmission electron-microscopical findings. *Int J Hyperthermia* 1989;5:145-62.
33. Goldberg SN, Ahmed M, Gazelle GS, Kruskal JB, Huertas JC, Halpern EF, et al. Radio-frequency thermal ablation with NaCl solution injection: effect of electrical conductivity on tissue heating and coagulation-phantom and porcine liver study. *Radiology* 2001;219:157-65.
34. Steger AC, Lees WR, Shorvon P, Walmsley K, Bown SG. Multiple-fibre low-power interstitial laser hyperthermia: studies in the normal liver. *Br J Surg* 1992;79:139-45.
35. Ohno T, Kawano K, Sasaki A, Aramaki M, Yoshida T, Kitano S. Expansion of an ablated site and induction of apoptosis after microwave coagulation therapy in rat liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:360-6.
36. Nikfarjam M, Muralidharan V, Malcontenti-Wilson C, Christophi C. The apoptotic response of liver and colorectal liver metastases to focal hyperthermic injury. *Anticancer Res* 2005;25:1413-9.
37. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000;2:469-75.

38. Szmigielski S, Sobczynski J, Sokolska G, Stawarz B, Zielinski H, Petrovich Z. Effects of local prostatic hyperthermia on human NK and T cell function. *Int J Hyperthermia* 1991;7:869-80.
39. Isbert C, Boerner A, Ritz JP, Schuppan D, Buhr HJ, Germer CT. In situ ablation of experimental liver metastases delays and reduces residual intrahepatic tumour growth and peritoneal tumour spread compared with hepatic resection. *Br J Surg* 2002;89:1252-9.
40. de Baere T. La radiofréquence en cancérologie. *Bull Cancer* 2005;92:65-74.
41. Goldberg SN, Gazelle GS, Dawson SL, Rittman WJ, Mueller PR, Rosenthal DI. Tissue ablation with radiofrequency: effect of probe size, Gauge, duration and temperature on lesion volume. *Acad Radiol* 1995;2:399-404.
42. Decadt B, Siriwardena AK. Radiofrequency ablation of liver tumours: systematic review. *Lancet Oncol* 2004;5:550-60.
43. de Baere T, Denys A, Wood BJ, Lassau N, Kardache M, Vilgrain V, et al. Radiofrequency liver ablation: experimental comparative study of water-cooled versus expandable systems. *AJR Am J Roentgenol* 2001;176:187-92.
44. de Baere T, Elias D, Ducreux M, Dromain C, Kuach V, Gamal El Din M, et al. Percutaneous radiofrequency ablation of hepatic metastases. Preliminary experience. *Gastroenterol Clin Biol* 1999;23:1128-33.
45. Lencioni R, Crocetti L, Cioni D, Della Pina C, Bartolozzi C. Percutaneous radiofrequency ablation of hepatic colorectal metastases: technique, indications, results, and new promises. *Invest Radiol* 2004;39:689-97.
46. Curley SA, Izzo F, Delrio P, Ellis LM, Granchi J, Vallone P, et al. Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients. *Ann Surg* 1999;230:1-8.

47. Evrard S, Becouarn Y, Fonck M, Brunet R, Mathoulin-Pelissier S, Picot V. Surgical treatment of liver metastases by radiofrequency ablation, resection, or in combination. *Eur J Surg Oncol* 2004;30:399-406.
48. Tucker De Sanctis J, Goldberg SN, Mueller PR. Percutaneous treatment of hepatic neoplasms: a review of current techniques. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1998;21:273-96.
49. Giovannini M, Seitz JF. Ultrasound-guided percutaneous alcohol injection of small liver metastases: results in 40 patients. *Cancer* 1994;73:294-7.
50. Shibata T, Iimuro Y, Yamamoto Y, Maetani Y, Ametani F, Itoh K, et al. Small hepatocellular carcinoma: comparison of radio-frequency ablation and percutaneous microwave coagulation therapy. *Radiology* 2002;223:331-7.
51. Vogl TJ, Mack MG, Muller PK, Straub R, Engelmann K, Eichler K. Interventional MR: interstitial therapy. *Eur Radiol* 1999;9:1479-87.
52. Heisterkamp J, van Hillegersberg R, Ijzermans JN. Interstitial laser coagulation for hepatic tumours. *Br J Surg* 1999;86:293-304.
53. Vogl TJ, Müller PK, Mack MG, Engelmann K, Neuhaus P. Liver metastases: interventional therapeutic techniques and results, state of art. *Eur. Radiol.* 1999;9:675-84.
54. Vogl TJ, Straub R, Eichler K, Sollner O, Mack MG. Colorectal carcinoma metastases in liver: laser-induced interstitial thermotherapy--local tumor control rate and survival data. *Radiology* 2004;230:450-8.
55. Vogl TJ, Straub R, Zangos S, Mack MG, Eichler K. MR-guided laser-induced thermotherapy (LITT) of liver tumours: experimental and clinical data. *Int J Hyperthermia* 2004;20:713-24.

56. Bird HM. Arnott J. (Aberdeen) 1797-1883: a pionner in refrigeration analgesia. *Anesthesia* 1949;4:10-7.
57. Rivoire M, Voiglio EJ, Kaemmerlen P, Molina G, Michot JP, Finzy J, et al. La cryochirurgie des tumeurs du foie. *Ann Chir* 1997;51:54-9.
58. Rivoire M, De Cian F, Meeus P, Negrier S, Sebban H, Kaemmerlen P. Combination of neoadjuvant chemotherapy with cryotherapy and surgical resection for the treatment of unresectable liver metastases from colorectal carcinoma. *Cancer* 2002;95:2283-92.
59. Seifert JK, Morris DL. World survey on the complications of hepatic and prostate cryotherapy. *World J Surg* 1999;23:109-14.
60. Seifert JK, Stewart GJ, Hewitt PM, Bolton EJ, Jonginger T, Morris DL. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels following hepatic cryotherapy: association with volume and duration of freezing. *World J Surg* 1999;23:1019-26.
61. Seifert JK, Morris DL. Indicators of recurrence following cryotherapy for hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg* 1998;86:234-40.
62. Rivoire M, De Cian F, Meeus P, Gignoux B, Frering B, Kaemmerlen P. Cryosurgery as a means to improve surgical treatment of patients with multiple unresectable liver metastases. *Anticancer Res* 2000;20:3785-90.
63. Finlay IG, Seifert JK, Stewart GJ, Morris DL. Resection with cryotherapy of colorectal hepatic metastases has the same survival as hepatic resection alone. *Eur J Surg Oncol* 2000;26:199-202.
64. Pearson AS, Izzo F, Fleming D, Ellis LM, Delrio P, Roh MS, et al. Intraoperative radiofrequency ablation or cryoablation for hepatic malignancies. *Am J Surg* 1999;178:592-9.

65. Bilchik AJ, Wood TF, Allegra D, Tsioulis GJ, Chung M, Rose DM, et al. Cryosurgical ablation and radiofrequency ablation for unresectable hepatic malignant neoplasms. A proposed algorithm. *Arch Surg* 2000;135:657-64.
66. Adam R, Hagopian EJ, Linhares M, Krissat J, Savier E, Azoulay D, et al. A comparison of percutaneous cryosurgery and percutaneous radiofrequency for unresectable hepatic malignancies. *Arch Surg* 2002;137:1332-9.
67. Joosten J, Jager G, Oyen W, Wobbes T, Ruers T. Cryosurgery and radiofrequency ablation for unresectable colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2005;
68. Wallace JR, Christians KK, Pitt HA, Quebbeman EJ. Cryotherapy extends the indications for treatment of colorectal liver metastases. *Surgery* 1999;126:766-74.
69. Gignoux BM, Scoazec JY, Curiel L, Beziat C, Chapelon JY. [High intensity focused ultrasonic destruction of hepatic parenchyma]. *Ann Chir* 2003;128:18-25.
70. Kennedy JE, Wu F, ter Haar GR, Gleeson FV, Phillips RR, Middleton MR, et al. High-intensity focused ultrasound for the treatment of liver tumours. *Ultrasonics* 2004;42:931-5.
71. Wu F, Wang ZB, Chen WZ, Wang W, Gui Y, Zhang M, et al. Extracorporeal high intensity focused ultrasound ablation in the treatment of 1038 patients with solid carcinomas in China: an overview. *Ultrason Sonochem* 2004;11:149-54.
72. Wu F, Wang ZB, Chen WZ, Zou JZ, Bai J, Zhu H, et al. Advanced hepatocellular carcinoma: treatment with high-intensity focused ultrasound ablation combined with transcatheter arterial embolization. *Radiology* 2005;235:659-67.
73. Herfarth KK, Debus J, Lohr F, Bahner ML, Rhein B, Fritz P, et al. Stereotactic single-dose radiation therapy of liver tumors: results of a phase I/II trial. *J Clin Oncol* 2001;19:164-70.

74. Herfarth KK, Hof H, Bahner ML, Lohr F, Hoss A, van Kaick G, et al. Assessment of focal liver reaction by multiphasic CT after stereotactic single-dose radiotherapy of liver tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:444-51.
75. Solbiati L, Ierace T, Goldberg SN, Sironi S, Livraghi T, Fioocca R, et al. Percutaneous US-guided radio-frequency tissue ablation of liver metastases: treatment and follow-up in 16 patients. *Radiology* 1997;202:195-203.
76. Dodd GD, Halff GA, Rhim H, Chintapalli KN, Chopra S, Karahan OI. Radiofrequency thermal ablation of liver tumors. *RSNA* 1998;
77. Rossi S, Di Stasi M, Buscarini E, Quaretti P, Garbagnati F, Squassante L, et al. Percutaneous RF interstitial thermal ablation in the treatment of hepatic cancer. *AJR* 1996;167:759-68.
78. Elias D, de Baere T, Roche A, Ducreux M, Leclere J, Lasser P. During liver regeneration following right portal embolization the growth rate of liver metastases is more rapid than that of the liver parenchyma. *Br J Surg* 1999;86:784-8.
79. Lencioni R, Goletti O, Armillotta N, Paolicchi A, Moretti M, Cioni D, et al. Radio-frequency thermal ablation of liver metastases with a cooled-tip electrode needle: results of a pilot clinical trial. *Eur. Radiol.* 1998;8:1205-11.
80. Siperstein AE, Garland A, Engle K, Rogers SJ, Berber E, Foroutani A, et al. Local recurrence after laparoscopic radiofrequency thermal ablation of hepatic tumors. *Ann Surg Oncol* 2000;7:106-13.
81. Goldberg SN, Gazelle GS, Solbiati L, Livraghi T, Tanabe KK, Hahn PF, et al. Ablation of liver tumors using percutaneous RF therapy. *AJR* 1998;170:1023-8.
82. Solbiati L, Goldberg AS, Ierace T, Livraghi T, Meloni F, Dellanoce M, et al. Hepatic metastases: percutaneous radio-frequency ablation with cooled-tip electrodes. *Radiology* 1997;205:367-73.

83. Goldberg SN, Hahn PF, Tanabe KK, Mueller PR, Schima W, Athanasoulis CA, et al. Percutaneous radiofrequency tissue ablation: does perfusion-mediated tissue cooling limit coagulation necrosis? *J Vasc Interv Radiol* 1998;9:101-11.
84. Solbiati L, Livraghi T, Goldberg SN, Ierace T, Meloni F, Dellanoce M, et al. Percutaneous radio-frequency ablation of hepatic metastases from colorectal cancer: long-term results in 117 patients. *Radiology* 2001;221:159-66.
85. Solbiati L, Ierace T, Tonolini M. Long-term survival of patients treated by radiofrequency ablation for liver colorectal metastases: improved outcome with increasing experience. *Radiology* 2003;229(P):411.
86. Gillams AR, Lees WR. Survival after percutaneous, image-guided, thermal ablation of hepatic metastases from colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2000;43:656-61.
87. Oshowo A, Gillams A, Harrison E, Lees WR, Taylor I. Comparison of resection and radiofrequency ablation for treatment of solitary colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2003;90:1240-3.
88. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, et al. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004;239:818-25; discussion 25-7.
89. Berber E, Pelley R, Siperstein AE. Predictors of survival after radiofrequency thermal ablation of colorectal cancer metastases to the liver: a prospective study. *J Clin Oncol* 2005;23:1358-64.
90. Poston GJ. Radiofrequency ablation of colorectal liver metastases: where are we really going? *J Clin Oncol* 2005;23:1342-4.
91. Elias D, de Baere T, Smayra T, Ouellet JF, Roche A, Lasser P. Percutaneous radiofrequency thermoablation as an alternative to surgery for treatment of liver tumour recurrence after hepatectomy. *Br J Surg* 2002;89:752-6.

92. de Baere T, Elias D, Dromain C, Gamal El Din M, Kuoch V, Ducreux M, et al. Radiofrequency ablation of 100 hepatic metastases with a mean follow-up of more than 1 year. *AJR* 2000;175:1619-25.
93. Lencioni R. Long-term results of percutaneous radiofrequency ablation of hepatic colorectal cancer metastases. *Radiology* 2005;
94. de Baere T, Risse O, Kuoch V, Dromain C, Sengel C, Smayra T, et al. Adverse events during radiofrequency treatment of 582 hepatic tumors. *AJR Am J Roentgenol* 2003;181:695-700.
95. Mulier S, Mulier P, Ni Y, Miao Y, Dupas B, Marchal G, et al. Complications of radiofrequency coagulation of liver tumours. *Br J Surg* 2002;89:1206-22.
96. Livraghi T, Solbiati L, Meloni MF, Gazelle GS, Halpern EF, Goldberg SN. Treatment of focal liver tumors with percutaneous radio-frequency ablation: complications encountered in a multicenter study. *Radiology* 2003;226:441-51.
97. Giorgio A, Tarantino L, de Stefano G, Coppola C, Ferraioli G. Complications after percutaneous saline-enhanced radiofrequency ablation of liver tumors: 3-year experience with 336 patients at a single center. *AJR Am J Roentgenol* 2005;184:207-11.
98. Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S, Massault PP, Sauvanet A, Farges O. Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg* 2000;191:38-46.
99. Jaeck D, Bachellier P, Guiguet M, Boudjema K, Vaillant JC, Balladur P, et al. Long-term survival following resection of colorectal hepatic metastases. *Br J Surg* 1997;84:977-80.

100. Livraghi T, Goldberg SN, Lazzaroni S, Meloni F, Solbiati L, Gazelle GS. Small hepatocellular carcinoma: treatment with radio-frequency ablation versus ethanol injection. *Radiology* 1999;210:655-61.
101. Francica G, Marone G. Ultra-sound percutaneous treatment of hepatocellular carcinoma by radiofrequency hyperthermia with a "cooled-trip needle". A preliminary clinical experience. *Eur. J. Ultrasound* 1999;9:145-53.
102. Francica G, Marone G, Solbiati L, D'Angelo V, Siani A. Hemobilia, intrahepatic hematoma and acute thrombosis with cavernomatous transformation of the portal vein after percutaneous thermoablation of a liver metastasis. *Eur Radiol* 2000;10:926-9.
103. Rossi S, Garbagnati F, De Francesco I, Accocella F, Leonardi L, Quaretti P, et al. Relationship between the shape and size of radiofrequency induced thermal lesions and hepatic vascularization. *Tumori* 1999;85:137-41.
104. Seki T, Tamai T, Nakagawa T, Inoue K. Percutaneous radiofrequency (RF) ablation therapy for hepatocellular carcinoma: difficulty in removing the expandable RF needle electrode. *AJR* 2000;174:264-5.
105. Mazziotti A, Grazi GL, Gardini A, Cescon M, Pierangeli F, Ercolani G, et al. An appraisal of percutaneous treatment of liver metastases. *Liver Transpl Surg* 1998;4:271-5.
106. Llovet JM, Vilana R, Bru C, Bianchi L, Salmeron JM, Boix L, et al. Increased risk of tumor seeding after percutaneous radiofrequency ablation for single hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2001;33:1124-9.
107. Rossi S, Buscarini E, Garbagnati F, Di Stasi M, Quaretti P, Rago M, et al. Percutaneous treatment of small hepatic tumors by an expandable RF needle electrode. *AJR* 1998;170:1015-22.

108. Ng KK, Lam CM, Poon RT, Shek TW, Fan ST, Wong J. Delayed portal vein thrombosis after experimental radiofrequency ablation near the main portal vein. *Br J Surg* 2004;91:632-9.
109. Ng KK, Poon RT. Radiofrequency ablation for malignant liver tumor. *Surg Oncol* 2005;14:41-52.
110. Helton WS. Minimizing complications with radiofrequency ablation for liver cancer: the importance of properly controlled clinical trials and standardized reporting. *Ann Surg* 2004;239:459-63.
111. Poon RT, Ng KK, Lam CM, Ai V, Yuen J, Fan ST, et al. Learning curve for radiofrequency ablation of liver tumors: prospective analysis of initial 100 patients in a tertiary institution. *Ann Surg* 2004;239:441-9.
112. Bleicher RJ, Allegra DP, Nora DT, Wood TF, Foshag LJ, Bilchik AJ. Radiofrequency ablation in 447 complex unresectable liver tumors: lessons learned. *Ann Surg Oncol* 2003;10:52-8.
113. Bowles BJ, Machi J, Limm WM, Severino R, Oishi AJ, Furumoto NL, et al. Safety and efficacy of radiofrequency thermal ablation in advanced liver tumors. *Arch Surg* 2001;136:864-9.
114. Bilchik AJ, Rose DM, Allegra D, Bostick PJ, Hsueh E, Morton DL. Radiofrequency ablation: a minimally invasive technique with multiple applications. *Cancer J Sci Am* 1999;5:356-61.
115. Dodd GD, Soulen MC, Kane RA, Livraghi T, Lees WR, Yamashita Y, et al. Minimally invasive treatment of malignant hepatic tumors: at the threshold of a major breakthrough. *RadioGraphics* 2000;20:9-27.
116. Elias D, de Baere T, Mutillo I, Cavalcanti A, Coyle C, Roche A. Intraoperative use of radiofrequency treatment allows an increase in the rate of curative liver resection. *J Surg Oncol* 1998;67:190-1.

117. Raab O. Uber die wirkung fluoescierender stoffe auf infusoria. Z Biol 1900;39:524-30.
118. Ledoux-Lebards C. Annales de l'Institut Pasteur 1902;16:593-604.
119. von Tappeiner H. Zur Kenntnis der lichtwirkenden (fluoreszierenden) stoffe. Dtsch Med Wochenschr 1904;8:265-9.
120. Hausmann W. Die sensibilisierende wirkung des hamatoporphyrins. Biochem Z 1911;30:276-316.
121. Silver H. Psoriasis vulgaris treated with hematporphyrin. Arch Dermatol Syph 1937;36:1118-9.
122. Policard A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinées à la lumière de Wood. C R Soc Biol 1924;91:1423-4.
123. Figge FHJ, Weiland GS, Manganiello LJ. Cancer detection and therapy, affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. Proc Soc Exp Biol Med 1948;68:640-1.
124. Schwartz S, Absolon K, Vermund H. Some relationships of porphyrins, x-rays and tumors. Med Bull 1955;68:7-13.
125. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Res 1978;38:2628-35.
126. McBride G. Studies expand potential uses of photodynamic therapy. J Natl Cancer Inst 2002;94:1740-2.
127. Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. J Clin Laser Med Surg 2002;20:3-7.

128. MacDonald IJ, Dougherty TJ. basic principles of photodynamic therapy. *J Porphyrins Phtalocyanines* 2001;5:105-29.
129. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 1991;54:659.
130. Takemura T, Ohta N, Nakajima S, Sakata I. Critical importance of the triplet lifetime of photosensitizer in photodynamic therapy of tumor. *Photochem Photobiol* 1989;50:339-44.
131. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999;31:261-72.
132. van Lier JE, Spikes JD. The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines. *Ciba Found Symp* 1989;146:17-26; discussion -32.
133. Calzavara-Pinton P, Szeimies, RM, Ortel, B. Photodynamic therapy and fluorescence diagnosis in dermatology, Vol. 2. Amsterdam-Tokyo, Elsevier, 2001.
134. Foote CS, Shook FC, Abakerli RB. Characterization of singlet oxygen. *Methods Enzymol* 1984;105:36-47.
135. Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 1991;53:549-53.
136. Redmond RW, Gamlin JN. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem Photobiol* 1999;70:391-475.
137. Spikes JD. Quantum yields and kinetics of the photobleaching of hematoporphyrin, Photofrin II, tetra(4-sulfonatophenyl)-porphine and uroporphyrin. *Photochem Photobiol* 1992;55:797-808.

138. Rotomskis R, Bagdonas S, Streckyte G. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy. *J Photochem Photobiol B* 1996;33:61-7.
139. Bonnett R, Martinez G. Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron report number 591* 2001;57:9513-47.
140. Moan J, Kessel D. Photoproducts formed from photofrin II in cells. *J Photochem Photobiol B* 1988;1:429-36.
141. Krieg M, Witten DG. Self-sensitized photooxidation of protoporphyrin IX and related porphyrins in erythrocytes ghosts and microemulsions: a novel photooxydation pathway involving singlet oxygene. *J Photochem* 1984;25:235-52.
142. Ericson MB, Grapengiesser S, Gudmundson F, Wennberg AM, Larko O, Moan J, et al. A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution. *Lasers Med Sci* 2003;18:56-62.
143. Georgakoudi I, Nichols MG, Foster TH. The mechanism of Photofrin photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry. *Photochem Photobiol* 1997;65:135-44.
144. Georgakoudi I, Foster TH. Effects of the subcellular redistribution of two Nile blue derivatives on photodynamic oxygen consumption. *Photochem Photobiol* 1998;68:115-22.
145. Hadjur C, Lange N, Rebstein J, Monnier P, van den Bergh H, Wagnieres G. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl) chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC. *J Photochem Photobiol B* 1998;45:2-3.
146. Mang TS. Combination studies of hyperthermia induced by the neodymium: yttrium-aluminum-garnet (Nd:YAG) laser as an adjuvant to photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 1990;10:173-8.

147. Ris HB, Altermatt HJ, Nachbur B, Stewart JC, Wang Q, Lim CK, et al. Effect of drug-light interval on photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin in malignant mesothelioma. *Int J Cancer* 1993;53:141-6.
148. Moan J, Juzenas P, Bagdonas S. Degradation and transformation of photosensitizers during light exposure. *Recent Res Devel Photochem Photobiol* 2000;4:121-32.
149. Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem J* 1989;261:277-80.
150. Georgakoudi I, Foster TH. Singlet oxygen- versus nonsinglet oxygen-mediated mechanisms of sensitizer photobleaching and their effects on photodynamic dosimetry. *Photochem Photobiol* 1998;67:612-25.
151. Robinson DJ, de Bruijn HS, van der Veen N, Stringer MR, Brown SB, Star WM. Fluorescence photobleaching of ALA-induced protoporphyrin IX during photodynamic therapy of normal hairless mouse skin: the effect of light dose and irradiance and the resulting biological effect. *Photochem Photobiol* 1998;67:140-9.
152. Coutier S, Mitra S, Bezdetnaya LN, Parache RM, Georgakoudi I, Foster TH, et al. Effects of fluence rate on cell survival and photobleaching in meta-tetra-(hydroxyphenyl)chlorin-photosensitized Colo 26 multicell tumor spheroids. *Photochem Photobiol* 2001;73:297-303.
153. Guillemin F, Patrice T, Brault D, D'Hallewin MA, Lajat Y, Leroy M, et al. Photodynamic therapy. *Pathol Biol (Paris)* 1993;41:110-3.
154. Guillemin F, Cosserat-Gerardin I, Notter D, Vigneron C. [Diagnosis and treatment of bladder tumors by photodynamic therapy]. *Pathol Biol (Paris)* 2001;49:815-23.
155. Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2004;73:1-28.

156. Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technol Cancer Res Treat* 2005;4:283-93.
157. Bonnett R, Charlesworth P, Djelal BD, Foley S, D.J. M, Truscott TG. Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (m-THPBC): a comparative study. *J Chem Soc Perkin Trans* 1999;2:325-8.
158. Grahn MF, McGuinness A, Benzie R, Boyle R, de Jode ML, Dilkes MG, et al. Intracellular uptake, absorption spectrum and stability of the bacteriochlorin photosensitizer 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin (mTHPBC). Comparison with 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) chlorin (mTHBC). *J Photochem Photobiol B: Biol* 1997;37:261-6.
159. Rovers JP, de Jode ML, Grahn MF. Significantly increased lesion size by using the near-infrared photosensitizer 5,10,15,20-tetrakis (m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin in interstitial photodynamic therapy of normal rat liver tissue. *Lasers Surg Med* 2000;27:235-40.
160. D'Hallewin M, Bezdetnaya L, Guillemin F. Fluorescence detection of bladder cancer: a review. *Eur Urol* 2005;42:417-25.
161. Kamuhabwa AA, Roskams T, D'Hallewin MA, Baert L, Van Poppel H, de Witte PA. Whole bladder wall photodynamic therapy of transitional cell carcinoma rat bladder tumors using intravesically administered hypericin. *Int J Cancer* 2003;107:460-7.
162. Kamuhabwa AA, Di Mavungu JD, Baert L, D'Hallewin MA, Hoogmartens J, de Witte PA. Determination of hypericin in human plasma by high-performance liquid chromatography after intravesical administration in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;59:469-74.

163. Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2002;66:89-106.
164. Rovers JP, de Jode M, Rezzoug H, Grahn MF. In vivo photodynamic characteristics of the near-infrared photosensitizer 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin. *Photochem Photobiol* 2000;72:358-64.
165. Lassalle HP, Bezdetnaya L, Iani V, Juzeniene A, Guillemin F, Moan J. Photodegradation and phototransformation of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (m-THPBC) in solution. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:999-1005.
166. Henderson BW, Fingar VH. Oxygen limitation of direct tumor cell kill during photodynamic treatment of a murine tumor model. *Photochem Photobiol* 1989;49:299-304.
167. Fingar VH, Wieman TJ, Wiehle SA, Cerrito PB. The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. *Cancer Res* 1992;52:4914-21.
168. Pogue BW, O'Hara JA, Goodwin IA, Wilmot CJ, Fournier GP, Akay AR, et al. Tumor PO(2) changes during photodynamic therapy depend upon photosensitizer type and time after injection. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002;132:177-84.
169. Pogue BW, O'Hara JA, Demidenko E, Wilmot CM, Goodwin IA, Chen B, et al. Photodynamic therapy with verteporfin in the radiation-induced fibrosarcoma-1 tumor causes enhanced radiation sensitivity. *Cancer Res* 2003;63:1025-33.
170. Foster TH, Murant RS, Bryant RG, Knox RS, Gibson SL, Hilf R. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat Res* 1991;126:296-303.
171. Nichols MG, Foster TH. Oxygen diffusion and reaction kinetics in the photodynamic therapy of multicell tumour spheroids. *Phys Med Biol* 1994;39:2161-81.

172. Busch TM, Hahn SM, Evans SM, Koch CJ. Depletion of tumor oxygenation during photodynamic therapy: detection by the hypoxia marker EF3 [2-(2-nitroimidazol-1[H]-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)acetamide]. *Cancer Res* 2000;60:2636-42.
173. Coutier S, Bezdetnaya LN, Foster TH, Parache RM, Guillemin F. Effect of irradiation fluence rate on the efficacy of photodynamic therapy and tumor oxygenation in meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)-sensitized HT29 xenografts in nude mice. *Radiat Res* 2002;158:339-45.
174. Schouwink H, Oppelaar H, Ruevekamp M, van der Valk M, Hart G, Rijken P, et al. Oxygen depletion during and after mTHPC-mediated photodynamic therapy in RIF1 and H-MESO1 tumors. *Radiat Res* 2003;159:190-8.
175. Curnow A, Haller JC, Bown SG. Oxygen monitoring during 5-aminolaevulinic acid induced photodynamic therapy in normal rat colon. Comparison of continuous and fractionated light regimes. *J Photochem Photobiol B* 2000;58:149-55.
176. Pogue BW, Braun RD, Lanzen JL, Erickson C, Dewhirst MW. Analysis of the heterogeneity of pO₂ dynamics during photodynamic therapy with verteporfin. *Photochem Photobiol* 2001;74:700-6.
177. van Geel IP, Oppelaar H, Marijnissen JP, Stewart FA. Influence of fractionation and fluence rate in photodynamic therapy with Photofrin or mTHPC. *Radiat Res* 1996;145:602-9.
178. Sitnik TM, Hampton JA, Henderson BW. Reduction of tumour oxygenation during and after photodynamic therapy in vivo: effects of fluence rate. *Br J Cancer* 1998;77:1386-94.
179. Rezzoug H, Bezdetnaya L, A'Amar O, Merlin JL, Guillemin F. Parameters affecting photodynamic activity of Foscan® or meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) in vitro and in vivo. *Lasers Med Sci* 1998;13:119-25.

180. Henning JP, Fournier RL, Hampton JA. A transient mathematical model of oxygen depletion during photodynamic therapy. *Radiat Res* 1995;142:221-6.
181. Pogue BW, Hasan T. A theoretical study of light fractionation and dose-rate effects in photodynamic therapy. *Radiat Res* 1997;147:551-9.
182. Robinson DJ, de Bruijn HS, van der Veen N, Stringer MR, Brown SB, Star WM. Protoporphyrin IX fluorescence photobleaching during ALA-mediated photodynamic therapy of UVB-induced tumors in hairless mouse skin. *Photochem Photobiol* 1999;69:61-70.
183. Robinson DJ, de Bruijn HS, de Wolf WJ, Sterenborg HJ, Star WM. Topical 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy of hairless mouse skin using two-fold illumination schemes: PpIX fluorescence kinetics, photobleaching and biological effect. *Photochem Photobiol* 2000;72:794-802.
184. de Bruijn HS, van der Veen N, Robinson DJ, Star WM. Improvement of systemic 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in vivo using light fractionation with a 75-minute interval. *Cancer Res* 1999;59:901-4.
185. Tsutsui H, MacRobert AJ, Curnow A, Rogowska A, Buonaccorsi G, Kato H, et al. Optimisation of illumination for photodynamic therapy with mTHPC on normal colon and a transplantable tumour in rats. *Lasers Med Sci* 2002;17:101-9.
186. Huang Z, Chen Q, Shakil A, Chen H, Beckers J, Shapiro H, et al. Hyperoxygenation enhances the tumor cell killing of photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2003;78:496-502.
187. Golab J, Olszewska D, Mroz P, Kozar K, Kaminski R, Jalili A, et al. Erythropoietin restores the antitumor effectiveness of photodynamic therapy in mice with chemotherapy-induced anemia. *Clin Cancer Res* 2002;8:1265-70.

188. Peng Q, Moan J, Nesland JM. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. *Ultrastruct Pathol* 1996;20:109-29.
189. Hsieh YJ, Wu CC, Chang CJ, Yu JS. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol* 2003;194:363-75.
190. Boyle RW, Dolphin D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 1996;64:469-85.
191. Morgan J, Oseroff AR. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;49:71-86.
192. Oleinick NL, Evans HH. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiat Res* 1998;150:S146-56.
193. Gibson SL, Murrant RS, Hilf R. Photosensitizing effects of hematoporphyrin derivative and photofrin II on the plasma membrane enzymes 5'-nucleotidase, Na⁺K⁺-ATPase, and Mg²⁺-ATPase in R3230AC mammary adenocarcinomas. *Cancer Res* 1988;48:3360-6.
194. Joshi PG, Joshi K, Mishra S, Joshi NB. Ca²⁺ influx induced by photodynamic action in human cerebral glioma (U-87 MG) cells: possible involvement of a calcium channel. *Photochem Photobiol* 1994;60:244-8.
195. Davies CL, Ranheim T, Malik Z, Rofstad EK, Moan J, Lindmo T. Relationship between changes in antigen expression and protein synthesis in human melanoma cells after hyperthermia and photodynamic treatment. *Br J Cancer* 1988;58:306-13.
196. Berg K, Moan J. Changes in antigen expression on human FME melanoma cells after exposure to photoactivated hematoporphyrin derivative. *Photochem Photobiol* 1997;65:403-9.

197. Geiger PG, Korytowski W, Girotti AW. Photodynamically generated 3-beta-hydroxy-5 alpha-cholest-6-ene-5- hydroperoxide: toxic reactivity in membranes and susceptibility to enzymatic detoxification. *Photochem Photobiol* 1995;62:580-7.
198. Varnes ME, Chiu SM, Xue LY, Oleinick NL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:673-9.
199. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
200. Plaetzer K, Kiesslich T, Krammer B, Hammerl P. Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to ALPcS4-PDT. *Photochem Photobiol Sci* 2002;1:172-7.
201. Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas)* 2003;39:1137-50.
202. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* 2002;1:1-21.
203. Santini MT, Rainaldi G, Indovina PL. Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;36:75-87.
204. Piette J, Volanti C, Vantieghem A, Matroule JY, Habraken Y, Agostinis P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1651-9.
205. Fingar VH, Taber SW, Haydon PS, Harrison LT, Kempf SJ, Wieman TJ. Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a view and comparison of effect

- in pre-clinical and clinical models at the University of Louisville. *In Vivo* 2000;14:93-100.
206. Selman SH, Kreimer-Birnbaum M, Klaunig JE, Goldblatt PJ, Keck RW, Britton SL. Blood flow in transplantable bladder tumors treated with hematoporphyrin derivative and light. *Cancer Res* 1984;44:1924-7.
207. Foster TH, Primavera MC, Marder VJ, Hilf R, Sporn LA. Photosensitized release of von Willebrand factor from cultured human endothelial cells. *Cancer Res* 1991;51:3261-6.
208. Zilberstein J, Schreiber S, Bloemers MC, Bendel P, Neeman M, Schechtman E, et al. Antivascular treatment of solid melanoma tumors with bacteriochlorophyll-serine-based photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001;73:257-66.
209. McMahon KS, Wieman TJ, Moore PH, Fingar VH. Effects of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 on vessel constriction, vessel leakage, and tumor response. *Cancer Res* 1994;54:5374-9.
210. Leveckis J, Brown NJ, Reed MW. The effect of aminolaevulinic acid-induced, protoporphyrin IX-mediated photodynamic therapy on the cremaster muscle microcirculation in vivo. *Br J Cancer* 1995;72:1113-9.
211. Gibson SL, VanDerMeid KR, Murant RS, Raubertas RF, Hilf R. Effects of various photoradiation regimens on the antitumor efficacy of photodynamic therapy for R3230AC mammary carcinomas. *Cancer Res* 1990;50:7236-41.
212. Korbelik M, Sun J, Zeng H. Ischaemia-reperfusion injury in photodynamic therapy-treated mouse tumours. *Br J Cancer* 2003;88:760-6.
213. Sun J, Cecic I, Parkins CS, Korbelik M. Neutrophils as inflammatory and immune effectors in photodynamic therapy-treated mouse SCCVII tumours. *Photochem Photobiol Sci* 2002;1:690-5.

214. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* 1992;55:145-57.
215. Fingar VH, Kik PK, Haydon PS, Cerrito PB, Tseng M, Abang E, et al. Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD). *Br J Cancer* 1999;79:1702-8.
216. Tremblay A, Leroy S, Freitag L, Copin MC, Brun PH, Marquette CH. Endobronchial phototoxicity of WST 09 (Tookad), a new fast-acting photosensitizer for photodynamic therapy: preclinical study in the pig. *Photochem Photobiol* 2003;78:124-30.
217. Chen B, Roskams T, de Witte PA. Antivascular tumor eradication by hypericin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2002;76:509-13.
218. Essex RW, Qureshi SH, Cain MS, Harper CA, Guymer RH. Photodynamic therapy in practice: a review of the results of the first 12 months experience with verteporfin at the Royal Victorian Eye and Ear Hospital. *Clin Experiment Ophthalmol* 2003;31:476-81.
219. van der Veen N, Hebeda KM, de Bruijn HS, Star WM. Photodynamic effectiveness and vasoconstriction in hairless mouse skin after topical 5-aminolevulinic acid and single- or two-fold illumination. *Photochem Photobiol* 1999;70:921-9.
220. Herman S, Kalechman Y, Gafter U, Sredni B, Malik Z. Photofrin II induces cytokine secretion by mouse spleen cells and human peripheral mononuclear cells. *Immunopharmacology* 1996;31:195-204.
221. Gollnick SO, Evans SS, Baumann H, Owczarczak B, Maier P, Vaughan L, et al. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer* 2003;88:1772-9.
222. Blank M, Lavie G, Mandel M, Keisari Y. Effects of photodynamic therapy with hypericin in mice bearing highly invasive solid tumors. *Oncol Res* 2000;12:409-18.

223. de Vree WJ, Fontijne-Dorsman AN, Koster JF, Sluiter W. Photodynamic treatment of human endothelial cells promotes the adherence of neutrophils in vitro. *Br J Cancer* 1996;73:1335-40.
224. Henderson BW, Donovan JM. Release of prostaglandin E2 from cells by photodynamic treatment in vitro. *Cancer Res* 1989;49:6896-900.
225. Yamamoto H, Ngwennya BZ. Activation of mouse peritoneal macrophages by lysophospholipids and ether derivatives of neutral lipids and phospholipids. *Cancer Res* 1987;56:5647-52.
226. van Duijnhoven FH, Aalbers RI, Rovers JP, Terpstra OT, Kuppen PJ. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review. *Immunobiology* 2003;207:105-13.
227. Korbelik M, Kros G, Olive PL, Chaplin DJ. Distribution of Photofrin between tumour cells and tumour associated macrophages. *Br J Cancer* 1991;64:508-12.
228. Kros G, Korbelik M, Dougherty GJ. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Br J Cancer* 1995;71:549-55.
229. de Vree WJ, Essers MC, Koster JF, Sluiter W. Role of interleukin 1 and granulocyte colony-stimulating factor in photofrin-based photodynamic therapy of rat rhabdomyosarcoma tumors. *Cancer Res* 1997;57:2555-8.
230. Reiter I, Schwamberger G, Krammer B. Activation of macrophage tumoricidal activity by photodynamic treatment in vitro--indirect activation of macrophages by photodynamically killed tumor cells. *J Photochem Photobiol B* 1999;50:99-107.
231. Korbelik M, Cecic I. Contribution of myeloid and lymphoid host cells to the curative outcome of mouse sarcoma treatment by photodynamic therapy. *Cancer Lett* 1999;137:91-8.

232. Abdel-Hady ES, Martin-Hirsch P, Duggan-Keen M, Stern PL, Moore JV, Corbitt G, et al. Immunological and viral factors associated with the response of vulval intraepithelial neoplasia to photodynamic therapy. *Cancer Res* 2001;61:192-6.
233. Gomer CJ, Ferrario A, Murphree AL. The effect of localized porphyrin photodynamic therapy on the induction of tumour metastasis. *Br J Cancer* 1987;56:27-32.
234. van Hillegersberg R, Hekking-Weijma JM, Wilson JH, Edixhoven-Bosdijk A, Kort WJ. Adjuvant intraoperative photodynamic therapy diminishes the rate of local recurrence in a rat mammary tumour model. *Br J Cancer* 1995;71:733-7.
235. Schreiber S, Gross S, Brandis A, Harmelin A, Rosenbach-Belkin V, Scherz A, et al. Local photodynamic therapy (PDT) of rat C6 glioma xenografts with Pd-bacteriopheophorbide leads to decreased metastases and increase of animal cure compared with surgery. *Int J Cancer* 2002;99:279-85.
236. Lightdale CJ, Heier SK, Marcon NE, McCaughan JS, Jr., Gerdes H, Overholt BF, et al. Photodynamic therapy with porfimer sodium versus thermal ablation therapy with Nd:YAG laser for palliation of esophageal cancer: a multicenter randomized trial. *Gastrointest Endosc* 1995;42:507-12.
237. Maier A, Tomaselli F, Gebhard F, Rehak P, Smolle J, Smolle-Juttner FM. Palliation of advanced esophageal carcinoma by photodynamic therapy and irradiation. *Ann Thorac Surg* 2000;69:1006-9.
238. Scheider DM, Siemens M, Cirocco M, Haber GB, Kandel G, Kortan P, et al. Photodynamic therapy for the treatment of tumor ingrowth in expandable esophageal stents. *Endoscopy* 1997;29:271-4.
239. Santiago R, Hahn S, Glatstein E. Clinical applications of photodynamic therapy. In Leibel SA, Phillips TL, eds. *textbook of radiation oncology*. Philadelphia, Saunders, 2004;1625-37.

240. Corti L, Skarlatos J, Boso C, Cardin F, Kosma L, Koukourakis MI, et al. Outcome of patients receiving photodynamic therapy for early esophageal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:419-24.
241. Overholt BF. Evaluating treatments of Barrett's esophagus that shows high-grade dysplasia. *Am J Manag Care* 2000;6:S903-8.
242. Overholt BF, Panjehpour M, Halberg DL. Photodynamic therapy for Barrett's esophagus with dysplasia and/or early stage carcinoma: long-term results. *Gastrointest Endosc* 2003;58:183-8.
243. Maunoury V, Mordon S, Bulois P, Mirabel X, Hecquet B, Mariette C. Photodynamic therapy for early oesophageal cancer. *Dig Liver Dis* 2005;37:491-5.
244. Savary JF, Grosjean P, Monnier P, Fontolliet C, Wagnieres G, Braichotte D, et al. Photodynamic therapy of early squamous cell carcinomas of the esophagus: a review of 31 cases. *Endoscopy* 1998;30:258-65.
245. Moghissi K, Dixon K, Stringer M, Freeman T, Thorpe A, Brown S. The place of bronchoscopic photodynamic therapy in advanced unresectable lung cancer: experience of 100 cases. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;15:1-6.
246. Diaz-Jimenez JP, Martinez-Ballarín JE, Llunell A, Farrero E, Rodriguez A, Castro MJ. Efficacy and safety of photodynamic therapy versus Nd-YAG laser resection in NSCLC with airway obstruction. *Eur Respir J* 1999;14:800-5.
247. Sanfilippo NJ, Hsi A, DeNittis AS, Ginsberg GG, Kochman ML, Friedberg JS, et al. Toxicity of photodynamic therapy after combined external beam radiotherapy and intraluminal brachytherapy for carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Lasers Surg Med* 2001;28:278-81.
248. Furuse K, Fukuoka M, Kato H, Horai T, Kubota K, Kodama N, et al. A prospective phase II study on photodynamic therapy with photofrin II for centrally located early-

- stage lung cancer. The Japan Lung Cancer Photodynamic Therapy Study Group. *J Clin Oncol* 1993;11:1852-7.
249. Kato H, Okunaka T, Shimatani H. Photodynamic therapy for early stage bronchogenic carcinoma. *J Clin Laser Med Surg* 1996;14:235-8.
250. Edell ES, Cortese DA. Photodynamic therapy in the management of early superficial squamous cell carcinoma as an alternative to surgical resection. *Chest* 1992;102:1319-22.
251. Biel MA. Photodynamic therapy and the treatment of head and neck neoplasia. *Laryngoscope* 1998;108:1259-68.
252. Biel MA. Photodynamic therapy in head and neck cancer. *Curr Oncol Rep* 2002;4:87-96.
253. Tong MC, van Hasselt CA, Woo JK. Preliminary results of photodynamic therapy for recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996;253:189-92.
254. Biel MA. Photodynamic therapy and the treatment of head and neck cancers. *J Clin Laser Med Surg* 1996;14:239-44.
255. Kriegmair M, Waidelich R, Lumper W, Ehsan A, Baumgartner R, Hofstetter A. Integral photodynamic treatment of refractory superficial bladder cancer. *J Urol* 1995;154:1339-41.
256. D'Hallewin MA, Baert L. Photodynamic therapy of bladder cancer. In Petrovich Z, Baert L, Brady LW, eds. *Carcinoma of the bladder - Innovations in management*. New York, Springer, 1998;103-12.
257. Nseyo UO, DeHaven J, Dougherty TJ, Potter WR, Merrill DL, Lundahl SL, et al. Photodynamic therapy (PDT) in the treatment of patients with resistant superficial bladder cancer: a long-term experience. *J Clin Laser Med Surg* 1998;16:61-8.

258. Ormrod D, Jarvis B. Topical aminolevulinic acid HCl photodynamic therapy. *Am J Clin Dermatol* 2000;1:133-9; discussion 40-1.
259. Kormeili T, Yamauchi PS, Lowe NJ. Topical photodynamic therapy in clinical dermatology. *Br J Dermatol* 2004;150:1061-9.
260. Lui H, Salasche S, Kollias N, Wimberly J, Flotte T, McLean D, et al. Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical aminolevulinic acid: a clinical and histologic study. *Arch Dermatol* 1995;131:737-8.
261. Ortner MA, Liebetrueth J, Schreiber S, Hanft M, Wruck U, Fusco V, et al. Photodynamic therapy of nonresectable cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 1998;114:536-42.
262. Wiedmann M, Berr F, Schiefke I, Witzigmann H, Kohlhaw K, Mossner J, et al. Photodynamic therapy in patients with non-resectable hilar cholangiocarcinoma: 5-year follow-up of a prospective phase II study. *Gastrointest Endosc* 2004;60:68-75.
263. Wiedmann MW, Caca K. General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications. *Curr Pharm Biotechnol* 2004;5:397-408.
264. Ortner ME, Caca K, Berr F, Liebetrueth J, Mansmann U, Huster D, et al. Successful photodynamic therapy for nonresectable cholangiocarcinoma: a randomized prospective study. *Gastroenterology* 2003;125:1355-63.
265. Cheon YK, Cho YD, Baek SH, Cha SW, Moon JH, Kim YS, et al. Comparison of survival of advanced hilar cholangiocarcinoma after biliary drainage alone versus photodynamic therapy with external drainage. *Korean J Gastroenterol* 2004;44:280-7.
266. Wiedmann M, Caca K, Berr F, Schiefke I, Tannapfel A, Wittekind C, et al. Neoadjuvant photodynamic therapy as a new approach to treating hilar cholangiocarcinoma: a phase II pilot study. *Cancer* 2003;97:2783-90.

267. Evrard S, Keller P, Hajri A, Balboni G, Mendoza-Burgos L, Damge C, et al. Experimental pancreatic cancer in the rat treated by photodynamic therapy. *Br J Surg* 1994;81:1185-9.
268. Chatlani PT, Nuutinen PJ, Toda N, Barr H, MacRobert AJ, Bedwell J, et al. Selective necrosis in hamster pancreatic tumours using photodynamic therapy with phthalocyanine photosensitization. *Br J Surg* 1992;79:786-90.
269. Regula J, Ravi B, Bedwell J, MacRobert AJ, Bown SG. Photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid for experimental pancreatic cancer--prolonged animal survival. *Br J Cancer* 1994;70:248-54.
270. Hajri A, Coffy S, Vallat F, Evrard S, Marescaux J, Aprahamian M. Human pancreatic carcinoma cells are sensitive to photodynamic therapy in vitro and in vivo. *Br J Surg* 1999;86:899-906.
271. Mlkvy P, Messmann H, Pauer M, Stewart JC, Millson CE, MacRobert AJ, et al. Distribution and photodynamic effects of meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) in the pancreas and adjacent tissues in the Syrian golden hamster. *Br J Cancer* 1996;73:1473-9.
272. Bown SG, Rogowska AZ, Whitelaw DE, Lees WR, Lovat LB, Ripley P, et al. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut* 2002;50:549-57.
273. Chan HH, Nishioka NS, Mino M, Lauwers GY, Puricelli WP, Collier KN, et al. EUS-guided photodynamic therapy of the pancreas: a pilot study. *Gastrointest Endosc* 2004;59:95-9.
274. Corti L, Mazzarotto R, Belfontali S, De Luca C, Baiocchi C, Boso C, et al. Gynecologic cancer recurrences and photodynamic therapy: our experience. *J Clin Laser Med Surg* 1995;13:325-8.

275. Pass HI, DeLaney TF, Tochner Z, Smith PE, Temeck BK, Pogrebniak HW, et al. Intrapleural photodynamic therapy: results of a phase I trial. *Ann Surg Oncol* 1994;1:28-37.
276. Pass HI. Photodynamic therapy in thoracic surgery. *Ann Thorac Surg* 2002;73:2012-3.
277. Temeck BK, Pass HI. Esophagopleural fistula: a complication of photodynamic therapy. *South Med J* 1995;88:271-4.
278. Sindelar WF, DeLaney TF, Tochner Z, Thomas GF, Dachoswki LJ, Smith PD, et al. Technique of photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal malignant neoplasms. Phase I study. *Arch Surg* 1991;126:318-24.
279. Hendren SK, Hahn SM, Spitz FR, Bauer TW, Rubin SC, Zhu T, et al. Phase II trial of debulking surgery and photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal tumors. *Ann Surg Oncol* 2001;8:65-71.
280. Kostron H, Obwegeser A, Jakober R. Photodynamic therapy in neurosurgery: a review. *J Photochem Photobiol B* 1996;36:157-68.
281. Muller PJ, Wilson BC. Photodynamic therapy for malignant newly diagnosed supratentorial gliomas. *J Clin Laser Med Surg* 1996;14:263-70.
282. Muller PJ, Wilson BC. Photodynamic therapy for recurrent supratentorial gliomas. *Semin Surg Oncol* 1995;11:346-54.
283. Evrard S, Aprahamian M, Mieke J, Dange C, Sultan R, Marescaux J. Photodynamic therapy in oncological digestive tract surgery. *Presse Med* 1991;20:1892-8.
284. Evrard S, Aprahamian M, Marescaux J. Intra-abdominal photodynamic therapy: from theory to feasibility. *Br J Surg* 1993;80:298-303.

285. Engelmann K, Mack MG, Eichler K, Straub R, Zangos S, Vogl TJ. [Interstitial photodynamic laser therapy for liver metastases: first results of a clinical phase I-study]. *Rofo* 2003;175:682-7.
286. Denys AL, de Baere T, Mahe C, Sabourin JC, Sa Cunha A, Germain S, et al. Radio-frequency tissue ablation of the liver: effects of vascular occlusion on lesion diameter and biliary and portal damages in a pig model. *Eur Radiol* 2001;11:2102-8.
287. Panis Y, Nordlinger B. Experimental models for hepatic metastases from colorectal tumors. *Ann Chir* 1991;45:222-8.
288. Dolmans DE, Kadambi A, Hill JS, Flores KR, Gerber JN, Walker JP, et al. Targeting tumor vasculature and cancer cells in orthotopic breast tumor by fractionated photosensitizer dosing photodynamic therapy. *Cancer Res* 2002;62:4289-94.
289. Maugain E, Coutier S, Bezdetsnaya L, Marchal S, Merlin JL, Didelon J, et al. Fluence rate effects in meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) photosensitized HT29 multicell tumor spheroids. Comparative study with Colo26 spheroids. *Proceedings of SPIE* 2001;4433:148-54.
290. Marchal S, Bezdetsnaya L, Guillemin F. Modality of cell death induced by Foscan-based photodynamic treatment in human colon adenocarcinoma cell line HT29. *Biochemistry (Mosc)* 2004;69:45-9.
291. Moan J, Ma L, Juzeniene A, Iani V, Juzenas P, Apricena F, et al. Pharmacology of protoporphyrin IX in nude mice after application of ALA and ALA esters. *Cancer* 2003;103:132-5.
292. Bourre L, Thibaut S, Briffaud A, Rousset N, Eleouet S, Lajat Y, et al. Indirect detection of photosensitizer ex vivo. *J Photochem Photobiol B* 2002;67:23-31.
293. Glanzmann T, Forrer M, Blant SA, Woodtli A, Grosjean P, Braichotte D, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin in the

- hamster cheek pouch tumor model: comparison with clinical measurements. *J Photochem Photobiol B* 2000;57:22-32.
294. Braichotte D, Savary JF, Glanzmann T, Westermann P, Folli S, Wagnieres G, et al. Clinical pharmacokinetic studies of tetra(meta-hydroxyphenyl)chlorin in squamous cell carcinoma by fluorescence spectroscopy at 2 wavelengths. *Int J Cancer* 1995;63:198-204.
295. Weersink R, Hayward J, Diamond K, Patterson M. Accuracy of noninvasive in vivo measurements of photosensitizer uptake based on a diffusion model of reflectance spectroscopy. *Photochem Photobiol* 1997;66:326-35.
296. Chalau V, Didelon J, Istomin JP, Samtsov E, Voropay E, Wolf D, et al. In vivo cancer diagnostics by space-resolved diffuse reflectance spectroscopy. *Diagnostic optical spectroscopy in biomedicine II* 2003;5141:333-40.
297. Jansen MC, van Duijnhoven FH, van Hillegersberg R, Rijken A, van Coevorden F, van der Sijp J, et al. Adverse effects of radiofrequency ablation of liver tumours in the Netherlands. *Br J Surg* 2005;
298. Mulier S, Ni Y, Jamart J, Ruers T, Marchal G, Michel L. Local recurrence after hepatic radiofrequency coagulation: multivariate meta-analysis and review of contributing factors. *Ann Surg* 2005;242:158-71.
299. Bilchik AJ, Wood TF, Allegra DP. Radiofrequency ablation of unresectable hepatic malignancies: lessons learned. *Oncologist* 2001;6:24-33.
300. Stippel DL, Tox U, Gossmann A, Beckurts KT, Holscher AH. Successful treatment of radiofrequency-induced biliary lesions by interventional endoscopic retrograde cholangiography (ERC). *Surg Endosc* 2003;17:1965-70.
301. Elias D, El Otmany A, Goharin A, Attalah D, De Baere T. Intraductal cooling of the main bile ducts during intraoperative radiofrequency ablation. *J Surg Oncol* 2001;76:297-300.

302. Raman SS, Aziz D, Chang X, Ye M, Sayre J, Lassman C, et al. Minimizing central bile duct injury during radiofrequency ablation: use of intraductal chilled saline perfusion--initial observations from a study in pigs. *Radiology* 2004;232:154-9.
303. Jersenius U, Arvirdsson D, Lindholm J, Anttila S, Elvin A. Radiofrequency ablation in the liver close to the bile ducts. Can intraductal cooling offer protection? *Surg Endosc* 2005;19:546-50.
304. Marchal F, Elias D, Rauch P, Leroux A, Stinès J, Verhaeghe JL, et al. Biliary lesions during radiofrequency ablation in liver: study on the pig. *Eur Surg Res* 2004;36:88-94.
305. Stippel DL, Bangard C, Kasper HU, Fischer JH, Holscher AH, Gossmann A. Experimental bile duct protection by intraductal cooling during radiofrequency ablation. *Br J Surg* 2005;92:849-55.
306. Elias D, Sideris L, Pocard M, Dromain C, De Baere T. Intraductal cooling of the main bile ducts during radiofrequency ablation prevents biliary stenosis. *J Am Coll Surg* 2004;198:717-21.
307. Prudhomme M, Rouy S, Tang J, Landgrebe J, Delacrétaç G, Godlewski G. Biliary structures lead to tumour recurrences after laser-induced interstitial thermotherapy. *Lasers Surg Med* 1999;24:269-75.
308. Wood TF, Rose DM, Chung M, Allegra DP, Foshag LJ, Bilchik AJ. Radiofrequency ablation of 231 unresectable hepatic tumors: indications, limitations, and complications. *Ann Surg Oncol* 2000;7:593-600.
309. Ahmed M, Liu Z, Lukyanov AN, Signoretti S, Horkan C, Monsky WL, et al. Combination radiofrequency ablation with intratumoral liposomal doxorubicin: effect on drug accumulation and coagulation in multiple tissues and tumor types in animals. *Radiology* 2005;235:469-77.

310. Ahmed M, Lobo SM, Weinstein J, Kruskal JB, Gazelle GS, Halpern EF, et al. Improved coagulation with saline solution pretreatment during radiofrequency tumor ablation in a canine model. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13:717-24.
311. Ahmed M, Monsky WE, Girnun G, Lukyanov A, D'Ippolito G, Kruskal JB, et al. Radiofrequency thermal ablation sharply increases intratumoral liposomal doxorubicin accumulation and tumor coagulation. *Cancer Res* 2003;63:6327-33.
312. Goldberg SN, Kamel IR, Kruskal JB, Reynolds K, Monsky WL, Stuart KE, et al. Radiofrequency ablation of hepatic tumors: increased tumor destruction with adjuvant liposomal doxorubicin therapy. *AJR Am J Roentgenol* 2002;179:93-101.
313. Monsky WL, Kruskal JB, Lukyanov A, Girnun GD, Ahmed M, Gazelle GS, et al. Radio-frequency ablation increases intratumoral liposomal doxorubicin accumulation in a rat breast tumor model. *Radiology* 2002;224:823-9.
314. Kelleher DK, Bastian J, Thews O, Vaupel P. Enhanced effects of aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy through local hyperthermia in rat tumours. *Br J Cancer* 2003;89:405-11.
315. Kelleher DK, Thews O, Scherz A, Salomon Y, Vaupel P. Combined hyperthermia and chlorophyll-based photodynamic therapy: tumour growth and metabolic microenvironment. *Br J Cancer* 2003;89:2333-9.
316. Frank J, Lambert C, Biesalski HK, Thews O, Vaupel P, Kelleher DK. Intensified oxidative and nitrosative stress following combined ALA-based photodynamic therapy and local hyperthermia in rat tumors. *Int J Cancer* 2003;107:941-8.
317. Yanase S, Nomura J, Matsumura Y, Nagai K, Kinoshita M, Nakanishi H, et al. Enhancement of the effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy by simultaneous hyperthermia. *Int J Oncol* 2005;27:193-201.
318. Bonnett R, Djelal BD, Hamilton PA, Martinez G, Wierrani F. Photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl) porphyrin (m-THPP) and the corresponding

- chlorin (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). A comparative study. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1999;53:136-43.
319. Rovers JP, Saarnak AE, de Jode M, Sterenborg HJ, Terpstra OT, Grahn MF. Biodistribution and bioactivity of tetra-pegylated meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin compared to native meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in a rat liver tumor model. *Photochem Photobiol* 2000;71:211-7.
320. Maugain E, Sasnouski S, Zorin V, Merlin JL, Guillemin F, Bezdetnaya L. Foscan-based photodynamic treatment in vivo: correlation between efficacy and Foscan accumulation in tumor, plasma and leukocytes. *Oncol Rep* 2004;12:639-45.
321. van Duijnhoven FH, Rovers JP, Engelmann K, Krajina Z, Purkiss SF, Zoetmulder FA, et al. Photodynamic Therapy With 5,10,15,20-Tetrakis(m-Hydroxyphenyl) Bacteriochlorin for Colorectal Liver Metastases Is Safe and Feasible: Results From a Phase I Study. *Ann Surg Oncol* 2005;
322. Cramers P, Ruevekamp M, Oppelaar H, Dalesio O, Baas P, Stewart FA. Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy. *Br J Cancer* 2003;88:283-90.
323. Veenhuizen R, Oppelaar H, Ruevekamp M, Schellens J, Dalesio O, Stewart F. Does tumour uptake of Foscan determine PDT efficacy? *Int J Cancer* 1997;73:236-9.
324. Dolmans DE, Kadambi A, Hill JS, Flores KR, Gerber JN, Walker JP, et al. Targeting tumor vasculature and cancer cells in orthotopic breast tumor by fractionated photosensitizer dosing photodynamic therapy. *Cancer Res* 2002;62:4289-94.
325. West CM, West DC, Kumar S, Moore JV. A comparison of the sensitivity to photodynamic treatment of endothelial and tumour cells in different proliferative states. *Int J Radiat Biol* 1990;58:145-56.
326. Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol* 2002;29:3-9.

327. Del Governatore M, Hamblin MR, Shea CR, Rizvi I, Molpus KG, Tanabe KK, et al. Experimental photoimmunotherapy of hepatic metastases of colorectal cancer with a 17.1A chlorin(e6) immunoconjugate. *Cancer Res* 2000;60:4200-5.
328. Chen Q, Chen H, Shapiro H, Hetzel FW. Sequencing of combined hyperthermia and photodynamic therapy. *Radiat Res* 1996;146:293-7.
329. Chen B, Xu Y, Agostinis P, De Witte PA. Synergistic effect of photodynamic therapy with hypericin in combination with hyperthermia on loss of clonogenicity of RIF-1 cells. *Int J Oncol* 2001;18:1279-85.

ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	acide arachidonique
ACE	antigène carcino-embryonnaire
ADN	acide desoxyribonucléique
AFC	Association Française de Chirurgie
ALA	acide delta-aminolevulinique
AlPc	aluminium phtalocyanin
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
APAF-1	<i>apoptosis activating factor</i>
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BPD	benzoporphyrine dérivée
BPD-MA	<i>benzoporphyrin derivative monoacid ring A</i>
°C	degré celsius
CCR	cancer colorectal
CE	Communauté Européenne
Cm	centimètre
COX	cyclooxygénase
CPA	cellule présentatrice de l'antigène
DHE	<i>dihematoporphyrin ether/ester</i>
DO	densité optique
EORTC	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
EPO	érythropoïétine
ESS	<i>Elastic Scattering Spectroscopy</i>
FDA	Federal Drug Administration
FFCD	Fédération Française de Cancérologie Digestive
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
H&E	hématoxyline et éosine
Hp	hématoporphyrine
HpD	hématoporphyrine dérivée
HSP	<i>heat shock protein</i>
IDL	intervalle drogue-lumière
IL	interleukine
IR	infrarouge
IRM	imagerie par résonance magnétique
J	Joule
KHz	kiloherzt
LED	<i>light emitting diode</i>
LIFS	<i>Light Induced Fluorescence Spectroscopy</i>
m-THPBC	5,10,15,20-tetrakis (<i>m</i> -hydroxyphenyl)bacteriochlorine
m-THPC	5,10,15,20-tetrakis (<i>m</i> -hydroxyphenyl)chlorine
m-THPP	5,10,15,20-tetrakis (<i>m</i> -hydroxyphenyl)porphyrine
MH	métastase hépatique

mm	millimètre
NADH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
Nd YAG	<i>neodymium yttrium-aluminium-garnet</i>
$^1\text{O}_2$	oxygène singulet
PDT	thérapie photodynamique
PET	<i>positron emission tomography</i>
PGI_2	prostaglandine I ₂
PH	photohème
PMN	polymorphonucléaires
pO_2	pression partielle en oxygène
Pp	protoporphyrine
PS	photosensibilisant
RF	radiofréquence
SOD	superoxyde dismutase
TDM	tomodensitométrie
$\text{TNF}\alpha$	<i>tumor necrosis factor α</i>
T_x	thromboxane
UV	ultraviolet
UVB	ultraviolet B
VEGF	<i>vascular endothelium growth factor</i>
$\lambda_{\text{ex/em}}$	longueur d'onde d'excitation/émission
Φ_{Δ}	rendement quantique en oxygène singulet

***PUBLICATIONS :**

Biliary lesions during radiofrequency ablation in liver. Study on the pig

F. Marchal, D. Elias, P. Rauch, A. Leroux, J. Stinès, JL. Verhaeghe, F. Guillemin, JP. Villemot

European Surgical Research 2004 ;36 :88-94

Prevention of biliary lesions that may occur during radiofrequency ablation of the liver: a study on the pig

Marchal F, Elias D, Rauch, P, Zarnegar R, Leroux A, Stines J, Verhaeghe JL, Guillemin F, Carteaux JP, Villemot JP

Accepted for publication in Annals of Surgery

Development of a HT29 liver metastases model in rats nude

Marchal F, Tran N, Marchal S, Leroux A, Marchal C, Bolotine L, Guillemin F, Villemot JP

Oncology Reports 2005;14:1203-1207

***PRÉSENTATIONS ORALES :**

Intérêt du refroidissement des voies biliaires pendant la thermoablation: étude chez le cochon.

F. Marchal

104^{ème} Congrès Français de Chirurgie 5 Octobre 2002, Paris

Pharmacocinétique de la *m*THPBC dans le foie sain et tumoral du rat

F. Marchal

Journée Thérapie photodynamique Vandoeuvre les Nancy 6 Mars 2004

Pharmacocinétique de la *m*THPBC dans le foie sain et tumoral du rat

F. Marchal, S. Marchal, V. Chalau, L. Bolotine, F. Guillemin

Réunion annuelle du thème IPS du CRAN 17 Juin 2004 Institut National de Polytechnique de Lorraine Vandoeuvre les Nancy, 2004

***POSTERS:**

Prévention des complications biliaires lors de l'ablathermie par radiofréquence par refroidissement des voies biliaires intrahépatiques : étude expérimentale chez le porc.

F. Marchal, D. Elias, JL. Verhaeghe, Ph. Rauch, A. Leroux, Ph. Troufléau, F. Guillemin, JP. Villemot.

XXIIème forum de Cancérologie 4-6 Juin 2002 Eurocancer 2002 Paris 1^{er} Prix de Chirurgie.

Prevention of bile ducts injuries during intraoperative radiofrequency ablation by intraductal cooling of the main bile ducts with cold 5 % glucose serum : experimental study in a porcine model.

F. Marchal, D. Elias, Ph. Rauch, A. Leroux, J. Stinès, F. Guillemin, JP. Villemot.

Symposium on Gastrointestinal, Liver and Pancreatic Cancer. EORTC 6-8 Juin 2002 Venise.

Development of a HT29 liver metastases model in rats nude

F. Marchal, N. Tran, S. Marchal, A. Leroux, C. Marchal, L. Bolotine, F. Guillemin, JP. Villemot.

XXVème forum de Cancérologie 21-23 Juin 2005 Eurocancer Paris 2005.

In vivo measurement of *m*THPBC pharmacokinetic by using Elastic Scattering Spectroscopy (ESS) in an improved xenografted athymic rat model with hepatic metastasis of human colon adenocarcinoma

F. Marchal, V. Chalau, S. Marchal, L. Bolotine, F. Guillemin

The 11th European Society for Photobiology Congress 3 – 8 Septembre 2005 Aix-les-Bains