



**HAL**  
open science

# Amélioration de la préservation du pancréas lors de l'ischémie froide pour l'optimisation de la transplantation d'îlots pancréatiques

Florent Lemaire

## ► To cite this version:

Florent Lemaire. Amélioration de la préservation du pancréas lors de l'ischémie froide pour l'optimisation de la transplantation d'îlots pancréatiques. Endocrinologie et métabolisme. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ037 . tel-02415773

**HAL Id: tel-02415773**

**<https://theses.hal.science/tel-02415773>**

Submitted on 17 Dec 2019

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

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

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE  
Centre Européen d'Étude du Diabète

## Thèse

---

Présentée pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG  
Discipline : Sciences de la vie et de la Santé  
Spécialité : Aspect Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

# Amélioration de la préservation du pancréas lors de l'ischémie froide pour l'optimisation de la transplantation d'îlots pancréatiques

Par Florent Lemaire

Soutenue publiquement le 20/09/2019 devant le jury composé de :

Dr. MAILLARD Elisa	Strasbourg	Directrice de thèse
Pr. HAUET Thierry	Poitiers	Rapporteur externe
Pr. BENHAMOU Pierre-Yves	Grenoble	Rapporteur externe
Pr. GENY Bernard	Strasbourg	Examineur interne
Pr. PINGET Michel	Strasbourg	Invité
Dr. SIGRIST Séverine	Strasbourg	Invitée



# Remerciements

---

En premier lieu, j'aimerais remercier le Pr. Michel Pinget de m'avoir accueilli au CEED où j'ai passé plus de trois années très enrichissantes. C'est également grâce à vous et Dominique que j'ai découvert les joies de la moto suite à une journée organisée par l'antenne du CEED dans le Pas-de-Calais.

Un grand merci au Dr. Elisa Maillard-Pedracini, ma directrice de thèse. Un simple merci ne semble pas suffire pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ces trois ans et demi. Ton soutien sans faille et ton optimisme m'ont aidé à grandir au sein du laboratoire. J'ai tant appris au niveau scientifique qu'au niveau humain avec toi. Je suis réellement fier d'avoir pu travailler à tes côtés. Je sais que mon côté pessimiste a pu t'énerver par moment, toi qui es à l'exact opposé à toujours voir le bon côté des choses. Un jour tu m'as dit que lors d'une relation entre un directeur de thèse et son étudiant, les deux parties doivent s'adapter à la personnalité de l'autre et c'est que tu as fait formidablement bien avec les trois thésards que tu as eu à diriger. J'espère moi aussi avoir été à la hauteur.

Merci au Dr. Séverine Sigrist. Je suis arrivé au CEED dans une période où tu quittais petit à petit ton poste de directrice de laboratoire pour devenir présidente de Defymed. Malgré tout, c'est toujours avec plaisir que tu acceptais d'évaluer notre travail et je t'en remercie.

Je remercie vivement les membres du jury, le Professeur Bernard Geny (service de physiologie et d'explorations fonctionnelles des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg et Directeur-adjoint EA 3072 "Mitochondrie, Stress oxydant et Protection musculaire"); le Professeur Pierre-Yves Benhamou (service d'endocrinologie-diabétologie - maladies de la nutrition - INSERM, U1055 Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, Université de Grenoble); le Professeur Thierry Hauet (Directeur de l'IRTOMIT U1082 INSERM, Service de Biochimie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Poitiers), d'avoir accepté de siéger au jury et d'évaluer ce travail de thèse.

Merci également au Dr. Karim Bouzakri. On n'a pas travaillé directement tous les deux, mais j'apprécie réellement le fait que tu me fasses confiance en me

recommandant auprès de laboratoires que tu connais pour un éventuel postdoctorat aux Etats-Unis.

Julien Cherfan à ton tour. C'est toujours gênant de se dire des choses comme ça entre hommes donc l'écrire sera certainement plus simple (si tu insistes je te le dirai de vive voix). Je suis tellement content d'avoir eu un collègue thésard comme toi ! Le courant est tout de suite passé et ça a été trois années géniales de chirurgie malsaine, de blagues tout aussi malsaines, de partage (et de science aussi parfois). Il paraît que l'amour dure trois ans donc quelque part la boucle est bouclée avec toi qui te dirige vers la science viking et moi vers la science américaine. Cette thèse aurait eu un goût différent si tu n'avais pas été là donc merci !

Qui dit Julien, dit aussi Arnaud ! Merci pour tous ces repas partagés où j'ai appris des choses autant sur les cartes Magic (j'espère juste que mon placement se porte bien) que sur le problème des pistes cyclables à Haute-pierre. J'ai enfin ouvert les yeux sur ce problème grâce à toi !

Passons à une autre personne inspirante du labo et même du CEED dans son ensemble : M. Claude Peronet. Merci mille fois pour l'aide que tu m'as apporté à l'animalerie. Quand on aura à rendre des comptes à quelqu'un là-haut sur tout ce qu'on a fait à ces petites bêtes, je prendrai mes responsabilités à tes côtés t'inquiète pas ! Tu es quelque part le papa de ce labo et on a une grande chance de t'avoir toi et ta bonne humeur communicative. Mon seul regret sera de ne pas avoir eu la possibilité de faire un tour en bécane avec toi. Surtout n'oublie pas de martyriser la JEUNESSE DORÉE qui va nous remplacer, mais je ne me fais pas trop de soucis pour ça.

A l'inverse, le labo dispose aussi de sa maman avec Harzo ! Vous êtes un peu pareil avec Claude finalement, toujours prêts à filer un coup de main, à faire mille détours pour nous déposer pile devant là où on doit aller comme une mère le ferait avec ses enfants. (Je ne sais pas s'il y a un lien entre le papa et la maman du labo, mais dans tous les cas je ne préfère pas savoir, merci par avance).

Merci à Cyn, la super tech' ! Tu as grandement participé à l'avancée de ces travaux et merci pour ça. Ta bonne humeur et ta grande gueule vont me manquer. Ça a été un plaisir de te rencontrer et de bosser (entre autres) avec toi. Tu m'as promis de

venir me voir peu importe sur quel continent où je vais atterrir et je ne compte pas oublier ces paroles Sook !

Merci à Ophélie pour tes éclats de rire et ton caractère ('mais euh ça veut dire quoi ça ?!'). Pareil que Claude, déçu de ne pas avoir pu te faire mordre la poussière sur la route !

Merci à Carole, une autre super tech' !. J'aurais aimé partager mes transplantations avec toi également. Tu as juste eu le temps de me transmettre une partie de ton savoir et c'est déjà énorme !

Merci à William pour ton aide chirurgicale, je me souviendrai longtemps de cet arrêt sur une aire d'autoroute afin de découper du pancréas de porc à côté d'une enfant de 5 ans qui doit encore en faire des cauchemars. Merci à Allan pour ta bonne humeur, entre les séminaires et le partage de chambre à Oxford je me serais bien marré !

Ensuite je voudrais remercier tous les membres du bureau thésard qui sont passés et partis, qui sont partis mais reviennent, qui restent encore un peu. Merci à Élodie et Anaïs, nos deux thésardes modèles. C'était vraiment super de se faire engueuler à longueur de journée ! On croyait être tranquille après ton départ Élodie au niveau des cris mais ta disciple Aurélie a carrément bien appris de toi et j'ai l'impression que l'élève a même dépassé le maître. Aurélie, toi aussi tu as décidé de partir pour l'Amérique ! Je compte sur toi pour ce week-end à New-York quand on sera tous les deux installés outre-Atlantique. Laura et Guillaume, c'était un plaisir de vous connaître et de vous taquiner sans relâche ! Merci à François (La braise) pour tes blagues pas toujours très catho et pour tes compétences Word incroyables. Gracias María por tu ayuda y tu valioso consejo como doctora (traduction google donc c'est peut-être pourri). Merci à Dr. Neidl, le pourvoyeur de fonds. Merci à Nico, la force tranquille du western.

Merci à Clara, Juliette, Mélodie, Mandy et Inoulia qui m'ont bien aidé dans la réalisation de ces travaux. Merci également aux autres stagiaires avec qui je n'ai pas travaillé directement mais qui ont quand même marqué la vie du labo : Muss, Pauline, cousin Jérèm, Magalie, Garance, Mélissa...

Merci à M. Seyller pour toutes les astuces informatiques et surtout pour cette superbe victoire du quizz au séminaire 2017. Merci à Carine, Claire, Coline, Anastasia, Fotini et Estelle d'être toujours prêtes à aider un pauvre thésard en détresse !

Merci à la team Defymed ! Y en a pas un plus fou que l'autre, ce que vous faites est beau continuez comme ça !

Merci aux copains Martin, Sirine, Valou, Anaïs, Gauthier, Bastien, Jacquot, Mehdi, Lucie d'être ce que vous êtes, merci pour ces sorties, soirées, vacances, festivals et autres apéros et à tous ceux qui arrivent !

Merci également à Camille pour m'avoir supporté lors de ces années de transition fin d'étude/vie active. Mon dos te remercie également, c'était trop de souffrance pour lui que de côtoyer ton mètre 60 ! (Je suis ravi d'avoir partagé ces quelques années de ma vie avec toi).

Merci à ma sœurette de ton soutien, je te le dis jamais par pudeur mais sache que je suis fier de toi ! Je sais que ça t'embête que je parte à l'étranger mais ça te permettra de venir passer de super vacances !

Enfin et probablement le merci le plus important, merci à mes deux parents sans qui je ne serai évidemment jamais arrivé là. Vous avez été et êtes encore des parents parfaits.

## TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures .....	I
Liste des tableaux .....	III
Liste des abréviations .....	IV
1. Introduction générale .....	1
1.1. Le métabolisme énergétique .....	1
1.1.1. La digestion .....	1
1.1.2. Utilisation du glucose .....	2
1.1.3. Régulation de la glycémie .....	3
1.1.3.1. Le pancréas.....	3
1.1.3.1.1. Fonction exocrine .....	3
1.1.3.1.2. Fonction endocrine.....	4
1.1.3.1.3. Les cellules $\beta$ : insuline et amyline .....	5
1.1.3.1.3.1. L'insuline .....	5
1.1.3.1.3.2. Biosynthèse .....	5
1.1.3.1.3.3. L'amyline .....	6
1.1.3.1.4. Les cellules $\alpha$ : glucagon.....	6
1.1.3.1.5. Les cellules $\delta$ : somatostatine.....	6
1.1.3.1.6. Les cellules $\epsilon$ : ghréline .....	7
1.1.3.1.7. Les cellules à polypeptides pancréatiques (PP).....	7
1.1.3.2. Sécrétion d'insuline par les cellules $\beta$ .....	7
1.1.3.3. Mode action de l'insuline.....	9
1.1.3.4. Sécrétion de glucagon par les cellules $\alpha$ .....	10
1.1.3.5. Mode d'action du glucagon .....	11
1.2. Le diabète .....	12
1.2.1. Le diabète de type 1 .....	13
1.2.1.1. Causes .....	13
1.2.1.1.1. Facteurs génétiques.....	13
1.2.1.1.2. L'auto-immunité.....	14
1.2.1.2. Conséquences .....	14
1.2.2. Les traitements du diabète de type 1 .....	15
1.2.2.1. L'insulinothérapie .....	15
1.2.2.2. Les différents types d'insuline .....	16
1.2.2.3. Les modes d'administration .....	16
1.2.3. Les complications liées au diabète .....	18



1.2.3.1.	Les complications aiguës .....	19
1.2.3.1.1.	L'acidocétose .....	19
1.2.3.1.2.	L'hypoglycémie.....	19
1.2.3.2.	Les complications chroniques .....	19
1.2.3.2.1.	Les micro-angiopathies .....	19
1.2.3.2.2.	Les macro-angiopathies.....	20
1.2.3.3.	Les diabétiques de type 1 extrêmes .....	20
1.2.4.	La transplantation de pancréas.....	22
1.2.4.1.	Historique .....	22
1.2.4.2.	Technique chirurgicale .....	22
1.2.4.3.	Sélection des donneurs et receveurs .....	23
1.2.4.4.	Résultats cliniques .....	24
1.2.4.5.	Complications.....	24
1.2.5.	La transplantation d'îlots .....	25
1.2.5.1.	Historique .....	25
1.2.5.2.	Sélection du donneur et du receveur .....	26
1.2.5.3.	Isolement des îlots .....	26
1.2.5.4.	Immunosuppression.....	28
1.2.5.5.	Résultats cliniques .....	28
1.2.5.6.	Complications.....	29
1.2.5.7.	Problèmes de la pénurie d'organes et des dons d'organe.....	29
1.2.5.8.	Problèmes liés à la préservation du pancréas .....	31
1.2.5.9.	Limites de la transplantation d'îlots.....	32
1.3.	Les mécanismes d'ischémie-reperfusion.....	33
1.3.1.	La phase d'ischémie froide .....	34
1.3.1.1.	Ralentissement des réactions chimiques.....	34
1.3.1.2.	Le métabolisme anaérobie.....	35
1.3.1.3.	Le statut ionique .....	38
1.3.1.4.	Dysfonction mitochondriale.....	39
1.3.1.4.1.	Le stress oxydant .....	39
1.3.1.4.2.	Production de radicaux libres par les mitochondries.....	40
1.3.1.4.3.	Défenses antioxydantes .....	41
1.3.1.5.	Les voies de signalisation cellulaire.....	42
1.3.1.5.1.	La voie de l'hypoxie.....	42
1.3.1.5.1.1.1.	Effet bénéfique de HIF... ..	42
1.3.1.5.1.1.2.	...ou délétère ?.....	43

1.3.1.5.2. Les protéines kinases .....	44
1.3.1.5.2.1.1. La voie PI3K/AKT .....	45
1.3.1.5.2.1.2. Les MAPK .....	46
1.3.1.5.2.1.3. Les voies de réponse au stress cellulaire .....	46
1.3.1.5.2.1.4. La voie de survie ERK .....	47
1.3.1.6. La mort cellulaire .....	48
1.3.1.6.1. La nécrose.....	48
1.3.1.6.2. L'apoptose .....	49
1.3.2. Sensibilité des îlots à l'hypoxie .....	51
1.3.3. La phase de reperfusion.....	53
1.4. Méthodes de préservation des organes .....	55
1.4.1. Les solutions de préservation .....	56
1.4.2. Historique des solutions de préservation .....	56
1.4.2.1. L'UW : un tournant dans la préservation d'organes... ..	57
1.4.2.2. ...Mais qui reste perfectible .....	57
1.4.3. Préservation du pancréas .....	58
1.5. Stratégies d'amélioration de la qualité du pancréas .....	59
1.5.1. Le préconditionnement à l'ischémie.....	60
1.5.1.1. Le préconditionnement direct à l'ischémie .....	60
1.5.1.2. Le préconditionnement à distance à l'ischémie.....	61
1.5.1.3. Le préconditionnement à distance à l'ischémie et non invasif .....	63
1.5.1.4. Effet d'un préconditionnement sur les îlots.....	64
1.5.2. L'oxygénation du greffon lors de l'ischémie froide.....	65
1.5.2.1. La « two-layer method ».....	66
1.5.2.2. La persufflation .....	66
1.5.2.3. Les machines de perfusion .....	67
1.5.2.4. Les hémoglobines .....	67
2. Objectifs.....	73
3. Matériels et méthodes .....	75
3.1. Pancréas et îlots humains .....	75
3.2. Éthique et animaux.....	75
3.3. Préconditionnement à l'ischémie à distance et non invasif .....	75
3.4. Préservation du pancréas.....	76
3.4.1. Solutions de préservation.....	76
3.4.2. Préservation du pancréas de rat .....	77
3.4.2.1. Cinétique d'ischémie froide sur le pancréas de rat .....	77

3.4.2.2.	Préservation du pancréas de rat avec M101 .....	78
3.4.2.2.1.	Effet de M101 sur le pancréas .....	78
3.4.2.3.	Effet de M101 sur les îlots .....	79
3.4.3.	Préservation du pancréas humain .....	79
3.4.3.1.	Cinétique d'ischémie froide sur le pancréas humain.....	79
3.4.3.2.	Préservation du pancréas humain avec M101 .....	80
3.5.	Digestion enzymatique du pancréas de rat.....	82
3.6.	Prélèvement de pancréas et isolement d'îlots de rat .....	82
3.6.1.	Prélèvement du pancréas .....	82
3.6.2.	Isolement des îlots.....	82
3.6.2.1.	Viabilité des îlots .....	83
3.6.2.2.	Fonctionnalité des îlots .....	84
3.6.2.3.	Comptage des îlots .....	84
3.7.	Prélèvement de pancréas et isolement des îlots humains .....	85
3.8.	Culture d'îlots humain avec M101 .....	85
3.9.	Extraction des protéines du pancréas et des îlots .....	86
3.9.1.	Western Blot .....	86
3.9.2.	Mesure du métabolisme mitochondrial .....	87
3.9.3.	Mesure de l'hypoxie .....	88
3.9.4.	Mesure des défenses antioxydantes .....	88
3.9.5.	Mesure des MAPK.....	88
3.9.6.	Mesure de la kinase AKT .....	88
3.9.7.	Mesure de la mort cellulaire .....	88
3.9.7.1.	Mesure de la nécrose.....	88
3.9.7.2.	Mesure de l'apoptose.....	89
3.10.	Extraction des métabolites du pancréas.....	89
3.11.	Analyses histologiques.....	89
3.11.1.	Mesure des radicaux libres .....	89
3.11.2.	Immunomarquages.....	90
3.12.	Statistiques .....	90
4.	Résultats.....	91
4.1.	Effet de l'ischémie froide et de la digestion sur le pancréas et les îlots .....	91
4.1.1.	Effet de l'ischémie froide .....	91
4.1.1.1.	Effet de deux solutions (UW et HBSS) sur le rendement en îlots .....	91
4.1.1.2.	Effet de l'ischémie froide sur le pancréas humain .....	92
4.1.1.3.	Effet de l'ischémie froide sur les îlots humains .....	94

4.1.1.4.	Effet de l'ischémie froide sur le pancréas de rat .....	94
4.1.1.4.1.	Etude des marqueurs observés chez l'Homme.....	94
4.1.1.4.2.	Effet de l'ischémie sur le métabolisme .....	96
4.1.1.5.	Effet de l'ischémie froide sur les îlots .....	98
4.1.2.	Effet de la digestion du pancréas.....	99
4.1.3.	Discussion .....	102
4.1.4.	Conclusion sur l'impact de l'ischémie .....	105
4.2.	Préconditionnement du pancréas à distance à l'ischémie.....	106
4.2.1.	Impact d'un préconditionnement de 3*5min à l'ischémie sur le pancréas de rat	106
4.2.1.1.	Impact sur les défenses antioxydantes .....	106
4.2.1.2.	Impact sur les voies de survie du pancréas .....	107
4.2.1.3.	Impact sur l'apoptose et inflammation .....	108
4.2.2.	Impact d'un préconditionnement de 3*5 min sur les îlots de rat .....	109
4.2.3.	Impact d'un préconditionnement de 3*10min sur les îlots de rat .....	111
4.2.4.	Discussion .....	112
4.3.	Conditionnement du pancréas lors de l'ischémie froide via un transporteur	
	d'oxygène.....	116
4.3.1.	Validation de l'effet bénéfique du transporteur d'oxygène sur des îlots de rat et	
	humains en condition hypoxique .....	116
4.3.1.1.	Effet de M101 lors de la culture d'îlots humains en confinement.....	116
4.3.2.	Validation de l'effet de M101 lors de la préservation à 4°C du pancréas de rat	
	118	
4.3.2.1.	Effet de M101 sur le pancréas lors d'une cinétique d'ischémie.....	118
4.3.2.2.	Effet de M101 sur le pancréas après 6h d'ischémie .....	120
4.3.2.3.	Effet de M101 injecté dans le pancréas et dans la solution de préservation	
	sur les îlots de rat .....	121
4.3.2.4.	Utilisation de M101 pour la préservation de pancréas humain.....	124
4.3.3.	Discussion .....	127
4.3.3.1.	Validation de la molécule sur les îlots humains.....	127
4.3.3.2.	Préservation de pancréas de rat et humains.....	129
5.	Conclusions.....	133
6.	Perspectives.....	135
7.	Ouvertures.....	137
8.	Références.....	139
9.	Publications .....	156
9.1.	Publication acceptée.....	156

9.2. Publications en préparation .....	156
10. Résumés publiés.....	157
11. Conférences et congrès.....	158
11.1. Communications orales.....	158
11.2. Communications affichées.....	158
12. Annexes.....	159

# Liste des figures

---

Figure 1 : Le pancréas .....	2
Figure 2 : Représentation schématique de l'architecture d'un îlot pancréatique humain [14] ..	5
Figure 3 : Sécrétion d'insuline par les cellules $\beta$ .....	9
Figure 4 : Progression du diabète de type 1 .....	13
Figure 5 : Auto-immunité dans le développement du diabète de type 1 [55].....	15
Figure 6 : Différentes alternatives pour l'administration d'insuline .....	17
Figure 7 : Causes et conséquences du diabète [65]. .....	18
Figure 8 : Étapes de la transplantation d'îlots.....	27
Figure 9 : Résultats cliniques de la transplantation .....	29
Figure 10 : Campagne de sensibilisation française au don d'organes .....	31
Figure 11 : Processus de dégradation de l'ATP en ischémie [135].....	36
Figure 12 : Schéma de la production d'ATP lors de la glycolyse anaérobie .....	37
Figure 13 : Modification du gradient ionique de cellules cardiaques en ischémie.....	38
Figure 14 : Cascade de production de radicaux libres [151].....	40
Figure 15 : Voies de régulation du facteur de transcription HIF .....	44
Figure 16 : Conséquences de l'activation de la kinase AKT [176].....	45
Figure 17 : Rôle central de la MAPK p38 dans l'inflammation et l'apoptose .....	47
Figure 18 : Causes de libération de l'HMGB1 [190].....	49
Figure 19 : Schéma simplifié des voies d'apoptose activées lors d'une ischémie cérébrale [196].....	51
Figure 20 : Mise en place progressive des lésions ischémiques dans les cellules cardiaques [127].....	55
Figure 21 : Mécanismes moléculaires induit par un préconditionnement à distance [253]....	63
Figure 22 : Représentation schématique d'un préconditionnement à distance [256].....	64
Figure 23 : Représentation d'un pancréas préservé avec la Two-layer Method .....	66
Figure 24 : Saturation des hémoglobines et PFCs en fonction de la pression en oxygène... 68	
Figure 25 : Représentation schématique de la structure de l'hémoglobine M101 [270] .....	69
Figure 26 : Courbe de saturation en oxygène de M101, adaptée de [272] .....	70
Figure 27 : Amélioration du nombre d'îlots de rats récupérés après 1h d'ischémie froide avec l'HBSS.....	92
Figure 28 : Augmentation du stress oxydant et inhibition de p38 dans le pancréas humain en fonction du temps d'ischémie.....	93
Figure 29 : Impact de l'ischémie froide sur les îlots pancréatiques humain .....	94
Figure 30 : Augmentation du stress oxydant et activation transitoire de p38 dans le pancréas de rat en fonction du temps d'ischémie .....	95
Figure 31 : Augmentation du stress oxydant et activation transitoire de p38 dans le tissu pancréatique de rat en fonction du temps d'ischémie .....	97
Figure 32 : Diminution du rendement, de la fonctionnalité et de la viabilité des îlots en fonction du temps d'ischémie du pancréas.....	99
Figure 33 : Activation de kinases (AKT, ERK, p38, JNK) dans le tissu pancréatique de rat lors de la digestion enzymatique.....	101
Figure 34 : Augmentation des défenses antioxydantes dans les tissus pancréatiques de rat préconditionnés à l'ischémie.....	107
Figure 35 : Activation transitoire de la MAPK ERK dans les tissus pancréatiques de rat préconditionnés à l'ischémie .....	108

<i>Figure 36 : Pas d'impact d'un préconditionnement à l'ischémie sur la MAPK p38 et sur l'apoptose dans le tissu pancréatique de rat .....</i>	109
<i>Figure 37 : Pas d'impact d'un préconditionnement de 3*5 min sur les îlots après 2 ou 4h d'ischémie.....</i>	110
<i>Figure 38 : Amélioration de la fonctionnalité des îlots de pancréas préconditionnés (3*10 min) après 18h d'ischémie froide .....</i>	111
<i>Figure 39 : Amélioration de la fonctionnalité des îlots humains cultivés en conditions hypoxiques avec M101.....</i>	117
<i>Figure 40 : Augmentation de l'activité mitochondriale et inhibition de l'activation transitoire de p38 lors de l'ischémie en présence de M101 .....</i>	119
<i>Figure 41 : Diminution du stress oxydant, de la nécrose et augmentation de la consommation de glucose dans le tissu pancréatique après 6h d'ischémie en présence de M101.....</i>	121
<i>Figure 42 : Amélioration de la qualité de l'îlot lorsque le pancréas est perfusé puis préservé dans la solution en présence de M101 .....</i>	123
<i>Figure 43 : Diminution de l'hypoxie et activation de AKT dans le tissu pancréatique humain en présence de M101.....</i>	124
<i>Figure 44 : Tendence à une amélioration de la qualité de l'îlot lorsque le pancréas humain a été préservé en présence de M101 .....</i>	126
<i>Figure 45 : Bilan des effets d'un préconditionnement à l'ischémie et du transporteur d'oxygène M101 sur la préservation du pancréas.....</i>	133

# Liste des tableaux

---

<i>Tableau 1 : Composition de l'HBSS.....</i>	<i>76</i>
<i>Tableau 2 : Composition de l'UW.....</i>	<i>77</i>
<i>Tableau 3 : Caractéristiques des pancréas humains .....</i>	<i>80</i>
<i>Tableau 4 : Caractéristiques des pancréas humains utilisés pour l'étude sur le rendement en îlots .....</i>	<i>81</i>
<i>Tableau 5 : Caractéristiques des pancréas humains utilisés pour l'étude sur la fonctionnalité des îlots .....</i>	<i>81</i>
<i>Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés.....</i>	<i>87</i>



# Liste des abréviations

---

**ABAM** : antibiotique/antimycotique

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**AIF** : apoptosis inducible factor

**AMP / ADP / ATP** : adénosine mono-di-tri-phosphate

**ARN(m)** : acide ribonucléique (messenger)

**ATG** : anti-thymocyte globulin

**Bax** : Bcl2-associated x protein

**BCA** : bicinchoninic acid assay

**Bcl2** : B cell lymphoma 2

**BSA** : bovin serum albumin

**CD25** : cluster de différenciation 25

**CITR** : Collaborative Islet Transplantation Register

**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité

**COX1** : cyclooxygénase 1

**CPS** : coup par seconde

**CREMEAS** : comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animal de Strasbourg

**CTL** : contrôle

**Da** : Dalton

**DAMP** : danger-associated molecular pattern

**DAPI** : 4',6-diamidino-2-phénylindole

**DCCT** : diabetes control and complications trial

**DHE** : dihydroéthidium

**EDTA** : éthylènediaminetétraacétique

**EGTA** : ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

**ELISA** : enzyme-linked immunosorbent assay

**EOPS** : exempt d'organismes pathogènes spécifiques

**ERK** : extracellular-signal regulated kinase

**FADD** : Fas-Associated protein with Death Domain

**FAD** : flavine adénine dinucléotide

**FDA** : fluorescéine di-acétate

**Fig** : figure

**FOXO** : forkead box O

**(μ)g** : (micro-)gramme

**GAD6** : glutamic acid decarboxylase

**GLUT2/4** : glucose transporter

**GPx** : glutathion peroxidase

**GSH/GSSG** : glutathion forme réduite/ forme oxydée

**GSIS** : glucose-stimulated insulin secretion

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxide d'hydrogène

**HBA1c** : hémoglobine glyquée

**HBOC** : hemoglobin-based oxygen carrier

**HBSS** : Hank's balanced salt solution

**HEPES** : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

**HES** : hydroxyéthyl-starch

**HIF** : hypoxia inducible factor

**HMGB1** : high mobility group box 1

**HO-1** : hème oxygénase 1

**HSP** : heat shock protein

**HRE** : hypoxia response element

**HRP** : horse radish peroxydase

**HTK** : histidine tryptophane ketoglutarate

**IAA** : insulin auto-antibody

**IBMIR** : instant blood-mediated inflammatory reaction

**IDF** : International Diabetes Federation

**IEQ** : islet equivalent

**IFN $\gamma$**  : interféron  $\gamma$

**IL** : interleukine

**IMC** : indice de masse corporel

**iNOS** : inducible nitric oxyde synthase

**IP** : iodure de propidium

**I/R** : ischémie/reperfusion

**JNK** : c-Jun N-terminal kinases

**HLA** : human leucocyte antigen

**L** : litre

**LDH** : lactate dehydrogenase

**MAPK** : mitogen-activated protein kinase

**mM** : milimolaire

**MPTP** : mitochondrial pore transition permeability

**N/A** : non applicable

**NADH<sup>+</sup>/NADH** : Nicotinamide adénine dinucleotide forme réduite/forme oxydée

**NF $\kappa$ B** : nuclear factor-kappa B

**NO** : nitric oxyde

**NRF2** : nuclear factor erythroid-2-related factor 2

**O<sub>2</sub>** : oxygène

**OCT** : optimal cutting temperature

**ODD** : oxygen dependent domain

**PAK** : pancreas after kidney transplantation

**PBS(-T)** : phosphate buffered saline (tween)

**PDK1** : pyruvate déshydrogénase kinase 1

**PEG** : polyethylene glycol

**PFC** : perfluorocarbure

**PGC1 $\alpha$**  : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

**PHD** : prolyl hydroxylase

**PI3K** : phosphoinositide 3-kinase

**PTA** : pancreas transplantation alone

**PVDF** : PolyVinylidene Fluoride

**rIPC** : remote ischemic preconditioning

**RPM** : rotation par minute

**SCOT15** : solution de conservation d'organes et des tissus

**SEM** : standard error-mean

**siRNA** : small interfering RNA

**SOD** : superoxide dismutase

**SNARE** : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor

**SPK** : simultaneous pancreas and kidney transplantation

**TBS(-T)** : Tris Buffered Saline (tween)

**TLM** : two-layer method

**TLR** : toll-like receptor

**TNF $\alpha$**  : tumor necrosis factor  $\alpha$

**TRADD** : Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein

**TRAIL** : tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

**UW** : University of Wisconsin solution

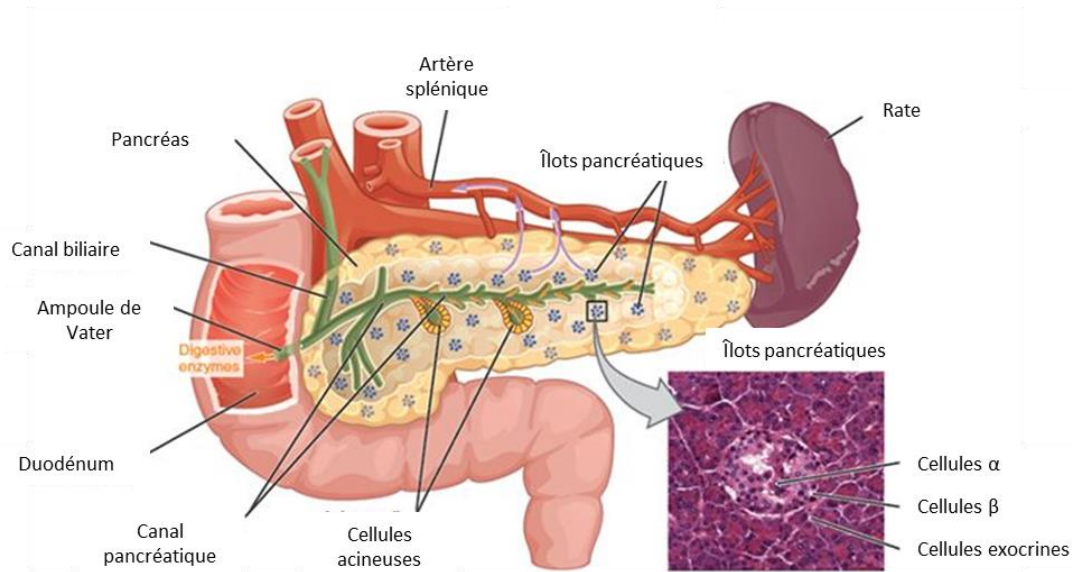
**ZnT8** : zinc transporter

## 1. Introduction générale

### 1.1. Le métabolisme énergétique

#### 1.1.1. La digestion

L'énergie dont notre corps a besoin pour fonctionner provient de la capacité que nous avons à extraire les substrats énergétiques de l'alimentation. Ceci est possible grâce à un système complexe de digestion qui va transformer les aliments en éléments essentiels tels que les glucides, les protéines, les lipides, l'eau ou encore le sel. Le processus commence par la mastication qui, combinée aux enzymes salivaires (amylase, lipase salivaires), permet de constituer un bol alimentaire. Le bol alimentaire arrive ensuite dans l'estomac dans lequel se poursuit la dégradation grâce à un pH acide et des enzymes (pepsine). Les nutriments y sont décomposés avant d'être acheminés sous forme de chyme dans l'intestin grêle. La première étape est de neutraliser le chyme par une libération de mucus alcalin par les glandes de Brunner au niveau de l'entrée du duodénum. Puis, le chyme est mélangé avec les sucs pancréatiques et la bile hépatique déversés via l'ampoule hépatopancréatique dans le duodénum (**Fig. 1**). Les sucs pancréatiques vont dégrader les carbohydrates, protéines, lipides et acides nucléiques en leurs unités monomériques et la bile va augmenter l'hydrophilicité des lipides en les émulsifiant [1]. Ces sous-unités peuvent alors traverser la membrane intestinale pour rejoindre le sang et finalement les organes afin d'apporter l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire notamment via le glucose.



**Figure 1 : Le pancréas**

*Schéma d'un pancréas humain dans son environnement [2].*

### 1.1.2. Utilisation du glucose

Les substrats énergétiques (glucose, lipides, acides aminés) sont soit utilisés pour la production immédiate d'énergie dans les cellules sous forme d'ATP via la glycolyse soit pour la génération de réserves énergétiques dans les organes de stockage. Nous nous concentrerons sur le glucose dans cette partie.

Le glucose est la source la plus importante pour la production d'énergie cellulaire sous forme d'ATP. L'ATP, fournisseur universel d'énergie indispensable aux différentes réactions cellulaires, est produit par les mitochondries chez les espèces aérobies en condition physiologique et c'est l'hydrolyse de l'ATP en ADP qui permet la libération d'énergie [3]. L'ATP est notamment primordiale dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

La glycémie, représentant le taux de glucose dans le sang, varie entre 0,7 et 1 g/L à jeun (soit entre 3,9 et 5,5 mM) et ne dépasse pas 1,2 g/L de sang en période postprandiale chez une personne saine. L'organisme doit pouvoir gérer continuellement l'alternance alimentation/jeûne afin de maintenir une glycémie dans

l'intervalle physiologique. Ceci est principalement permis grâce à l'action du pancréas sur les organes de stockage/déstockage du glucose.

### 1.1.3. Régulation de la glycémie

#### 1.1.3.1. Le pancréas

Le pancréas joue en effet un rôle central à la fois dans la digestion et dans la régulation de la glycémie. Il mesure environ 15 cm de long par 4 cm de large chez l'Homme adulte. Il comporte plusieurs parties : la tête, l'isthme, le corps et la queue. La tête du pancréas, située sous le foie, est bordée par le duodénum alors que la queue est trouvée à proximité de la rate (**Fig. 1**). Le pancréas est traversé de tout son long par le canal de Wirsung, le canal pancréatique principal, qui permet de déverser dans le duodénum les enzymes digestives sécrétées par le pancréas. Il est aussi hautement vascularisé, permettant la sécrétion d'hormones par le tissu endocrine pour la régulation de la glycémie [2]. On dit que c'est une glande amphicrine avec une fonction exocrine et endocrine.

##### 1.1.3.1.1. Fonction exocrine

Le tissu exocrine est composé de cellules acineuses qui ont un rôle dans la digestion en assurant la production du suc pancréatique. Ce liquide pancréatique contient notamment de l'amylase (digestion des glucides), de la lipase (digestion des lipides) et de la trypsine (digestion des protéines) [4]. Ces enzymes sont libérées dans une solution riche en ions bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) qui neutralisent l'acidité du chyme. Ce suc pancréatique est sécrété dans les canaux pancréatiques secondaires qui rejoignent le canal de Wirsung pour finalement être déversé dans le duodénum. La sécrétion fluctue en fonction de la prise alimentaire et varie entre 1 et 1,5L par jour. L'intégrité de ce système de canaux est primordiale, l'entrée d'enzymes digestives dans le tissu interstitiel pouvant en effet causer des dommages tissulaires et mener à une pancréatite [5].

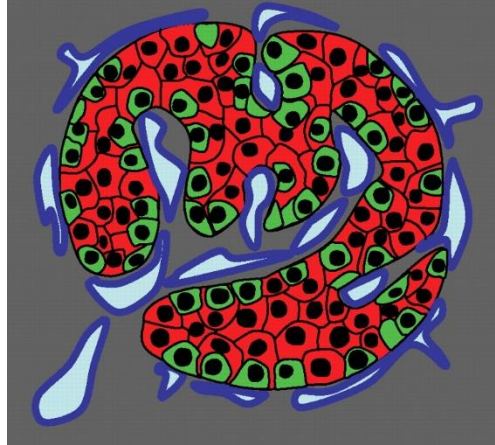
En plus de jouer un rôle dans la digestion, le pancréas exerce également un rôle primordial dans le contrôle du taux de glucose dans le sang avec sa partie endocrine représentée par les îlots pancréatiques.

#### 1.1.3.1.2. Fonction endocrine

La partie endocrine a un rôle de libération d'hormones directement dans le sang et est assurée par les îlots pancréatiques. Les îlots sont des amas cellulaires dont le nombre et la taille peuvent varier (entre 1 et 15 millions d'îlots chez l'Homme selon les publications et mesurent entre 50 et 500  $\mu\text{M}$  de diamètre [6-8]). Leur complexité fait qu'ils sont souvent comparés à des mini-organes. En effet, ils sont composés de différents types cellulaires ayant des fonctions précises [9]. Leur organisation est conservée malgré certaines différences inter espèces notamment sur la proportion de chaque type cellulaire. Ces cellules communiquent au sein de l'îlot pour une action concertée sur la régulation glycémique. Les îlots, tout comme un organe, sont vascularisés et innervés [10, 11]. Cette organisation est cruciale pour une activité optimale de l'îlot.

Chez l'Homme, les îlots sont composés d'environ : 75% de cellules  $\beta$ , 15% de cellules  $\alpha$ , 5% de cellules  $\delta$  et moins de 1% de cellules  $\epsilon$  et de cellules polypeptide pancréatique (PP) [12, 13]. Les cellules  $\alpha$  sont plutôt retrouvées en périphérie tandis que les cellules  $\beta$  sont plutôt à l'intérieur des îlots, mais toutes ont une jonction avec un vaisseau sanguin [14] (**Fig. 2**). Les autres types de cellules sont réparties dans tout l'îlot. Chaque type cellulaire a un rôle spécifique dans la régulation de la glycémie et dans le rétrocontrôle des cellules voisines.





**Figure 2 : Représentation schématique de l'architecture d'un îlot pancréatique humain [14]**

*Les cellules rouges représentent les cellules  $\beta$ . Les cellules vertes représentent les cellules  $\alpha$ . Les îlots forment des replis de sorte à laisser un accès aux vaisseaux sanguins en bleus. Les cellules  $\alpha$  occupent principalement la périphérie de l'îlot alors que les cellules  $\beta$  sont situées à l'intérieur et forment des invaginations afin d'atteindre la circulation sanguine [14].*

#### 1.1.3.1.3. Les cellules $\beta$ : insuline et amyline

##### 1.1.3.1.3.1. L'insuline

L'insuline contrôle l'entrée du glucose dans les cellules cibles (hépatocytes, musculaires, adipocytes) et assure la production d'énergie et le stockage du glucose.

##### 1.1.3.1.3.2. Biosynthèse

L'insuline est une hormone hypoglycémisante sécrétée directement dans la circulation sanguine uniquement par les cellules  $\beta$ . Le gène de l'insuline code un précurseur de 110 acides aminés : la pré-proinsuline. Cette molécule subit ensuite un processus de maturation dans la lumière du réticulum endoplasmique où elle est clivée pour donner la proinsuline [15]. La proinsuline est ensuite transportée vers l'appareil de Golgi, où se forment les vésicules de sécrétion dans lesquelles la proinsuline est clivée en insuline et en peptide C [16]. Le métabolisme du glucose est l'élément le plus important dans la stimulation de la transcription du gène de l'insuline

et la traduction des ARNm [17]. En réponse aux glucose, les cellules  $\beta$  sont en effet capables d'augmenter la vitesse de traduction des ARNm en protéines [17].

#### 1.1.3.1.3.3. L'amyline

L'amyline est un peptide sécrété par les cellules  $\beta$  en même temps que l'insuline et a pour cible les cellules  $\alpha$  des îlots et l'hypothalamus. Il permet d'inhiber les cellules  $\alpha$  et de retarder l'absorption du glucose par l'intestin [18]. L'amyline permet également de stimuler le centre de la satiété afin de limiter la consommation de nourriture [18].

#### 1.1.3.1.4. Les cellules $\alpha$ : glucagon

Le glucagon, une hormone hyperglycémiant, est sécrété par les cellules  $\alpha$ . Le gène produit d'abord un pré-proglucagon sous forme d'ARNm. L'ARNm est transformé en proglucagon dans le réticulum endoplasmique puis est clivé en glucagon. Les cellules cibles principales sont les cellules hépatiques afin de stimuler la libération de glucose dans le sang en dehors des périodes de prise alimentaire [19].

#### 1.1.3.1.5. Les cellules $\delta$ : somatostatine

La somatostatine est sécrétée par les cellules  $\delta$ , l'hypothalamus et les cellules delta de la muqueuse gastrique. Les cellules cibles sont les cellules  $\beta$ , la glande pituitaire et les cellules sécrétrices de la gastrine de l'estomac. Cette molécule inhibe la sécrétion de différentes hormones (facteurs de croissance, l'insuline, le glucagon, la gastrine) [20].

#### 1.1.3.1.6. Les cellules $\epsilon$ : ghréline

La ghréline est sécrétée par les cellules  $\epsilon$ , les cellules endocrines de l'estomac et l'hypothalamus. Les cellules cibles sont les cellules  $\beta$  ainsi que l'hypophyse afin d'inhiber la sécrétion d'insuline et de stimuler l'appétit respectivement [21].

#### 1.1.3.1.7. Les cellules à polypeptides pancréatiques (PP)

Les PP sont sécrétés par les cellules  $\gamma$ . Ce peptide composé de 36 acides aminés est sécrété lors de la période postprandiale via une stimulation nerveuse [22]. Il inhibe la sécrétion de glucagon lors d'une faible concentration en glucose dans le sang [23].

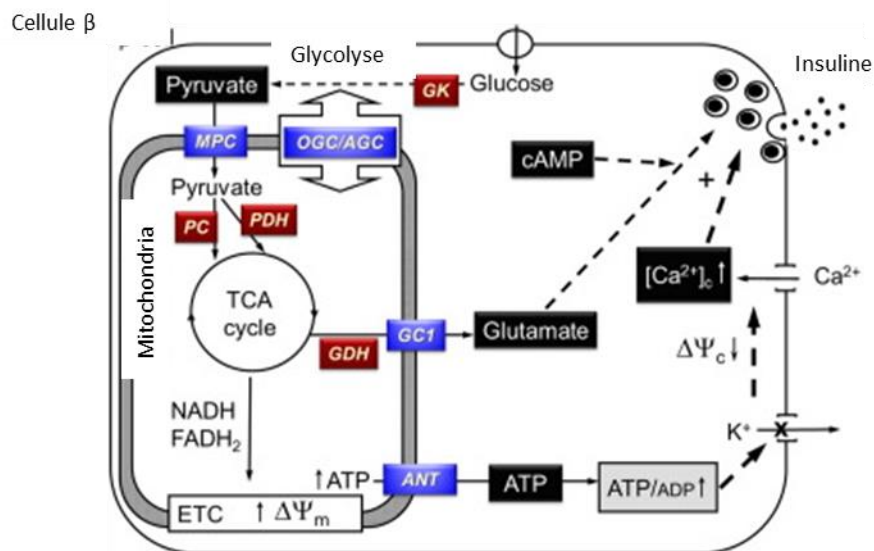
#### 1.1.3.2. Sécrétion d'insuline par les cellules $\beta$

Les cellules  $\beta$  détectent les augmentations de concentration en glucose dans le sang après une prise alimentaire et répondent par la libération d'une quantité d'insuline finement contrôlée dans le but de normaliser la glycémie. Afin de détecter les variations glycémiques de l'organisme, les cellules  $\beta$  sont placées stratégiquement au sein d'îlots connectés à la vascularisation [10]. Le glucose s'accumule dans les cellules  $\beta$  via des transporteurs GLUT2 par diffusion facilitée [24]. A l'intérieur de la cellule  $\beta$ , le glucose est métabolisé en pyruvate par la glycolyse permettant la synthèse d'ATP.

La glycolyse permet en effet la conversion d'une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate dans le cytoplasme via 10 étapes de réactions chimiques, chacune catalysée par une enzyme spécifique [25]. Le pyruvate est ensuite transporté dans les mitochondries puis est oxydé en acetylCoA qui est lui-même transformé en citrate constituant le premier rouage du cycle de Krebs. Le cycle de Krebs comporte 9 étapes de transformation enzymatique du citrate [26] et permet la production de NADH et FADH<sub>2</sub>, des transporteurs d'électrons utilisés par la phosphorylation oxydative pour générer de l'ATP. L'énergie redox des transporteurs

d'électrons NADH et FADH<sub>2</sub> est transférée à de l'oxygène via une série d'étapes de transport d'électrons le long de complexes enzymatiques présents dans la membrane interne des mitochondries (Complexe I, II, III, IV et V) [27]. Ces réactions engendrent un transport de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire créant un gradient de protons [28]. Les protons retournent alors dans la matrice via l'ATP synthase (ou complexe V) permettant la phosphorylation d'ADP en ATP [27]. Une molécule de glucose permet ainsi la production nette de 36 molécules d'ATP via la respiration et représente donc le moyen le plus efficace de production d'énergie.

Dans le cas d'élévation de glucose dans la cellule, le ratio ATP/ADP intracellulaire est donc augmenté, provoquant une fermeture des transporteurs d'ions potassiques dépendant de l'ATP ce qui bloque l'efflux de ces ions en dehors de la cellule et mène donc à une dépolarisation de la membrane [29]. Ce changement de gradient ionique active l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants et l'entrée de calcium à l'intérieur des cellules  $\beta$  [30]. Le calcium intracellulaire induit la formation de complexes Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor (SNARE) favorisant la fusion des vésicules d'insuline avec la membrane (exocytose) pour permettre la libération d'insuline [31] (**Fig. 3**). En plus du glucose, certains acides gras et acides aminés peuvent réguler la sécrétion d'insuline [32, 33].



**Figure 3 : Sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$**

Schéma du mécanisme de sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  induite par le glucose [34].

La sécrétion d'insuline s'effectue en deux phases avec environ 1% des granules d'insuline qui sont disponibles pour un relargage rapide après stimulation au glucose. La première phase de sécrétion s'effectue entre 5 et 10 min après la stimulation de la cellule  $\beta$  [35]. La seconde phase peut durer plusieurs heures si la glycémie reste élevée. Il est suggéré que la première phase de sécrétion d'insuline jouerait un rôle dans l'inhibition de la production de glucose hépatique et que la seconde phase jouerait un rôle dans l'utilisation et le stockage du glucose au niveau musculaire [31].

### 1.1.3.3. Mode action de l'insuline

L'insuline stimule le processus anabolique et la mise en réserve de l'énergie. L'insuline est sécrétée directement dans la circulation sanguine via la veine porte et atteint le foie. Elle lie alors des récepteurs à l'insuline au niveau hépatique, induit des voies de signalisation puis est internalisée et dégradée. Le foie peut filtrer entre 50 et 80% de l'insuline produite par les îlots afin d'éviter une hyperinsulinémie et risquer une hypoglycémie [36].

Le glucose pénètre dans les cellules hépatiques mais pour être transformé en glycogène, les hépatocytes nécessitent d'être activés par l'insuline. L'insuline, après liaison à ses récepteurs hépatiques, est en effet nécessaire pour stimuler la synthèse d'enzymes favorisant la conversion du glucose en glycogène (la forme de stockage du glucose) dans le tissu hépatique [37]. Elle inhibe dans le même temps la gluconéogenèse (production de glucose hépatique) [37]. Après ce premier passage hépatique, une partie de l'insuline rejoint la circulation sanguine et va cibler les cellules musculaires et adipeuses.

L'insuline lie alors son récepteur tyrosine kinase spécifique présent dans la membrane plasmique des cellules cibles, et va induire une cascade de phosphorylation de protéines sous-jacentes aboutissant à une augmentation de la translocation du transporteur de glucose GLUT4 vers la membrane plasmique [38]. Le nombre plus important de transporteurs de glucose permet l'entrée et le stockage de glucose dans les muscles et le tissu adipeux diminuant la glycémie. Les muscles étant un des principaux utilisateurs de glucose, l'insuline va stimuler la glycogénèse. L'hormone va également inhiber la protéolyse et la lipolyse musculaire. Dans les cellules adipeuses, l'insuline stimule le stockage d'énergie sous forme de triglycérides via la lipogenèse tout en inhibant la lipolyse [39].

Plusieurs heures après une prise alimentaire, la diminution de la glycémie va engendrer une diminution de la sécrétion d'insuline ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de glucagon.

#### 1.1.3.4. Sécrétion de glucagon par les cellules $\alpha$

De la même façon que les cellules  $\beta$ , les cellules  $\alpha$  incorporent le glucose de la circulation sanguine via un transporteur SLC2A1 [40]. Une faible concentration en glucose permet une certaine production d'ATP qui active les canaux potassiques ATP dépendants et induit une dépolarisation de la membrane. Cette dépolarisation entraîne l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants, augmentant la concentration calcique intracellulaire qui favorise l'exocytose des granules de glucagon [41]. La sécrétion du glucagon est réalisée en continue lorsque les taux de glucose sont faibles. En revanche, lorsque la concentration en glucose s'élève, il n'y

a paradoxalement pas d'augmentation de la sécrétion de glucagon mais une inhibition. Le mécanisme n'est pas exactement compris, mais il est décrit que les canaux potassiques ATP-dépendants des cellules  $\alpha$  seraient activés seulement à une certaine quantité d'ATP. Une élévation de la glycémie va augmenter fortement le ratio ATP/ADP entraînant le blocage des canaux potassiques ATP dépendants et une dépolarisation extrême des cellules qui bloquent totalement l'ouverture des canaux calciques [42]. Une concentration trop élevée de glucose résulte donc en une inhibition de la sécrétion de glucagon. Lors d'une hyperglycémie, l'activation des cellules  $\beta$  permet également d'inhiber la sécrétion de glucagon démontrant une régulation complexe de la sécrétion de cette hormone.

#### 1.1.3.5. Mode d'action du glucagon

Lorsque les apports en glucose sont réduits (jeûne), le glucagon active la synthèse de glucose hépatique à partir de substrats non glucidiques (néoglucogénèse) [43]. Le glucagon favorise également la dégradation du glycogène en glucose (glycogénolyse) et inhibe la synthèse de glycogène [43]. Ces deux voies permettent la sécrétion de glucose directement dans la circulation sanguine afin d'élever la glycémie. Le glucagon permet donc de mobiliser dans un temps très court le glucose dont l'organisme a besoin. Le foie assure à lui seul 90% de la néoglucogénèse dans l'organisme [44] et permet une production de glucose d'environ 300g par jour.

**Toutes les cellules animales utilisent préférentiellement les hydrates de carbone, et surtout le glucose, comme fournisseur d'énergie nécessaire au bon fonctionnement cellulaire. La révolution industrielle de ces deux derniers siècles avec l'élevage intensif, la mise à disposition aisée de produits animaux à haute teneur en énergie, de plus en plus de produits préparés enrichis en sucres, en acides gras insaturés etc... et de moins en moins de fruits et légumes ont bouleversé les habitudes alimentaires des pays industrialisés. Ce changement de régime alimentaire où l'Homme n'a plus besoin de dépenser d'énergie pour se procurer sa nourriture, s'accompagne d'une augmentation**

de la sédentarisation de la population et d'une diminution de l'activité physique. Il est plus que probable que le code génétique humain n'ait pas eu le temps de s'adapter à ce changement de régime et de mode de vie très brutal et pourrait expliquer l'explosion des maladies chroniques modernes dans les pays industrialisés comme le diabète par exemple. Il est clairement apparu que la régulation glycémique était le résultat d'une collaboration entre les cellules des îlots pancréatiques et les cellules de stockage du glucose. Lorsqu'un type cellulaire est affecté cela provoque une dérégulation de la cascade d'évènements impliqués dans la régulation de la glycémie et mènent au diabète.

## 1.2. Le diabète

Le diabète est une maladie chronique qui se développe lorsque le pancréas n'est plus capable de produire l'insuline et/ou lorsque les cellules hépatiques, musculaires et adipeuses notamment n'arrivent plus à utiliser efficacement l'insuline. La conséquence est une augmentation de la concentration de glucose dans le sang, ou hyperglycémie (>1,26 g/L à jeun), qui à terme mène à différentes complications sur d'autres organes et tissus. En 2017, environ 425 millions d'adultes (20-79 ans) vivaient avec un diabète <sup>a</sup>. La Fédération Internationale du Diabète (IDF) estime que ce nombre va atteindre les 629 millions d'ici 2045. Le diabète est responsable de la mort de 4 millions de personnes par an et représente 12% des coûts en soin de santé (727 milliards de dollars). Il existe de nombreux types de diabète dont deux principaux : le diabète de type 1 et de type 2. Le diabète de type 2 est plus relatif au développement d'une dérégulation de la sécrétion d'insuline combiné à la mise en place d'une insulino-résistance alors que le type 1 découle d'une destruction des cellules  $\beta$ . Nous nous intéresserons plus particulièrement au diabète de type 1.

---

<sup>a</sup> IDF DIABETES ATLAS 8th edition 2017



## 1.2.1. Le diabète de type 1

### 1.2.1.1. Causes

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune menant à la destruction des cellules  $\beta$  des îlots et à une carence en insuline. La physiopathologie n'est pas encore complètement connue. Outre des facteurs environnementaux (virus, toxines, nutriments allergènes), de nombreux éléments montrent que le diabète de type 1 est déclenché par un terrain génétique défavorable et l'apparition d'une auto-immunité dirigée contre les cellules  $\beta$  [45]. Les symptômes cliniques n'apparaissent qu'après destruction d'environ 80% des cellules  $\beta$  [46] (Fig. 4). Le diabète de type 1 représente 10% des types de diabète et apparaît généralement plus tôt dans la vie qu'un diabète de type 2.

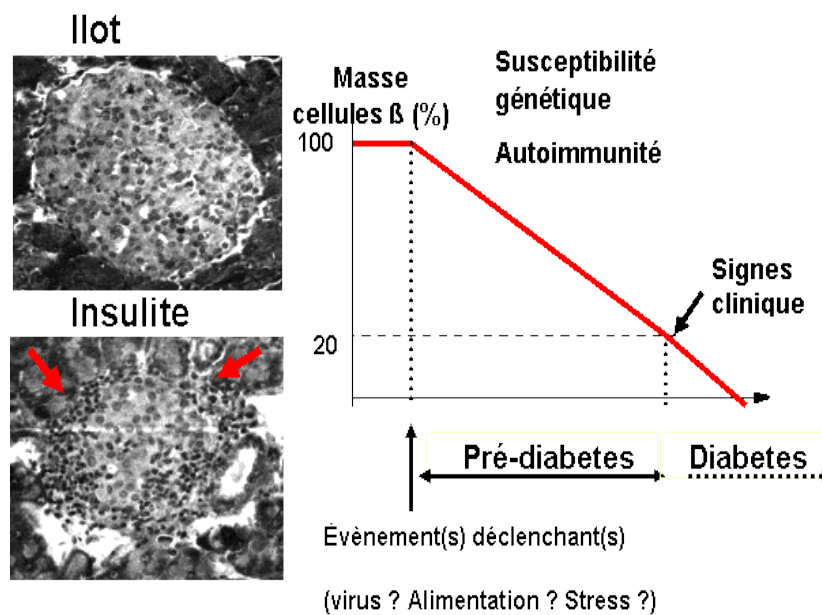


Figure 4 : Progression du diabète de type 1 <sup>b</sup>

#### 1.2.1.1.1. Facteurs génétiques

Plus de 60 régions génétiques ont été répertoriées comme à risque dans le développement du diabète de type 1 [47]. Les principaux gènes impliqués codent pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou Human

<sup>b</sup> <http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/corpus/disciplines/endoc/diabeto/233f/lecon233f.htm>

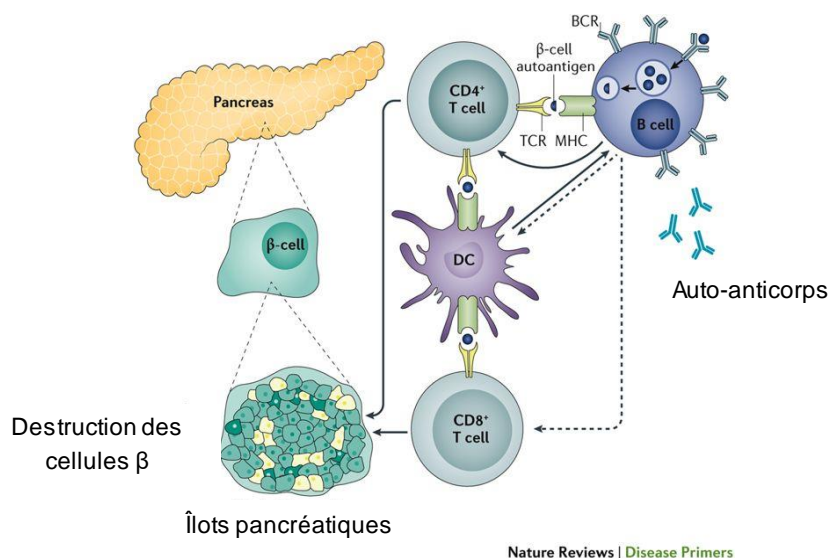
Leucocyte Antigen (HLA) [48]. Les molécules du CMH sont exprimées à la surface de la majorité des cellules pour les CMH de classe 1 et sur les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (cellules dendritiques, monocytes/macrophages, lymphocytes B) pour le CMH de classe 2 et ont pour rôle d'éliminer des cellules présentant des peptides du non soi.

#### 1.2.1.1.2. L'auto-immunité

Le fait que le diabète de type 1 soit une maladie auto-immune repose sur la présence combinée d'auto-anticorps et de lymphocytes T cytotoxiques dans les îlots au début de la maladie. Les principaux autoanticorps détectés chez le patient sont notamment dirigés contre les granules de sécrétion d'insuline et plus précisément contre la glutamate decarboxylase 6 (GAD6), l'insuline (Insulin Auto-antibody, IAA) et le transporteur de zinc ZnT8 [49]. Ces anticorps sont retrouvés chez 60 à 80% des diabétiques de type 1 [50]. Les autoanticorps sont présents des années avant l'apparition des symptômes et peuvent être décelés dans le sang et servir de diagnostic. Une partie des autoanticorps disparaissent après l'installation de la maladie, le type d'autoanticorps restants dépendent de l'âge de l'apparition et de la durée de la maladie [51].

#### 1.2.1.2. Conséquences

Le processus exact impliqué dans le déclenchement et la mort des cellules  $\beta$  est partiellement élucidé. L'infiltration de lymphocytes T et de macrophages dans les îlots observée en réponse à des antigènes associés aux îlots [45] (**Fig. 5**) aboutit au déclenchement de l'apoptose [52]. Le mécanisme de déclenchement de cette mort programmée des cellules pourrait être dû à l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires à l'intérieur de l'îlot (Interleukine 1- $\beta$  (IL1 $\beta$ ), interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )) et menant à la destruction des cellules  $\beta$  par induction de l'apoptose [53] ou par contact direct des lymphocytes T avec les cellules  $\beta$  via le système Fas, une protéine transmembranaire appartenant à la famille du récepteur du TNF $\alpha$ , pouvant médier la mort par apoptose [54].



**Figure 5 : Auto-immunité dans le développement du diabète de type 1 [55].**

Le développement du diabète de type 1 apparaît donc séquentiellement avec tout d'abord l'apparition d'auto-anticorps dirigés contre les cellules sécrétrices d'insuline. Une baisse de la sécrétion d'insuline avec l'apparition d'intolérance au glucose se met ensuite en place, on parle de prédiabète. Puis les signes cliniques se manifestent, ce qui correspond au dernier stade du diabète. Le diabète est généralement diagnostiqué tardivement, une fois que les signes cliniques ont fait leur apparition. L'hyperglycémie chronique s'accompagne d'une glycosurie provoquant une polyurie et une polydipsie, d'une polyphagie, d'une fatigue ainsi que d'une perte de poids [56]. L'hyperglycémie induit également une glycosylation des protéines telles que l'hémoglobine dans le sang. Le taux d'hémoglobine glyquée (HBA1c) représente les phases d'hyperglycémie des dernières semaines et est donc un bon marqueur de l'équilibre glycémique sur cette période. Un taux élevé accélère le développement de rétinopathie [57].

## 1.2.2. Les traitements du diabète de type 1

### 1.2.2.1. L'insulinothérapie

Les îlots ne produisant plus d'insuline, l'apport exogène de cette hormone hypoglycémisante est indispensable pour le patient puisque seules les cellules β la

produisent. Le but est alors de mimer la sécrétion physiologique de l'insuline. Elle est sécrétée en continue à un niveau basal et sécrétée de façon aiguë lors de la prise alimentaire pour normaliser l'élévation du taux de glucose dans le sang. Le moyen le plus efficace pour réduire le risque de développer des complications reste d'obtenir une glycémie très régulée [58]. L'importance de l'insuline pour réduire les complications a en effet été montrée notamment avec l'essai clinique DCCT (Diabetes control and complications trial) [59] dans les années 90. Les diabétiques de type 1 avec une intensification de l'insulinothérapie par augmentation du nombre d'injections quotidiennes d'insuline ou par pompe à insuline a mené à une amélioration des complications micro- et macrovasculaires liées au diabète [60].

#### 1.2.2.2. Les différents types d'insuline

Les insulines actuellement utilisées en France ne sont plus que d'une seule origine et sont obtenues par génie génétique. Les différences entre les variétés d'insuline résident essentiellement dans leur durée d'action qui peut être retardée par l'adjonction de zinc par exemple permettant la préparation d'insuline sous forme cristallisées ce qui réduit sa vitesse de résorption dans l'organisme [61]. L'insuline rapide est couramment utilisée juste avant ou lors d'un repas. Elle agit très rapidement de manière à limiter l'élévation de la glycémie qui suit la consommation de nourriture. L'insuline intermédiaire agit sur une durée d'environ 12h et l'insuline lente peut rester dans l'organisme jusqu'à 24h après injection.

#### 1.2.2.3. Les modes d'administration

L'insuline peut être délivrée par des seringues, des stylos à insuline ou par des pompes (externes ou implantables) (**Fig. 6**). Les pompes à insuline externes permettent de limiter le nombre d'injections. Un cathéter est implanté sous la peau relié à un réservoir d'insuline. La pompe permet d'injecter des doses précises d'insuline. Le débit basal s'effectue par l'administration continue de petites quantités d'insuline alors que les bolus se font à la demande via les commandes de la pompe [62]. Les pompes implantables, constituées d'un réservoir d'insuline et d'un cathéter

intra-péritonéal, délivrent continuellement de l'insuline permettant une administration plus physiologique de l'insuline et réduisent les risques d'hypoglycémie [63]. La pose de ces pompes nécessite néanmoins une intervention chirurgicale réalisée sous anesthésie générale.



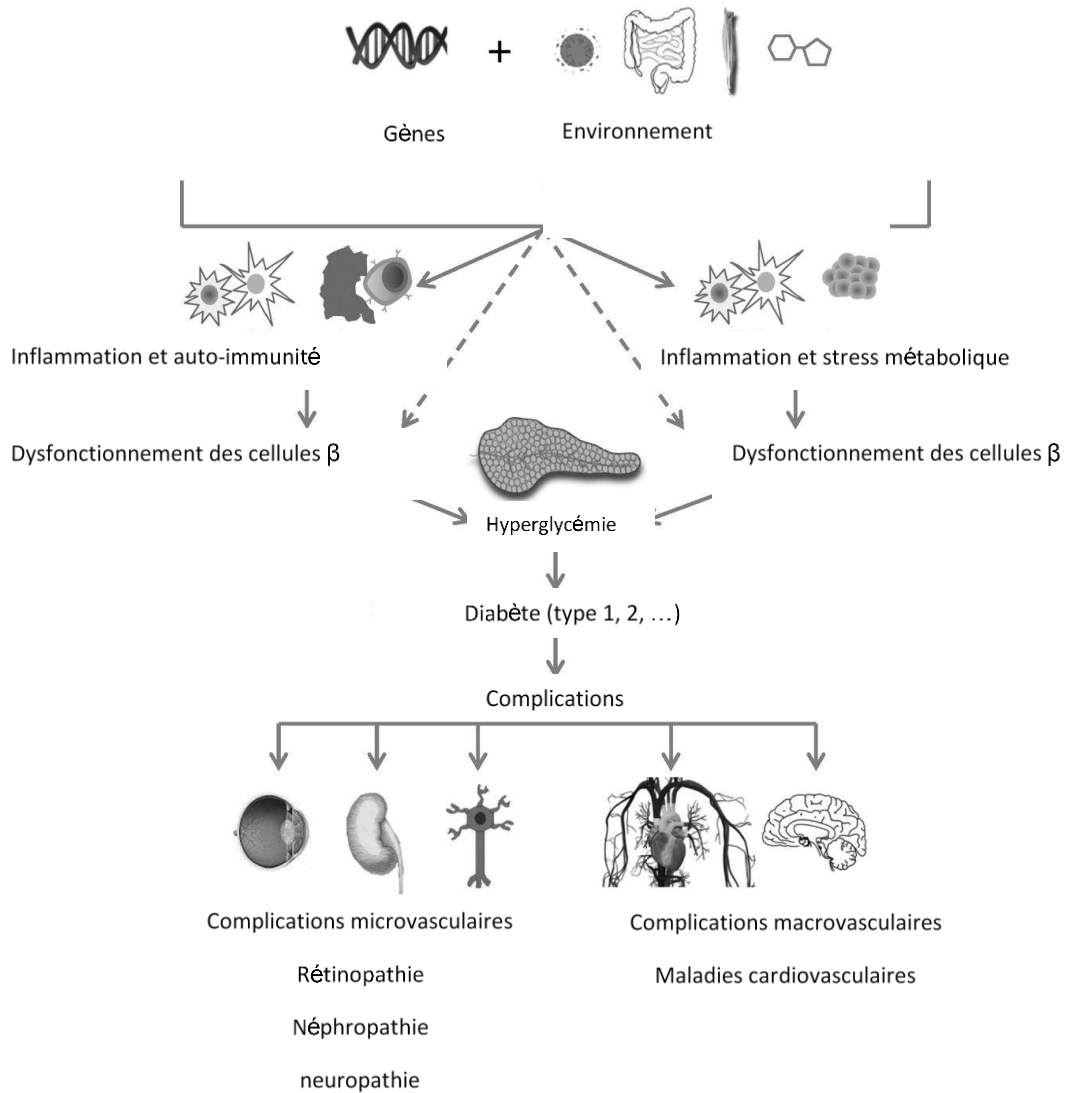
**Figure 6 : Différentes alternatives pour l'administration d'insuline<sup>c</sup>**

L'heure est également à l'automatisation de la délivrance d'insuline via des pancréas artificiels comprenant un système de monitoring du glucose en continu et des pompes permettant l'infusion d'insuline. L'utilisation d'algorithmes prenant en compte le poids du patient, la vitesse d'action de l'insuline ou encore la glycémie vont permettre un relargage adapté de l'insuline. Des études ont également montré qu'une bithérapie avec injection d'insuline et de glucagon permet un meilleur contrôle glycémique qu'avec de l'insuline seule [64].

<sup>c</sup> <https://www.consumermedsafety.org/insulin-safety-center/item/419>

### 1.2.3. Les complications liées au diabète

Les complications liées au diabète résultent d'une mauvaise régulation de la glycémie (Fig. 7).



**Figure 7 : Causes et conséquences du diabète [65].**

### 1.2.3.1. Les complications aiguës

#### 1.2.3.1.1. L'acidocétose

La carence en insuline entraîne une augmentation de la lipolyse afin de fournir les combustibles nécessaires aux cellules [66]. Ces acides gras sont notamment oxydés en acétyl CoA au niveau du foie et vont induire une synthèse excessive de corps cétoniques. L'accumulation de ces corps cétoniques qui sont des acides forts résulte donc en une acidose métabolique avec notamment une diminution du pH sanguin [67]. Avant la découverte de l'insulinothérapie, l'acidocétose aboutissait à un coma entraînant la mort en quelques heures. Elle est souvent observée lors de la déclaration de la maladie ou lorsque les patients ne prennent plus leur insuline. Les symptômes se manifestent par une haleine acétonique « pomme reinette ».

#### 1.2.3.1.2. L'hypoglycémie

L'hypoglycémie est une conséquence d'une insulinothérapie mal adaptée entre les besoins et la dose d'insuline administrée. La concentration de glucose dans le sang peut alors passer sous le seuil de 0,6 g/L de sang et induire des conséquences plus directes avec des pertes de connaissances voire des comas pouvant mener à la mort [68]. L'ingestion de glucose ou l'injection de glucagon doivent alors être réalisées très rapidement.

### 1.2.3.2. Les complications chroniques

#### 1.2.3.2.1. Les micro-angiopathies

Le terme de microangiopathie recouvre l'ensemble des lésions subies par les vaisseaux d'un diamètre inférieur à 30µm. La lésion élémentaire est l'épaississement de la membrane basale des capillaires [69]. Cette membrane est notamment constituée de chaînes peptidiques de collagène de type IV sur lesquelles peuvent se fixer des sucres. En conséquence, l'hyperglycémie induit un épaississement de la membrane basale par accumulation de glycoprotéines ainsi qu'une augmentation de

la perméabilité des capillaires [70]. Cet épaissement entraîne des modifications du contenu plasmatique avec des érythrocytes moins déformables et qui s'agrègent diminuant leur capacité à apporter de l'oxygène aux différents organes [71]. Dans le cas de la rétinopathie, les cellules en hypoxie libèrent alors probablement des facteurs pro-angiogéniques permettant la création de nouveaux vaisseaux au niveau de la rétine qui finissent par obstruer la vision [72, 73]. La néphropathie diabétique représente la première cause de perte de fonction rénale [74] avec un déclin progressif de la filtration glomérulaire sur plusieurs années (10-20 ans). Les maladies rénales sont également génératrices de maladies cardiovasculaires [75]. Les neurones sont également endommagés, avec perte de sensibilité aux vibrations, à la température et aux perceptions sensorielles [76]. Une hyperalgésie peut également se développer. La combinaison des atteintes vasculaires, neurologiques et infectieuses peuvent mener au développement de l'ulcère du pied diabétique et à une amputation [77].

#### 1.2.3.2.2. Les macro-angiopathies

Le terme de macroangiopathie rassemble les lésions des grosses et moyennes artères. Les maladies cardiovasculaires représentent 50% des décès de la population diabétique [78]. L'athérosclérose (accumulation de lipides et glucides) se met en place rapidement en parallèle. Le diabète augmente également le risque d'infarctus du myocarde qui sont des conséquences de l'hypertension, de l'altération de la perméabilité vasculaire et de l'ischémie [79].

#### 1.2.3.3. Les diabétiques de type 1 extrêmes

Un contrôle précis de la glycémie via de l'insuline exogène permet de retarder l'apparition des complications liées au diabète mais peut aussi mener à des phases hypoglycémiques. Les patients avec des phases fréquentes d'hypoglycémie non ressenties nécessitent une supervision constante et certaines personnes sont dans l'incapacité de vivre de façon indépendante [80].



Certains patients diabétiques de type 1 vont développer un diabète extrême qui ne peut pas être géré par de l'insulinothérapie classique. Le diabète de type 1 est une maladie instable par nature et le terme de diabète extrême est réservé aux patients affichant une glycémie totalement imprévisible et dont les conséquences sur la vie de tous les jours sont trop lourdes avec des hospitalisations courtes ou prolongées qui se répètent. Ces patients représenteraient 0,3% des diabétiques de type 1 [81]. Ce type de diabète est associé à un risque plus élevé de 19% de décès sur 10 ans dû notamment à l'acidocétose, l'hypoglycémie et les complications rénales par rapport à un diabète stabilisé [82]. Les causes principales d'un diabète extrême peuvent être des défauts d'absorption de l'insuline exogène ou de dégradation de cette insuline, des défauts dans la production d'hormones régulatrices comme le glucagon, des problèmes au niveau du système nerveux avec des hypoglycémies non ressenties [81].

**Le diabète de type 1 est causé par une réaction auto-immune où le propre système immunitaire de l'organisme se dirige contre les cellules  $\beta$  productrices d'insuline menant à leur destruction. La cause exacte de la mise en place d'un diabète de type 1 n'est pas connue mais est liée à une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Chez un diabétique de type 1, l'insuline vient alors à manquer menant à une hyperglycémie chronique et à la mise en place des complications. Le recours à des injections quotidiennes d'insuline exogène est donc nécessaire. Si l'on administrait l'insuline exactement comme le fait le pancréas endocrine, il n'y aurait plus de diabète ni de complications liées au diabète. Pour cela, le patient devrait maîtriser toutes les variables commandant la sécrétion d'insuline (apports glucidiques, efforts physiques, agressions diverses) afin d'injecter la dose correcte d'insuline. Le cerveau humain n'étant pas un robot, cette adaptation idéale est impossible. Chez certains patients (« brittle diabetes » en anglais), l'adaptation à l'insulinothérapie est encore plus délicate avec une variation excessive de la glycémie entraînant des phases d'hypoglycémie non ressenties pouvant mener à des comas et à la mort. Ainsi la transplantation avec remplacement des îlots défectueux constitue une solide option pour soulager ces patients. Deux possibilités existent dans le remplacement des**

## **cellules $\beta$ à l'heure actuelle : la transplantation de pancréas entier et la transplantation d'îlots pancréatiques.**

### 1.2.4. La transplantation de pancréas

#### 1.2.4.1. Historique

La première transplantation de pancréas a été réalisée en 1966 à l'Université de Minnesota [83]. Les transplantations réalisées lors des 10 années suivantes ont donné des résultats mitigés avec moins de 10% des patients restant insulino-indépendants un an après la greffe [84]. L'amélioration des traitements immunosuppresseurs et de l'expertise des chirurgiens a permis d'élever la réussite de la transplantation. Plus de 50 000 transplantations de pancréas ont été réalisées jusqu'à ce jour [85].

#### 1.2.4.2. Technique chirurgicale

Suite à la récupération du pancréas au cours d'un prélèvement multi-organes, l'organe est placé dans une solution de préservation. Le pancréas est refroidi par injection intravasculaire d'une solution de préservation puis il est prélevé et placé dans cette même solution à 4°C. Le patient subit une laparotomie représentant une chirurgie majeure. Le greffon est préférentiellement implanté dans la fosse iliaque droite qui est plus accessible [86]. Le drainage veineux peut se faire soit dans la veine iliaque soit dans la veine mésentérique supérieure. Le pancréas natif n'est pas retiré, le patient possède donc deux pancréas suite à l'opération. Le drainage de la sécrétion exocrine du second pancréas peut-être entérique ou vésical afin d'être éliminé [86].

#### 1.2.4.3. Sélection des donneurs et receveurs

La majorité des pancréas proviennent de donneurs en état de mort encéphalique. Il s'agit de personnes dont le cœur fonctionne toujours mais dont le cerveau a subi des lésions plongeant la personne dans un état d'inconscience irréversible. Les organes sont directement touchés par l'arrêt des interactions avec le cerveau notamment par la production d'un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires engendrant des conséquences physiopathologiques au niveau des organes [87]. Ainsi, tous les organes prélevés ne sont pas transplantés (causes : âge, IMC, durée d'ischémie froide...), ce qui renforce encore plus la pénurie d'organe actuelle. Par exemple, 32% des pancréas prélevés de donneur en état de mort encéphalique ne sont pas greffés à cause de la qualité du pancréas <sup>d</sup>.

La sélection initiale de l'organe donneur se base sur la compatibilité du groupe sanguin avec celui du receveur (ABO) ainsi que sur la compatibilité par rapport aux gènes du CMH. Ainsi, dans certains centres de transplantation, un minimum de trois gènes HLA en commun sont requis pour assurer la transplantation. La sélection des donneurs permet d'optimiser la réussite de la greffe. Les donneurs avec un indice de masse corporel élevé (IMC > 25) et âgés de plus de 50 ans sont associés à un taux de complications plus élevées pour la transplantation de pancréas entier [88].

La transplantation est recommandée en cas de complications métaboliques sévères : hypo-hyperglycémie, acidocétose, problème émotionnel avec l'injection d'insuline. La majorité des patients dirigés vers une transplantation de pancréas sont ceux avec des complications rénales chroniques dues à la progression du diabète. Une transplantation simultanée de reins et pancréas a montré une amélioration de la qualité de vie de ces patients [89]. La transplantation de pancréas est possible plusieurs mois après une transplantation de reins (Pancreas after kidney transplantation, PAK). Chez les patients où la première indication est un contrôle glycémique instable avec des phases d'hypoglycémies non ressenties, le choix se fera entre la transplantation d'organe solide seul (Pancreas transplantation alone, PTA) ou la transplantation d'îlots.

---

<sup>d</sup> <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2017/donnees/organes/01-prelevement/synthese.htm#t2>

L'induction de l'immunosuppression chez le receveur s'effectue via la destruction des lymphocytes (anticorps anti lymphocytes T (ATG), le blocage des récepteurs à l'interleukine 2 permettant l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T (basiliximab, daclizumab)). Le maintien s'effectue grâce à des inhibiteurs de calcineurines qui bloquent l'expression de cytokines nécessaires à la réaction immune (tacrolimus) associés à des anti-métabolites et des corticoïdes [90].

#### 1.2.4.4. Résultats cliniques

Le taux de survie des patients après une transplantation de pancréas aux Etats-Unis est de 93% pour une transplantation simultanée rein/pancréas (Simultaneous pancreas and kidney transplantation, SP, 91% pour une PAK et 78% pour une PTA après 5 ans [91]. Le taux de survie du greffon (défini comme l'obtention de l'indépendance à l'insuline) est lui de 73% pour une SPK, 65% pour une PAK et 53% pour une PTA après 5 ans. Des études montrent que la transplantation de pancréas a des effets bénéfiques freinant l'apparition des complications liées au diabète [92].

#### 1.2.4.5. Complications

Les défaillances techniques représentent la principale cause d'échec de greffe lors des trois premiers mois suivant la transplantation. Les thromboses vasculaires notamment sont responsables de la moitié des pertes de greffon observées. Les pancréatites (20%), les infections (18%), les fistules (6,5%) et les hémorragies (2,5%) complètent la liste des défaillances techniques [93]. Parmi les facteurs de risques associés à ces complications figurent l'âge à la fois du donneur/receveur et la période d'ischémie froide. Dans 10 à 20% des cas, une nouvelle laparotomie est nécessaire suite aux complications chirurgicales [93]. Ceci augmente les risques de mortalité et morbidité associés à une nouvelle chirurgie.

La complexité et la morbidité liées à la transplantation de pancréas sont principalement dues à la sécrétion exocrine. Le fait de transplanter seulement la

partie endocrine du pancréas via les îlots représente donc une alternative intéressante.

### 1.2.5. La transplantation d'îlots

#### 1.2.5.1. Historique

En 1972, Lacy réussit à restaurer un contrôle de la glycémie après infusion d'îlots dans le foie de rats diabétiques [94]. En 1980, Sutherland et Najarian ont testé l'auto-transplantation d'îlots dans le foie de 10 patients. Trois de ses patients sont devenus insulino-indépendants pendant 1, 9 et 38 mois [95]. En 1990, Sharp rapporta un premier cas d'indépendance à l'insuline transitoire lors d'une allotransplantation et donc avec utilisation d'immunosuppression [96]. En dépit de toutes ces avancées, seul 8% des 267 transplantations d'îlots effectuées entre 1980 et 1999 ont résulté en une indépendance à l'insuline pour au moins 1 an [97].

Le protocole d'Edmonton en 2000 a considérablement augmenté l'efficacité de la méthode. Ce protocole a augmenté le nombre d'îlots injectés au patient (13 000 IEQ /kg). Ce protocole utilisait également un traitement immunosuppresseur sans corticoïdes (les corticoïdes sont responsables d'une augmentation de la résistance à l'insuline dans les tissus périphériques) combinés à un anti CD25 pour protéger du rejet et de l'auto-immunité récurrente [98]. Les sept patients traités sont restés indépendants à l'insuline pendant au moins 1 an. Le suivi à 5 ans a montré une diminution progressive de l'indépendance à l'insuline [99]. Cependant, 80% affichaient une production de peptide C chez des patients à peptide C nul avant la greffe ainsi qu'un taux d'hémoglobine glyquée <7%, ce qui montrent une bonne régulation de la glycémie [100]. Les données disponibles font état de 2 150 infusions d'îlots chez 1 086 patients entre 1999 et 2015 dans le monde (Collaborative islet transplant registry – Tenth annual report).

### 1.2.5.2. Sélection du donneur et du receveur

Les caractéristiques du donneur peuvent influencer le nombre d'îlots récupérés suite à l'isolement [101]. Contrairement à la transplantation de pancréas entier, les donneurs âgés (jusqu'à l'âge de 70 ans) et avec un IMC important sont associés à un nombre d'îlots isolés plus important [101, 102]. La majorité des pancréas utilisés pour la transplantation d'îlots proviennent de donneurs en état de mort cérébrale [103]. Une étude, provenant d'un groupe d'experts de la transplantation d'îlots, propose l'utilisation de pancréas provenant de donneurs à cœur arrêté si la durée d'ischémie chaude ne dépasse pas les 60 minutes [104]. Mais aucunes données cliniques comparant directement l'utilisation de donneurs en état de mort cérébrale et de donneurs en arrêt cardiaque ne sont encore disponibles [103].

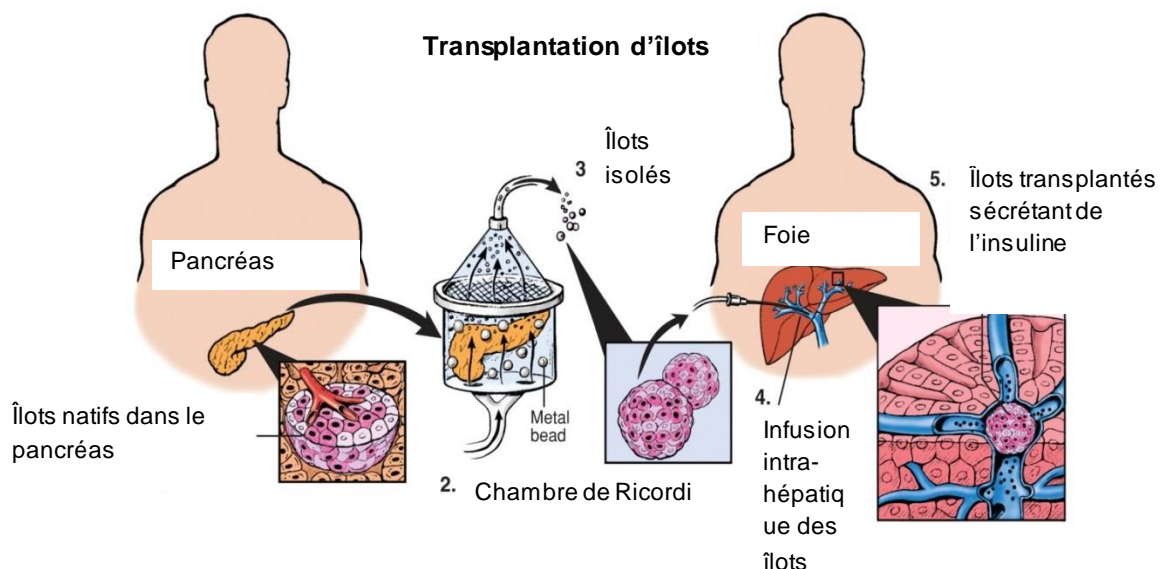
Les critères d'éligibilité à la greffe d'îlots varient selon les pays. En France, le patient doit avoir un diabète de type 1 avec au moins 5 ans de dépendance à l'insuline, un peptide C négatif ( $<0,3$  ng/ml), une insulinothérapie intensive (contrôle de la glycémie et injection d'insuline  $> 3$  fois par jour), des hypoglycémies sévères avec perte de conscience et une instabilité glycémique marquée [105]. Il existe également des critères d'exclusion comme un IMC trop important ( $>30$ ), une hypertension artérielle, une hémoglobine glyquée  $> 10\%$  ou un traitement à l'insuline qui est satisfaisant [105].

### 1.2.5.3. Isolement des îlots

La transplantation d'îlots comprend plusieurs étapes qui doivent être méticuleusement suivies pour optimiser l'intégrité et la survie des îlots [97] (**Fig. 8**). Après acheminement au laboratoire d'isolement, le pancréas est disséqué (la rate, le duodénum et le tissu gras sont retirés) puis un cathéter est posé dans le canal de Wirsung. La collagénase (ex : Libérase™) à 4°C est alors injectée dans le pancréas entier qui est ensuite placé dans une chambre de digestion appelée chambre de Ricordi. Cette chambre est connectée à un circuit fermé de solution circulante à 37°C permettant d'assurer l'oxygénation du tissu, la sortie des îlots pancréatiques et leur

collecte. Les îlots sont ensuite séparés du tissu exocrine sur gradient de densité. L'objectif est d'obtenir une préparation d'îlots d'une pureté d'au minimum 30-50% selon les pays afin d'être utilisable en transplantation [106]. Les îlots sont cultivés pendant 24-72h à 37°C. Cette étape de culture permet de tester la qualité des îlots: le nombre, la viabilité et la pureté de la préparation. Cette étape permet également de vérifier l'absence de contaminations éventuelles, de recruter le receveur et d'induire l'immunosuppression.

L'infusion des îlots dans le foie s'effectue par la veine porte qui est facilement accessible par radiographie interventionnelle. L'intervention peut se faire sous anesthésie locale car elle est peu invasive. Les îlots vont alors s'emboliser dans les veines et veinules du foie. La réorganisation du tissu autour des îlots implique une angiogenèse provoquée par les îlots afin de rétablir une oxygénation optimale. Les îlots constituent 2% de la masse pancréatique totale mais reçoivent 20% du flux sanguin pancréatique total [10]. La revascularisation est donc primordiale pour la survie des îlots après transplantation dans le foie. L'angiogenèse a lieu lors des 14 premiers jours et peut se poursuivre jusqu'à 3 mois [107]. Les îlots sont spécifiquement sensibles au stress oxydant, à l'inflammation pendant cette période [108].



**Figure 8 : Étapes de la transplantation d'îlots**

#### 1.2.5.4. Immunosuppression

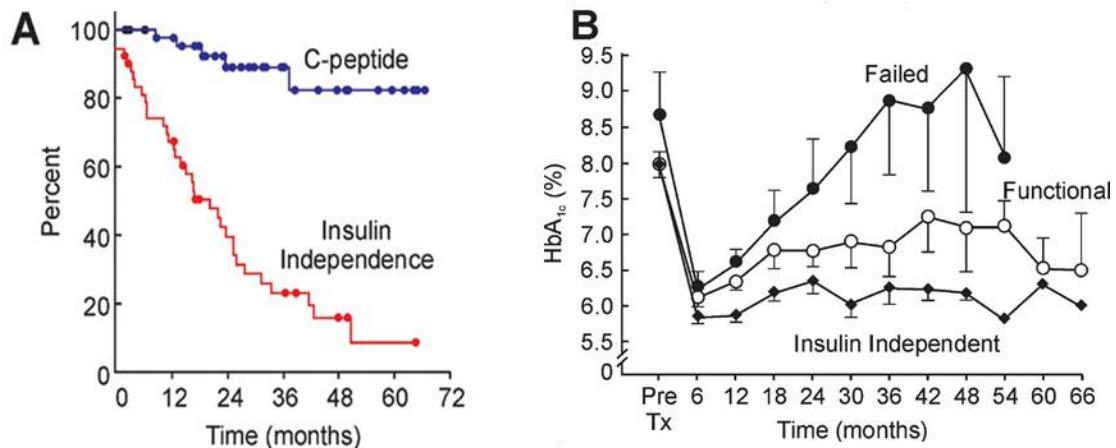
L'allogreffe nécessite également l'administration à vie d'un traitement immunosuppresseur afin de prévenir le rejet de greffe dû à une réaction immunitaire allogénique et/ou à la récurrence de la réaction auto-immunitaire du patient ayant mené au développement du diabète de type 1. Entre 1999 et 2002, l'induction de l'immunosuppression se faisait en majorité avec des antagonistes du récepteur de l'interleukine 2 mais ils ont été progressivement remplacés par des molécules diminuant le nombre de lymphocytes T. Le maintien de l'immunosuppression s'effectue via des inhibiteurs de calcineurine et des inhibiteurs de IMPDH (inhibiteur de la voie de synthèse de novo des bases puriques qui a une action antiproliférative prédominante sur les lymphocytes T) [109]. Les plus puissants (tacrolimus et cyclosporine, inhibiteurs des calcineurines) permettent des résultats positifs en termes de survie du greffon malgré leur toxicité sur les cellules  $\beta$  [110, 111]. L'avantage de la transplantation d'îlots est l'absence d'utilisation de corticoïdes qui sont responsables de l'augmentation de la résistance à l'insuline dans les tissus périphériques [112].

#### 1.2.5.5. Résultats cliniques

Le dernier rapport du CTR recense les allo- et auto-transplantation d'îlots entre 1999 et 2015. Les résultats cliniques de la transplantation d'îlots se sont considérablement améliorés au cours des 20 dernières années. Ceci est attribué à l'amélioration de la qualité des îlots obtenus et à l'amélioration des traitements immunosuppresseurs. L'indépendance à l'insuline varie de 25 à 50% 5 ans après la greffe selon les centres et tend à se rapprocher du taux retrouvé avec la transplantation de pancréas (50% pour les PTA, 70% pour les SPK) [113]. L'effet clinique le plus remarquable de la transplantation d'îlots est la disparition des phases d'hypoglycémie sévère, qui restent à long-terme et même après la reprise de l'insulinothérapie [114]. Même si le peptide C passe en dessous du seuil des 0,3



ng/ml, 60% des patients ne retrouvent plus ces phases d'hypoglycémies sévères (Fig. 9). Le mécanisme empêchant ces phases d'hypoglycémie sévères est encore mal compris.



**Figure 9 : Résultats cliniques de la transplantation**

Pourcentage de patients indépendants à l'insuline et disposant d'une présence de peptide C dans le sang après transplantation d'îlots. (B) Impact de la réussite de la greffe sur le taux d'hémoglobine glyquée après transplantation [115].

#### 1.2.5.6. Complications

Le nombre de complications est plus faible pour une transplantation d'îlots que de pancréas [116]. L'administration d'héparine permet de limiter le risque de thrombose [117]. Certains patients ont en revanche développé des hémorragies à la surface du foie suite au retrait du cathéter. Les deux techniques souffrent du même problème d'immunosuppression (infection opportuniste, effets secondaires, cancer). Le risque qu'une complication chirurgicale nécessite une nouvelle intervention est faible et la mortalité est exceptionnelle [99].

#### 1.2.5.7. Problèmes de la pénurie d'organes et des dons d'organe

La première solution pour atténuer la pénurie d'organes serait un changement sociétal permettant plus de dons (Fig. 10). En France, le don d'organes est régi par

trois grands principes que sont le consentement présumé (loi Caillavet 1976 où chacun est présumé donneur sauf en cas de refus exprimé de son vivant), la gratuité du don et l'anonymat entre le donneur et le receveur. Toute personne peut s'opposer au don d'organes mais doit le faire signaler soit au registre national des refus (rendu accessible en ligne depuis la loi du 26 janvier 2016), soit par un écrit remis aux proches soit par oral transmis par les proches. Cette législation reste cependant mal connue du grand public donnant lieu à des situations ambiguës lors du décès d'une personne et où la famille peut prendre la décision de ne pas donner les organes du défunt même si cela ne représentait pas le choix de la personne. En 2017 en France, seulement 50% des organes de personnes en état de mort encéphalique ont été prélevés. La majeure cause de non-prélèvement a été l'opposition (30%)<sup>e</sup>.

En 2017, 35 pancréas parmi les 105 reçus à visée clinique ont abouti à une greffe d'îlots soit un faible rendement de 33%<sup>f</sup>. A la fin de l'année, 29 patients étaient encore sur liste d'attente pour une transplantation d'îlots. Cinq laboratoires spécialisés dans l'isolement d'îlots sont disponibles en France et en Suisse (Lille, Grenoble, Montpellier, Genève et Paris).

La transplantation d'îlots est à l'heure actuelle prise en charge par les systèmes de santé au Canada, dans certains pays européens (Royaume-Uni, Belgique, Suisse, Pologne). Une deuxième étude multicentrique randomisée est actuellement en cours en France en vue d'un remboursement en 2019/2020. Les îlots humains sont classés comme produit de thérapie cellulaire (PTC) et sont encadrés par la directive de 2006 sur les bonnes pratiques de thérapie cellulaire. Ces directives ont été transposées en loi française en 2010.

---

<sup>e</sup> <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilar2017/donnees/organes/01-prelevement/synthese.htm>.

<sup>f</sup> <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilar2017/donnees/organes/07-pancreas/synthese.htm#6>



Figure 10 : Campagne de sensibilisation française au don d'organes<sup>9</sup>

#### 1.2.5.8. Problèmes liés à la préservation du pancréas

Le processus d'isolement d'îlots en clinique, malgré une standardisation du protocole, reste très variable avec environ 50% des isollements qui ne résultent pas en un rendement acceptable [118]. La préservation de l'intégrité cellulaire du pancréas a été identifiée comme une variable majeure dans le succès de l'isolement. Lors de cette période de préservation, le pancréas est privé d'oxygène et de nutriments, ce qui induit des lésions ischémiques. La préservation se fait en hypothermie à 4°C afin de ralentir le processus de l'ischémie mais n'empêche pas le développement progressif de ces lésions. Réduire au maximum le temps d'ischémie froide du pancréas est ainsi considéré comme une des clés de la transplantation d'îlots [119]. Dans une étude rétrospective de 1995, Lakey *et al.* ont montré qu'une période d'ischémie supérieur à 8h était associée à une diminution du rendement en îlots et de leur viabilité [120]. De plus, des îlots humains ont montré une diminution

<sup>9</sup> <https://www.dondorganes.fr/campagnes/2019>

de la fonction des mitochondries avec relargage de facteurs pro-apoptotiques lors d'une ischémie longue [121]. La préservation du pancréas, qui est un organe très sensible à l'ischémie, représente donc une phase primordiale en vue de la réussite de la greffe.

#### 1.2.5.9. Limites de la transplantation d'îlots

La transplantation d'îlots doit cependant encore faire face à différentes limites techniques empêchant son administration à un plus grand nombre de patients. Un des points le plus important est la perte des îlots en nombre et en qualité au fur et à mesure de toutes les étapes de l'isolement (transport du pancréas, digestion du tissu exocrine, purification, culture et transplantation des îlots) [122, 123]. Ceci entraîne le besoin de 2 à 4 pancréas donateurs afin de traiter le diabète chez un seul patient (répartis sur plusieurs infusions d'îlots en fonction des disponibilités des pancréas) alourdissant considérablement la pénurie d'organes déjà observée [97].

Parmi les autres limites de la transplantation d'îlots figure le site d'implantation des îlots dans le foie du patient qui n'est pas optimal, avec présence de réactions inflammatoires immédiates médiées par le sang (Instant blood mediated inflammatory reaction, IBMIR). Il est estimé qu'environ 40% des îlots sont détruits après transplantation par cette réaction inflammatoire instantanée [124]. Les îlots disposent en effet à leur surface de facteurs qui attirent les plaquettes du receveur ce qui induit une cascade de réaction inflammatoire. En plus, l'apport de sang au niveau du foie provient de la veine porte et apporte donc moins d'oxygène que l'artère au niveau du pancréas. Les îlots sont donc transplantés dans un environnement hypoxique par rapport à leur emplacement natif dans le pancréas [125]. Le risque de production d'anticorps suite à la première infusion peut également avoir un impact négatif sur les infusions suivantes [126].

**Les équipes médicales ont donc deux thérapies à disponibilité pour les patients atteints d'un diabète de type 1 extrême. Le choix doit être fait entre une technique plus efficace mais avec plus de morbidité (transplantation de**

pancréas) et une technique moins efficace mais avec moins de complications post-opération (transplantation d'îlots). Il est cependant à noter que dans certains centres de transplantation d'îlots, l'efficacité de la greffe d'îlots en termes d'indépendance à l'insuline rejoint celle observée lors de la transplantation de pancréas seul. La transplantation d'îlots représente donc une alternative prometteuse à la transplantation de pancréas entier. En revanche, se pose encore le problème d'accessibilité à la technique dû à la pénurie d'organes et au faible rendement de pancréas utilisés aboutissant à une transplantation d'îlots. Une grande majorité des pancréas éligibles (environ 2/3 en France) n'aboutissent pas à une transplantation d'îlots. Il y a donc un défi clair à relever dans l'optimisation de l'utilisation des pancréas donateurs afin d'atteindre un pourcentage d'utilisation proche de ceux du rein et du foie. Atteindre cet objectif passe notamment par l'amélioration de la manière de préserver le pancréas des lésions induites par l'ischémie – reperfusion.

### **1.3. Les mécanismes d'ischémie-reperfusion**

Le terme d'ischémie en médecine a fait son apparition au début du XIX<sup>ème</sup> siècle pour décrire l'absence d'irrigation sanguine au niveau d'un tissu due à l'obstruction d'une artère. Les cellules sont privées des éléments transportés par le sang comme l'oxygène et les nutriments, ce qui déséquilibre le bon fonctionnement cellulaire. Cette phase d'ischémie est indissociable de la phase de reperfusion qui s'en suit lorsque la circulation sanguine retrouve son flux normal et permet de nouveau un approvisionnement d'oxygène et de nutriments aux cellules. De manière paradoxale, cette phase de reperfusion, qui apparaît comme nécessaire pour la survie des cellules, représente également une phase de stress. Les mécanismes de l'ischémie-reperfusion sont multifactoriels et interconnectés.

L'avènement de la technique de la transplantation au XX<sup>ème</sup> siècle a ensuite fait émerger le concept d'ischémie froide. La majorité des organes sont conservés dans une solution de préservation à 4°C entre le prélèvement du donneur et la transplantation chez le receveur. Tout organe en transplantation va donc

inévitablement subir une phase d'ischémie froide, privé d'oxygène et de nutriments extrêmement délétère pour l'intégrité de l'organe.

### 1.3.1. La phase d'ischémie froide

L'hypothermie, qui peut être sévère (4°C) ou moins intense (10/30°C), est le moyen le plus utilisé pour la conservation d'un organe vivant sur une période prolongée. Tous les effets ne sont cependant pas bénéfiques, même si la progression des dommages liés à l'ischémie est plus lente en hypothermie, un temps de conservation trop long va mener irrémédiablement à des dégâts irréversibles. Nous allons voir que l'ischémie induit une cascade d'évènements comme cela a été démontré sur le cœur par exemple [127].

#### 1.3.1.1. Ralentissement des réactions chimiques

La base fondamentale de tout processus chimique et biologique repose sur une activité et une mobilité des molécules qui dépendent d'une énergie thermique. Les processus de dégradation observés lors de l'ischémie étant régulés par des réactions chimiques, l'hypothermie ralentit donc ces processus. Les relations entre les besoins en énergie pour les réactions chimiques et la température ont été établies par différents modèles mathématiques :

- La loi d'Arrhenius décrit la variation de vitesse d'une réaction chimique en fonction de la température. Il s'agit d'une loi empirique et donc pas applicable à toutes les réactions physico-chimiques ayant lieu dans les cellules.
- La relation de Van't Hoof. est une équation thermodynamique qui décrit la variation de la constante d'équilibre d'une réaction chimique en fonction de la température à l'énergie utilisée lors de la réaction.
- Le coefficient de température  $Q_{10}$  est une mesure du taux vitesse d'une réaction chimique lors d'une variation de 10°C. Ainsi la consommation d'oxygène d'un organisme entier est de 2, ce qui signifie que le métabolisme est divisé par 2 pour une perte de 10°C. Plus ce  $Q_{10}$  est élevé, plus

l'hypothermie aura un impact important sur cette réaction. Toutes les réactions ne sont pas impactées au même degré par l'hypothermie. Il a été démontré qu'une chute de 10°C réduisait la consommation d'oxygène de 50% dans des tissus rénaux, hépatiques et cardiaques [128].

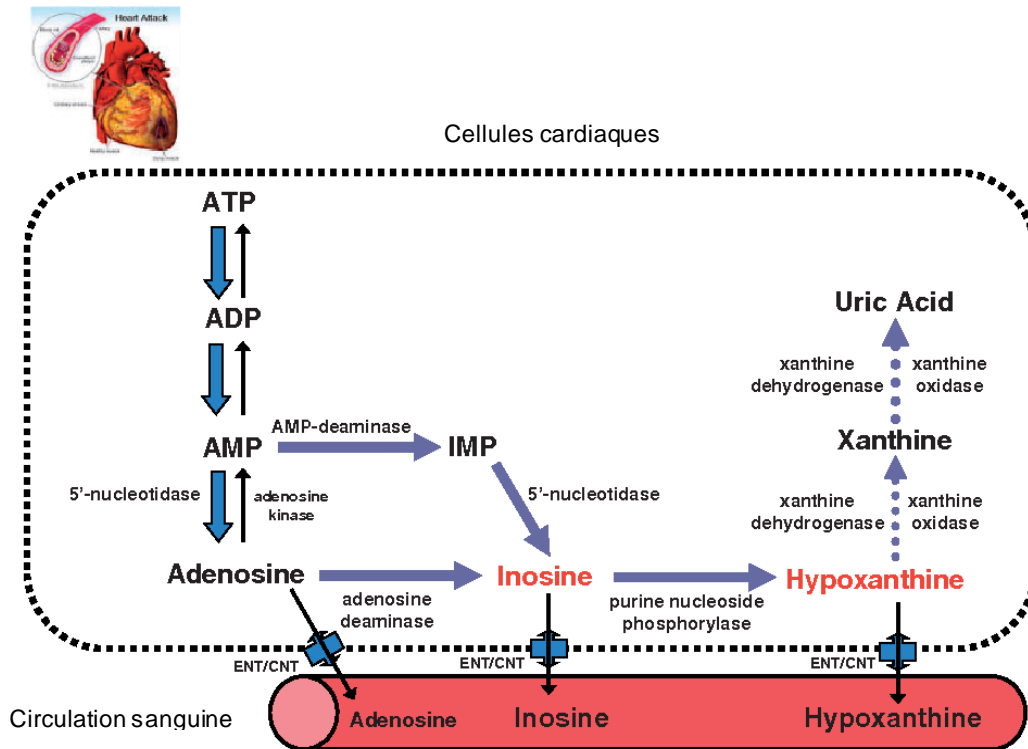
La plupart des protéines, des acides nucléiques, des polysaccharides ont une activité biologique dans un certain intervalle de température qui dépend de la molécule et de l'environnement (ions et pH). Le froid dénature les protéines induisant le dépliement des protéines ou la dissociation des sous-unités en molécule inactive [129]. Il est reconnu que la fluidité des membranes lipidiques permet la réorganisation, le mouvement. Lors de l'hypothermie, les phospholipides changent de conformation entraînant une rigidification de la membrane ce qui perturbe la fluidité membranaire et sa fonction de barrière des solutés [130]. Une hypothèse stipule que la résistance au froid des animaux hibernants provient en partie de leur capacité à maintenir un certain degré de fluidité de leurs membranes [131].

#### 1.3.1.2. Le métabolisme anaérobie

Le premier mécanisme impacté par l'ischémie est la production d'énergie par les cellules qui est normalement prise en charge par le métabolisme aérobie. L'oxygène est en effet une composante primordiale pour la production d'énergie par les mitochondries.

Le métabolisme anaérobie constitue une alternative pour la production d'ATP lorsque l'oxygène vient à manquer. En effet, en l'absence d'oxygène, la phosphorylation oxydative ne peut plus remplir son rôle et la quantité d'ATP produite chute alors rapidement [132]. Quand les cellules sont privées d'ATP, elles utilisent l'énergie des liaisons pyrophosphates de l'ADP et l'AMP menant à la transformation en adénosine. L'adénosine, qui est le précurseur nécessaire pour la fabrication d'ATP, diffuse alors librement hors de la cellule réduisant les réserves de ce nucléotide. L'adénosine est également dégradée en inosine puis en hypoxanthine qui aura des conséquences notamment lors de la reperfusion avec la production de radicaux libres [133] (**Fig. 11**). De plus, pendant l'ischémie, la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase productrice d'ATP, se met à fonctionner en sens inverse et à hydrolyser l'ATP dans

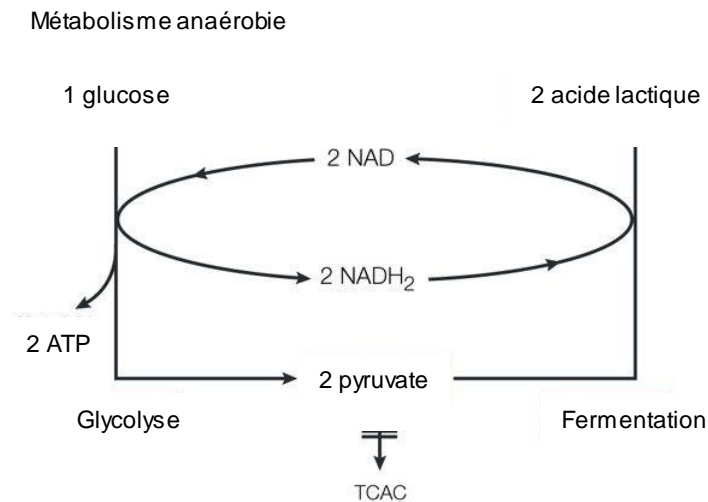
le but de maintenir le potentiel membranaire mitochondrial [134]. Ceci renforce la chute des réserves en ATP observée au sein de tissus ischémiques.



**Figure 11 : Processus de dégradation de l'ATP en ischémie [135]**

Dans le but d'assurer leur survie, les cellules sont capables d'utiliser le glucose et le pyruvate afin de produire de l'ATP en absence d'oxygène. On parle alors de glycolyse anaérobie, dont les effecteurs sont notamment activés en hypoxie grâce au facteur de transcription HIF (Hypoxia inducible factor). Pour cela, la lactate déshydrogénase (LDH) catalyse l'interconversion du pyruvate en lactate et de NADH en NAD<sup>+</sup>. En effet, c'est la transformation du glucose en pyruvate qui permet la production de deux molécules d'ATP et cette réaction nécessite du NAD<sup>+</sup> qui est donc fournit grâce à la formation de lactate à partir du pyruvate (Fig. 12). En revanche, ce mode de production énergétique ne permet la production que de 2 molécules d'ATP pour une mole de glucose contrairement aux 36 molécules d'ATP produites par la glycolyse aérobie. Le besoin en ATP surpasse donc très vite la production en ischémie menant à une cascade de conséquences au niveau cellulaire.





**Figure 12 : Schéma de la production d'ATP lors de la glycolyse anaérobie <sup>h</sup>**

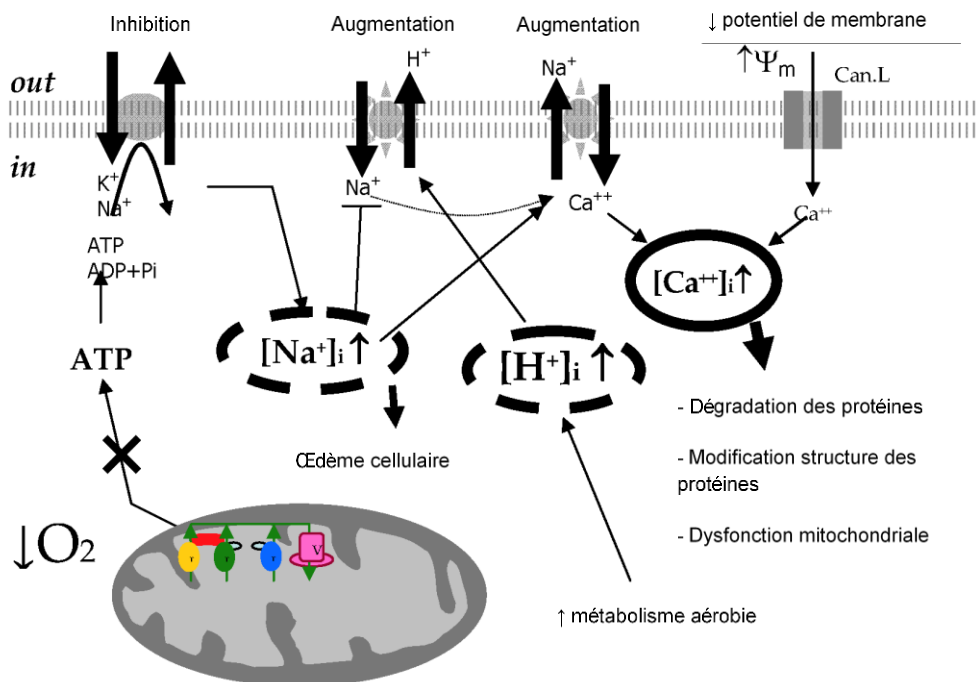
De plus cette transformation du pyruvate en lactate s'accompagne d'une augmentation de la production d'ions H<sup>+</sup> acidifiant donc l'intérieur des cellules [136, 137]. La principale source de protons vient de la transformation du pyruvate en lactate mais l'hydrolyse de l'ATP participe aussi pour une part dans le relargage de protons. L'excès de protons impact fortement la structure des macromolécules, les sites d'action des enzymes et la perte de charge des métabolites qui peuvent alors diffuser en tant que molécules lipophiles non ionisées.

Physiologiquement, la production d'ATP est continuellement renouvelée par la phosphorylation oxydative des mitochondries. Durant l'hypothermie, il y a une diminution des réserves énergétiques [138]. Une méthode optimale de préservation d'organes devrait permettre la maintenance des réserves énergétiques, empêcher la chute des précurseurs de l'ATP et maintenir un certain niveau d'activité métabolique qui dépendrait de la tension en oxygène et de la température. L'hypothermie ralentit la diminution des réserves en ATP mais une activité métabolique basale (10%) est à noter lors de l'ischémie froide [139], générant des dégâts cellulaires sur le long terme.

<sup>h</sup> High aerobic glycolysis in cancers: what does it mean? Ger Bongaerts and Theo Wagener; *Nature Reviews Cancer*; volume 5, page412 (2005)

### 1.3.1.3. Le statut ionique

La déplétion des réserves énergétiques lors de l'ischémie va impacter directement la composition ionique des cellules (**Fig. 13**). De façon naturelle, les ions diffusent librement et sont attirés vers les compartiments à plus faible concentration. Pour contrer ce phénomène les cellules disposent d'un système de transport actif d'ions via des canaux ioniques comme la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Cette pompe hydrolyse l'ATP pour récupérer l'énergie nécessaire à l'import de deux ions potassiques et l'export de trois ions sodiques générant un potentiel de membrane d'environ  $-60\text{mV}$ . L'inhibition de ces transporteurs ioniques lors de l'ischémie due à la chute de la quantité d'ATP va donc induire une dépolarisation de la membrane plasmique entraînant l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants et permettre une accumulation de calcium à l'intérieur des cellules [140, 141].



**Figure 13 : Modification du gradient ionique de cellules cardiaques en ischémie<sup>i</sup>**

<sup>i</sup> Impact of Ischemia on Cellular Metabolism, M Gourdin and P Dubois, 2013, *intechopen*, DOI: 10.5772/54509

L'entrée massive de calcium dans la cellule inhibe la fonction de stockage de calcium du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie renforçant la concentration intracellulaire de calcium [142]. Cette accumulation de calcium dans le cytoplasme et les mitochondries va activer différentes protéases. Les calpaïnes, par exemple, sont des protéases à cystéines pouvant dégrader différents éléments des cellules myocardiques comme les protéines du cytosquelette, des mitochondries et du réticulum [143]. La phospholipase A est également activée par un excès de calcium et contribue au relargage d'acides gras polyinsaturés qui favorise la déstabilisation de la membrane plasmique dans des tissus cérébraux en ischémie [144]. Un excès de calcium intracellulaire altère aussi la structure de certaines enzymes comme la xanthine dehydrogenase en xanthine oxidase qui aura son importance dans la génération de radicaux libres et créera un stress oxydant [145].

De plus, dans le but de limiter l'acidification due à la glycolyse anaérobie, les transporteurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  des cellules s'activent en ischémie pour exclure les protons, ce qui va entraîner une entrée de  $\text{Na}^+$  [146]. Le  $\text{Na}^+$  intracellulaire en excès va à son tour être exclu de la cellule en échange de calcium via les transporteurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  renforçant la concentration calcique intracellulaire. Ces différents échanges ioniques s'accompagnent d'entrée d'eau dans la cellule donnant lieu à des œdèmes cellulaires [147].

#### 1.3.1.4. Dysfonction mitochondriale

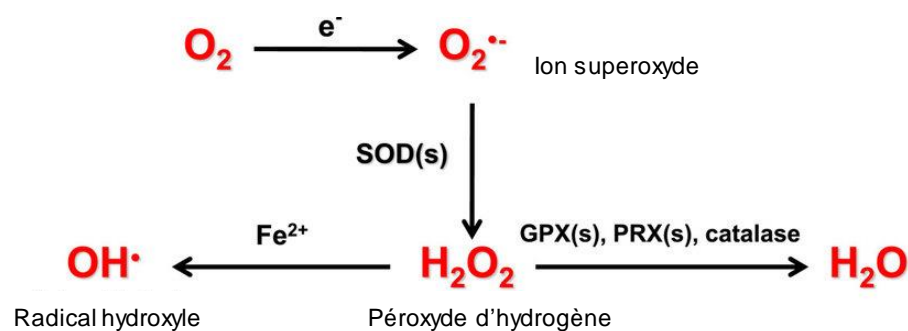
L'inhibition de la phosphorylation oxydative des mitochondries ainsi que l'accumulation intracellulaire de calcium lors de l'ischémie va induire des dysfonctions au niveau de la structure et de la fonction des mitochondries.

##### 1.3.1.4.1. Le stress oxydant

L'équilibre oxydatif d'une cellule résulte d'une balance entre les activités pro- et antioxydantes. L'apparition d'un stress oxydant provient d'un déséquilibre de cette

balance qui peut être liée à une augmentation de la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène, à la diminution des défenses antioxydantes ou des deux.

Les radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène sont des molécules très réactives pouvant potentiellement dégrader directement la structure et la fonction des macromolécules, des lipides membranaires, des protéines et des acides nucléiques. Les radicaux libres dérivent de l'acceptation d'un électron par une molécule d'oxygène qui va former un ion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  réactif [148]. L'ion  $O_2^{\cdot-}$  peut être converti en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) soit par la superoxyde dismutase (SOD) soit par dismutation spontanée. Cependant, le peroxyde d'hydrogène peut se transformer via la réaction de Fenton en présence de métaux de transition, comme les ions ferriques ( $Fe^{2+}$ ), en radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$  beaucoup plus puissant, en particulier à pH faible comme observé en ischémie (Fig. 14). Le peroxyde d'hydrogène peut également réagir avec des hémoglobines ou myoglobines pour former des dérivés ferryl toxiques [149]. Finalement, les radicaux libres peuvent aussi réagir avec l'oxyde nitrique (NO) pour former des dérivés nitrosatifs (stress nitrosatif) comme les anions peroxyxynitrites qui peuvent être protonés et fournir des acides très toxiques (induisant à la fois une oxydation et nitration des éléments cellulaires) [150]. Le peroxyxynitrite est également un effecteur efficace dans la formation d'ions  $OH^{\cdot}$ .



**Figure 14 : Cascade de production de radicaux libres [151]**

#### 1.3.1.4.2. Production de radicaux libres par les mitochondries

Les radicaux libres sont des productions inévitables de la respiration mitochondriale mais la concentration est finement régulée par la superoxyde

dismutase (SOD) en condition physiologique. Lors d'une diminution de l'apport en oxygène, l'activité de la chaîne de transport d'électrons des mitochondries cardiaques est ralentie se dégradant progressivement [152]. Paradoxalement, une production de radicaux libres est toujours observée lors de l'ischémie si une certaine quantité d'oxygène résiduelle est toujours disponible [153]. Il s'avère en effet qu'une chaîne mitochondriale défectueuse facilite la conversion d'oxygène résiduel en ions  $O_2^{\bullet}$  notamment via les complexes I et III [154-156]. Ces radicaux libres vont eux-mêmes aller dégrader les complexes de la chaîne respiratoire et renforcer la perte de production d'ATP.

En revanche, en anoxie complète, il a été montré que la production de radicaux libres cesse dans des myocytes isolés [157]. Un blocage de la chaîne d'électrons lors de l'ischémie de cœur de rat a en effet permis de diminuer la production de radicaux libres [153].

#### 1.3.1.4.3. Défenses antioxydantes

Les cellules disposent d'un large éventail d'antioxydants servant à contrer l'impact des radicaux libres en les transformant en molécules moins toxiques. Ils sont classés généralement en deux groupes : les antioxydants enzymatiques et les non enzymatiques. Les enzymes antioxydantes majeures sont la SOD, la catalase et la glutathione peroxydase. La SOD permet la dismutation des ions  $O_2^{\bullet}$  qui sont les premiers radicaux libres de la chaîne radicalaire et sont donc de première importance. Il existe trois isoformes de cette métalloprotéine : la SOD dépendante du cuivre et du zinc retrouvée dans le cytosol, la SOD dépendante du manganèse retrouvée dans les mitochondries (SOD2) et la SOD retrouvée dans la matrice extracellulaire [158]. La dismutation des ions  $O_2^{\bullet}$  résulte en la génération de peroxyde d'hydrogène. L' $H_2O_2$  est ensuite réduit en eau et en oxygène par la catalase et la glutathion peroxydase (GPx).

Les antioxydants non enzymatiques incluent des composés de faible poids moléculaires comme les vitamines C et E et le glutathion (GSH pour la forme réduite et GSS pour la forme oxydée). La GSH est un tripeptide contenant un groupe thiol,

un important capteur de radicaux libres [159]. Il peut aussi agir avec la GPx et aider à diminuer le niveau de lipide hydro peroxyde.

Il est reconnu que l'hypothermie augmente la production de radicaux libres et diminue les défenses antioxydantes [160]. Leur activation nécessitant peu d'énergie, les radicaux sont moins impactés par l'hypothermie que les procédés enzymatiques eux-mêmes censés lutter contre les radicaux.

Afin de lutter contre les changements cellulaires induits par l'ischémie, les cellules ont la capacité de s'adapter via l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire.

#### 1.3.1.5. Les voies de signalisation cellulaire

##### 1.3.1.5.1. La voie de l'hypoxie

L'ischémie résulte donc en une faible disponibilité en oxygène pour les cellules, perturbant la chaîne de transport d'électrons des mitochondries avec production de radicaux libres. Dans ces conditions les cellules sont capables d'activer des voies adaptatives permettant de modifier le métabolisme de la cellule afin de correspondre à la quantité d'oxygène présent. Le facteur de transcription HIF notamment (Hypoxia Inducible Factor) permet la transition entre un métabolisme aérobie vers un métabolisme anaérobie et l'activation de voies angiogéniques. Il a été observé qu'une chaîne de transport d'électrons fonctionnelle est requise pour la stabilisation de HIF1- $\alpha$ , suggérant que les radicaux libres libérés par les mitochondries sont impliqués [161]. Les mécanismes de stabilisation de HIF1- $\alpha$  par les radicaux libres sont néanmoins peu compris et restent controversées [162].

##### 1.3.1.5.1.1.1. Effet bénéfique de HIF...

HIF est un facteur de transcription qui détecte et coordonne les réponses cellulaires lors d'un manque d'oxygène, se composant de deux sous-unités  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . HIF1- $\beta$  est exprimé constitutivement alors que HIF1- $\alpha$  est

stabilisé par l'hypoxie [163]. HIF1- $\alpha$  est oxydé sur ses groupements prolyl par les PHDs (prolyl hydroxylases) sur son domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD) en présence d'oxygène. Ceci mène à la liaison de HIF1- $\alpha$  à l'E3 ubiquitin ligase von Hippel Lindau pour sa dégradation. Les PHDs perdent leur activité en condition hypoxique, menant à la translocation de HIF1- $\alpha$  dans le noyau pour former un hétérodimère avec HIF1- $\beta$  (Fig. 15). Ce complexe, accompagné de coactivateurs transcriptionnels, va lier les domaines de réponse à l'hypoxie (HRE) sur l'ADN et favoriser la transcription de gènes permettant aux cellules de faire face à l'hypoxie [164]. HIF augmente notamment la transcription d'enzymes glycolytiques et de transporteurs de glucose afin de promouvoir la glycolyse et faciliter la production d'ATP dans des fibroblastes humains [165]. En stimulant la glycolyse, HIF1- $\alpha$  supprime également la fonction mitochondriale et la consommation d'oxygène via l'induction de l'activité de PDK1 inhibitrice de la pyruvate déshydrogénase. Ceci permet d'éviter la consommation de pyruvate par le cycle de Krebs.

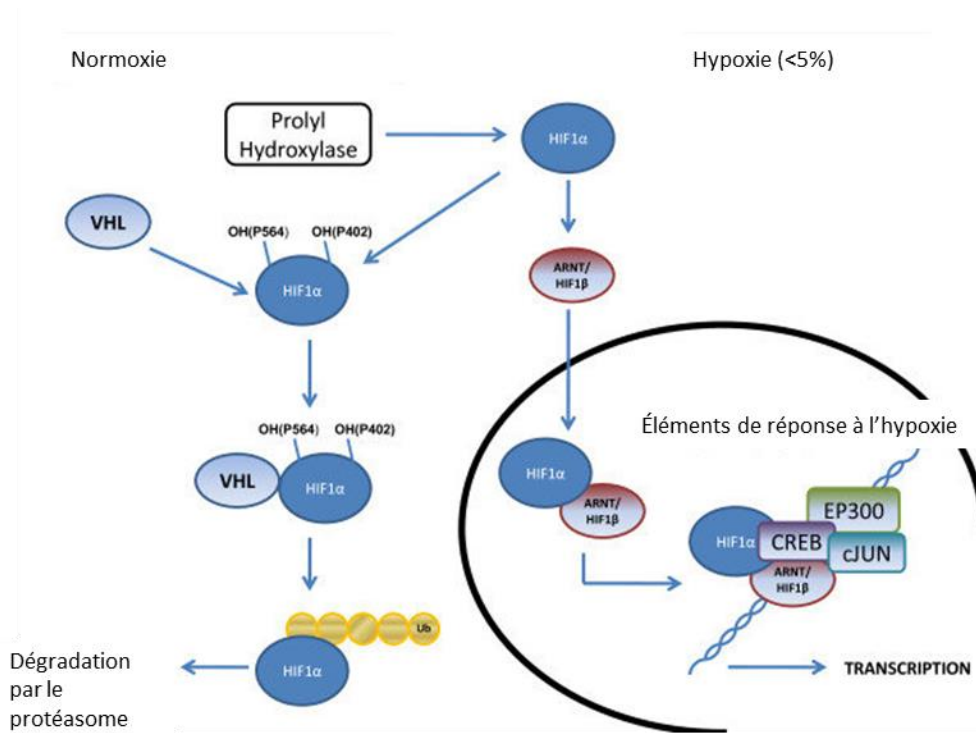
En plus de ces effets métaboliques, HIF permet la transcription de gènes d'antioxydants comme le glutathion. HIF1- $\alpha$  apparaît étant la forme la plus active lors d'hypoxie intense ou d'anoxie (0,1% O<sub>2</sub>) dans certaines lignées cellulaires, alors que HIF2- $\alpha$  est plutôt actif à des hypoxies plus physiologiques (5%) [166]. La suppression du gène HIF1- $\alpha$  dans des îlots humains a résulté en une augmentation de l'apoptose et une diminution des réussites de greffe d'îlots dans des souris immunodéprimées, démontrant un rôle physiologique important de ce facteur de transcription [167].

#### 1.3.1.5.1.1.2. ...ou délétère ?

HIF lui-même est reconnu pour avoir des effets à la fois pro-et antiapoptotiques avec des hypoxies prolongées résultant en l'apoptose [168]. HIF a également un rôle dans la régulation de l'inflammation avec induction de cytokines comme le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). L'effet bénéfique ou délétère de l'activation de HIF lors de la transplantation d'organe est donc encore controversé. Il a été montré que l'activation de HIF chez l'organe donneur prolonge la survie lors de la transplantation de rein chez le rat [169]. Aucune étude n'a été validée sur l'Homme. Des précautions sont à prendre sur l'utilisation d'activateur de la voie HIF

car une surexpression a été associée à de la fibrose rénale ainsi qu'à des lésions ischémiques plus importantes après transplantation de poumons de rats [170]. Il apparaît que toutes les voies potentiellement activables par HIF ne sont pas bénéfiques et peuvent varier au cours du temps.

Un rôle pro-apoptotique de HIF a également été mis en évidence chez des îlots de rats et humains cultivés en hypoxie [171]. La stabilisation de HIF pourrait avoir un effet protecteur dans un premier temps puis mener à la mort cellulaire si le stress hypoxique venait à perdurer. En effet, une activation transitoire de son expression a permis une meilleure survie des îlots transplantés en activant leur vascularisation [172].



**Figure 15 : Voies de régulation du facteur de transcription HIF<sup>j</sup>**

#### 1.3.1.5.2. Les protéines kinases

Les protéines kinases sont des éléments clés de voies de signalisation intracellulaires activées par une large variété de stimulus dont l'ischémie, l'hypoxie et

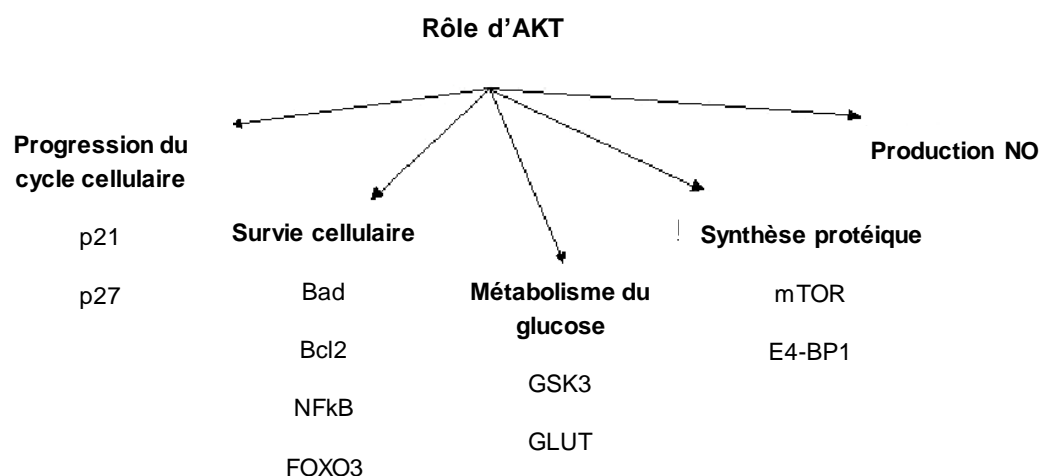
<sup>j</sup> <http://tcr.amegroups.com/article/view/11327/9862#B2>



le stress oxydant. Une phosphorylation anormale de ces protéines peut contribuer à la mise en place de dommages et même mener à la mort cellulaire. De plus en plus d'études démontrent le rôle régulateur important de ces protéines lors de l'ischémie. Des méthodes d'activation ou d'inhibition de ces kinases pourraient permettre de limiter les dommages liés à l'ischémie.

### 1.3.1.5.2.1.1. La voie PI3K/AKT

Les cellules peuvent donc s'appuyer sur des voies compensatrices de survie cellulaire dans le but de lutter contre les effets de l'ischémie. Des études ont montré que la voie de signalisation phosphoinositide 3-kinase/AKT (PI3K/AKT) est impliquée dans la réponse à l'ischémie via l'activation de protéines associées à la survie cellulaire ainsi que l'inactivation de protéines pro-apoptotiques [173]. La phosphorylation d'AKT permet la phosphorylation de molécules sous-jacentes comme les protéines anti-apoptotiques de la famille B cell lymphoma 2 (Bcl2) ou encore Forkhead box O3A (FOXO3A) dans le but d'inhiber l'apoptose et d'augmenter la biogénèse mitochondriale [174] (**Fig. 16**). Cependant, les capacités de défense des cellules en ischémie sont rapidement dépassées favorisant la mise en place de programmes de mort cellulaire. L'expression de Bcl2, un inhibiteur de l'apoptose est ainsi diminué, alors que Bax, qui favorise l'apoptose, est augmenté dans des cerveaux ischémiés de rat [175].



**Figure 16 : Conséquences de l'activation de la kinase AKT [176]**

#### 1.3.1.5.2.1.2. Les MAPK

Les MAPK sont des sérine-thréonine kinases comportant notamment p38, JNK et ERK.

#### 1.3.1.5.2.1.3. Les voies de réponse au stress cellulaire

p38 et JNK ont un rôle central dans l'inflammation mais aussi dans la régulation de la prolifération, de l'apoptose et sont activées par la plupart des même stimulus (stress oxydant, inflammation...) (**Fig. 17**). L'activation de ces deux MAPKs peut rapidement aboutir à l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  ou IL1 $\beta$  dans une lignée de cellules cancéreuses pulmonaires de rat [177]. p38 et JNK peuvent également se localiser dans les mitochondries, phosphoryler et inactiver les Bcl2 anti-apoptotiques et activer des Bcl2 pro-apoptotiques dans une lignée de cellules de glandes surrénales de rat [178, 179]. L'activation de JNK a été reportée dans de multiples organes mais son rôle délétère ou protecteur reste encore controversé.

La MAPK p38, plus particulièrement, peut être fortement activée par les radicaux libres. Une activation de la voie p38 dans des tissus de cerveau ischémiés a montré un rôle important dans la phosphorylation d'enzymes intracellulaires, de facteurs de transcription et de protéines cytosoliques impliqués dans l'apoptose et la production de cytokines pro-inflammatoires [180].

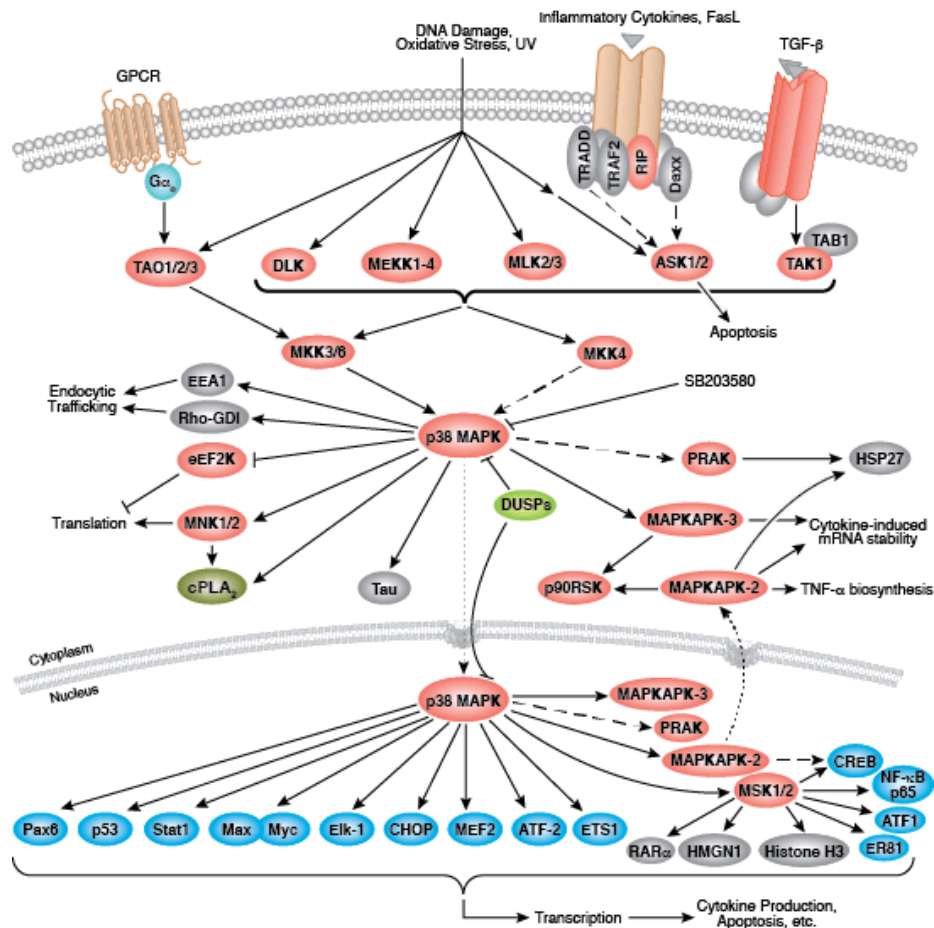


Figure 17 : Rôle central de la MAPK p38 dans l'inflammation et l'apoptose<sup>k</sup>

#### 1.3.1.5.2.1.4. La voie de survie ERK

ERK1 et ERK2 sont des régulateurs importants de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaire. Le rôle précis de ERK est plus complexe mais il est assimilé que son activation aurait un effet protecteur dans la lutte contre l'ischémie dans le myocarde [181, 182].

<sup>k</sup> <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways/map-kinase-signaling-resources/science-pathways-mapk>

### 1.3.1.6. La mort cellulaire

Tous ces changements perturbant l'équilibre de la cellule vont aboutir à la mise en place de la mort cellulaire par nécrose et/ou apoptose lors de l'ischémie.

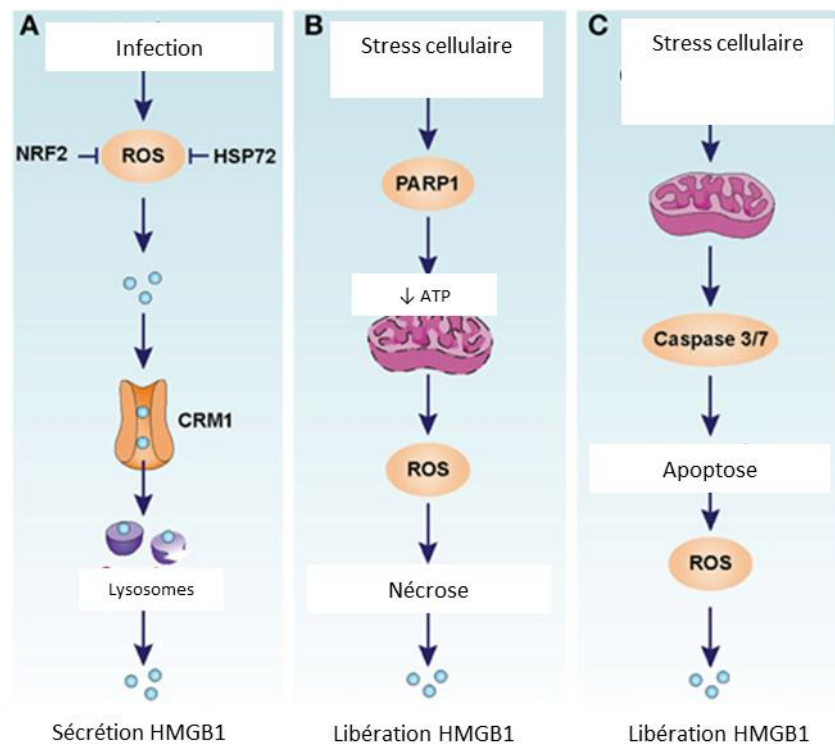
#### 1.3.1.6.1. La nécrose

La nécrose est une forme de mort cellulaire caractérisée par une perméabilité de la membrane plasmique et le gonflement de la cellule et des organelles par l'entrée d'eau. Ceci aboutit à une dysfonction des mitochondries, une fragmentation de la chromatine, une rupture de la membrane plasmique ainsi qu'un relargage du contenu intracellulaire aboutissant à l'initiation de réactions inflammatoires. La nécrose a lieu lorsque les cellules subissent un stress environnemental trop important et induit un large spectre de réponses inflammatoires *in vivo* [183]. Pendant longtemps, il a été admis que la nécrose était un phénomène uniquement passif et non régulé. De plus en plus d'études ont cependant décrit une forme programmée de nécrose : la nécroptose. Il s'agit d'une forme de nécrose induite par un relargage de signaux de danger DAMPs (Danger associated molecular pattern) et qui induisent des conséquences similaires à la nécrose. Une induction de nécrose et de fragmentation de l'ADN est retrouvée dans des hépatocytes préservés à 4°C [184].

Parmi les DAMPs, on retrouve l'HMGB1 (High mobility group box 1). Il s'agit d'une protéine nucléaire liant l'ADN et augmente la transcription de certains gènes. Lors de la nécrose, l'acide nucléique et les membranes sont déstabilisés. Une élévation de la quantité de HMGB1 dans le cytoplasme et/ou dans le milieu extracellulaire révèle donc la présence de processus nécrotique (**Fig. 18**). Des niveaux élevés de HMGB1 ont été corrélés avec des dégâts plus importants de l'ischémie sur le cœur de rat [185]. La libération de HMGB1 peut activer TLR4 (Toll-like receptor) et induire une stimulation des voies inflammatoires dans les lymphocytes régulateurs [186]. Les TLR sont un des groupes de récepteurs qui sont impliqués comme médiateurs dans l'inflammation. L'exposition des îlots à l'hypoxie

augmente la sécrétion de HMGB1 et la présence de HMGB1 est impliquée dans la perte précoce des îlots après transplantation [187].

Une étude a montré que l'inhibition de la necroptose réduisait l'expression de HMGB1 dans des greffons cardiaques [188]. Une autre étude a montré qu'une inhibition de la libération de HGMB1 protège le foie des lésions liées à l'ischémie—reperfusion [189]. Toutes ces données indiquent que HMGB1 participe au rejet aigue du greffon et accélère le rejet.



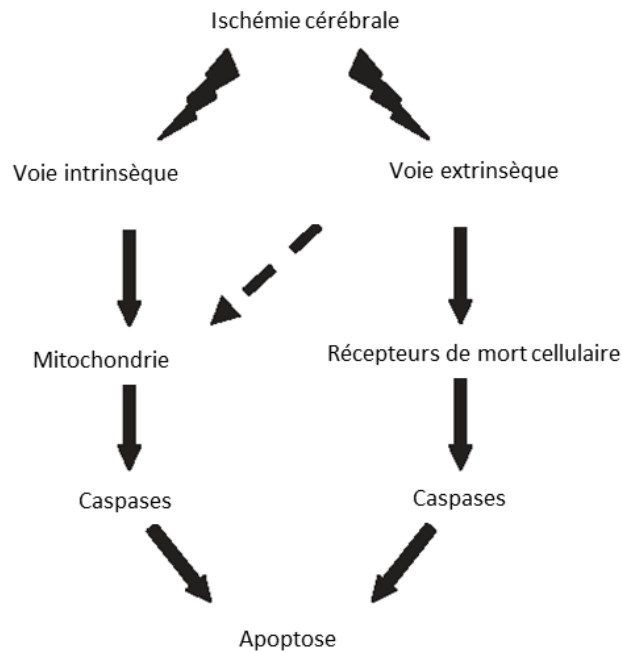
**Figure 18 : Causes de libération de l'HMGB1 [190]**

#### 1.3.1.6.2. L'apoptose

L'apoptose est un mode de mort cellulaire programmé qui prend place en présence d'ATP d'où une plus faible incidence que la nécrose lors de l'ischémie. Les mécanismes apoptotiques sont répartis en deux voies (**Fig. 19**). La voie extrinsèque dépend de l'activation de récepteurs spécifiques tels que les récepteurs Fas, TNF et Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) [191]. L'augmentation de la production de  $TNF\alpha$  va induire l'activation de cette voie et

induire le recrutement de protéines contenant des domaines de mort (Fas-associated protein with death domain (FADD), Tumor necrosis factor receptor type1-associated death domain protein (TRADD)). Ces molécules adaptatrices vont recruter la pro-caspase 8 qui est elle-même capable d'activer à son tour les caspases effectrices 3 et 7.

La voie intrinsèque provient d'une déstabilisation de la membrane mitochondriale [192]. Les radicaux libres peuvent induire la libération de cytochrome c et de facteurs pro-apoptotiques activant les caspases et l'apoptose. L'oxydation de la cardiolipine présente dans la membrane mitochondriale induit la rupture de sa liaison avec le cytochrome c et donc la libération du cytochrome [193]. Les pores de transition de perméabilité des mitochondries (mPTP) sont des pores non sélectifs localisés dans la membrane mitochondriale interne. Leur ouverture dépolarise la mitochondrie impactant la phosphorylation oxydative et donc la production d'ATP. Ceci peut mener également à la libération de cytochrome c et AIF (apoptosis inducing factor) capables d'activer des mécanismes de mort cellulaires dépendantes ou indépendantes de caspases. La structure précise des mPTP reste peu claire et leur ouverture peut avoir lieu lors de l'ischémie et est exacerbé lors de la reperfusion. Des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2 ont été reportées dans des hépatocytes en hypoxie [194]. Une préservation prolongée de pancréas de porc dans l'UW a montré une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans le greffon après transplantation [195].



**Figure 19 : Schéma simplifié des voies d'apoptose activées lors d'une ischémie cérébrale [196]**

### 1.3.2. Sensibilité des îlots à l'hypoxie

Les îlots sont grandement impactés par l'hypoxie et sont confrontés à des conditions hypoxiques tout au long de la transplantation d'îlots (préservation du pancréas, isolement, culture et transplantation). En condition physiologique, les îlots reçoivent environ 15% du flux sanguin de l'artère alors qu'ils ne représentent que 2% de la masse pancréatique totale. Cet important apport d'oxygène permet de satisfaire les besoins métaboliques des îlots dans le but de maintenir leur activité physiologique [10].

Une anémie chronique ou aiguë (diminution de l'apport en oxygène) a été rapportée comme altérant la fonction des cellules  $\beta$  *in vivo*. L'anémie est en effet capable d'induire une élévation de la glycémie et une diminution de la fonctionnalité des îlots sur des fœtus de mouton [197]. D'autre part, l'exposition de rats nouveau-nés à des séquences intermédiaires d'hypoxie (10,3 vs 20,8 % d'oxygène d'inhalation toutes les 7 minutes pendant 5h) induit une glycémie plus élevée ainsi qu'un niveau de peptide C moins élevé même trois semaines après l'expérience [198]. Ces résultats démontrent l'importance d'un apport en oxygène dans le but de

maintenir la fonction des îlots *in vivo* et qu'une diminution de la pression partielle en oxygène mène à une dysfonction des cellules  $\beta$ .

Des conditions hypoxiques peuvent également être induites *in vitro* après isolement des îlots en les cultivant à une faible pression d'oxygène (entre 1 et 5%) ou en augmentant le nombre d'îlots cultivés sur une surface restreinte de culture dans un environnement atmosphérique normal (21% d'oxygène). Les îlots vont entrer en compétition pour l'accès à l'oxygène résultant en la création d'un stress hypoxique. Des études sur des îlots de rats et humains ont montré qu'une diminution de la pression partielle en oxygène et/ou une augmentation de leur densité en culture diminuait la viabilité et la fonctionnalité des cellules  $\beta$ . Ces phénomènes étaient également associés à une augmentation du statut pro-inflammatoire des îlots (production de COX1 et d'interleukine 6) [199].

Les mécanismes de l'altération de la fonction des cellules  $\beta$  en hypoxie sont attribués à la transition du métabolisme aérobie vers la glycolyse anaérobie. Le lactate, un marqueur classique de l'hypoxie, a en effet été retrouvé dans les îlots et dans le milieu de culture après 24h à 3% d'oxygène en parallèle d'une diminution de la sécrétion d'insuline [200]. La voie HIF semble intervenir dans ces mécanismes car les principaux gènes impliqués dans la glycolyse et induits par l'hypoxie sont en effet des cibles de ce facteur de transcription. Une diminution de l'expression des gènes associés à la sécrétion d'insuline a également été observée chez des îlots de souris exposés à 5% d'oxygène pendant 16 à 30h [201]. De plus, les transporteurs de zinc dans les cellules  $\beta$  (ZIP8) étaient sous-exprimés en hypoxie pouvant représenter une cause de la dysfonction des cellules  $\beta$  observées [202].

L'hypoxie impacte l'expression des transporteurs de glucose avec notamment une diminution de l'expression de GLUT2 dans les cellules  $\beta$  [203]. La diminution de l'ATP produit par les cellules  $\beta$ , résultant de l'inhibition de l'entrée de glucose, serait à l'origine de l'inhibition de l'exocytose des granules d'insuline en condition stimulée.

L'hypoxie augmente également la mort des îlots. Une apoptose massive est observée dans des îlots cultivés en hypoxie avec un marquage positif de la fragmentation en ADN et l'activation de caspase 3 [171]. Une mort cellulaire par nécrose est également observée et mise en évidence par l'apparition de nécrose centrale (spécifiquement dans les îlots les plus gros) s'accompagnant d'une



libération de LDH (lactate déshydrogénase), signe de lyse cellulaire [204]. Il apparaît que les cellules  $\beta$  montrent plus d'apoptose que les cellules  $\alpha$  dans des îlots de rat [205]. L'implication du stress oxydant dans la mort des cellules a été mise en évidence par le fait que l'utilisation d'antioxydants limite la mort cellulaire [206]. Les cellules  $\beta$  comportent peu d'enzymes antioxydantes et sont donc très sensibles à une élévation de ce stress.

### 1.3.3. La phase de reperfusion

La phase de reperfusion est définie comme la restauration de la circulation sanguine et donc de l'apport en oxygène et en nutriments à l'organe. Cette phase de reperfusion est plus difficile à appréhender dans le cas de la transplantation d'îlots au vue de l'étape d'isolement supplémentaire qui se rajoute par rapport aux autres organes. Ainsi les îlots subissent avant même la transplantation chez le receveur une reprise de leur activité métabolique à 37°C avec un accès à l'oxygène (certes plus faible qu'en condition physiologique) et aux nutriments du milieu de culture.

Paradoxalement, ce retour à une situation physiologique normale, est délétère pour des cellules ayant subi une phase d'ischémie. Les mécanismes liés à la reperfusion sont au même titre que ceux de l'ischémie d'une grande complexité. On distingue notamment une forte génération de radicaux libres suite à la réintroduction d'oxygène et le retour à un métabolisme aérobie, à une élévation de la concentration intracellulaire de calcium [142]. La surcharge calcique et de radicaux libres vont entraîner directement une ouverture des mPTP des mitochondries. L'ouverture de ces pores entraîne une perméabilité de la membrane interne des mitochondries qui s'accompagne d'une perte du gradient transmembranaire ainsi que d'une libération de molécules pro-apoptotiques dans le cytoplasme, engendrant la mort cellulaire. Agir sur les mitochondries représente donc une option thérapeutique de choix afin de lutter contre les effets de l'ischémie-reperfusion. Il a par exemple été montré que la cyclosporine, qui est capable d'inhiber l'ouverture des mPTP, permet de réduire la mort cellulaire de cellules  $\beta$  INS-1 induite par une forte concentration de glucose [207]. D'un point de vue clinique, la cyclosporine permet de réduire la taille de l'infarctus en clinique après une intervention coronarienne [208].

Les produits de dégradation de l'ATP représentent également une autre source de stress oxydant. Lors de la reperfusion, l'oxydation de l'hypoxanthine et xanthine, accumulés lors de l'ischémie, en acide urique s'accompagne en effet d'une production d'ions  $O_2^{\bullet}$  participant à l'augmentation du stress oxydant. Les calpaïnes (protéases à cystéines pouvant dégrader différents éléments de la cellule comme les protéines du cytosquelette, des mitochondries et du réticulum [143]) activées par le calcium mais inhibées par le pH acide pendant l'ischémie, vont être pleinement actives au moment de la reperfusion et de la neutralisation du pH [209].

Nous comprenons alors que préserver au mieux la qualité des cellules lors de l'ischémie permettrait de réduire les dégâts infligés lors de la reprise de l'activité métabolique des îlots après isolement et transplantation.

**Tout organe en transplantation subit inévitablement des lésions liées à l'ischémie-reperfusion et le cas de la transplantation d'îlots ne fait pas exception. Le pancréas et les îlots souffrent tout d'abord de l'arrêt de l'apport en oxygène et en nutriments dû à l'arrêt de la circulation sanguine du donneur. L'ischémie chaude est connue pour induire une cascade d'événements dans les cellules cardiaques (Fig. 20) qui représentent un modèle très étudié des effets de l'ischémie. Ainsi l'arrêt de l'apport en oxygène inhibe rapidement la production mitochondriale d'ATP. Cette perte d'énergie cellulaire aboutit au dysfonctionnement des mitochondries, à une modification du gradient ionique intracellulaire et à la mise en place de stress oxydatif résultant inévitablement en la mort des cellules si la circulation sanguine n'est pas reconnectée. Les cellules ayant souffert de la phase ischémique ont un métabolisme modifié et, paradoxalement, la reconnexion à la circulation sanguine du receveur induit une explosion de stress oxydant et l'initiation de programme de mort cellulaire comme l'apoptose. Les dégâts liés aux phénomènes d'ischémie-reperfusion peuvent mener à des retards de prise de fonction ou des rejets de prise de greffe après transplantation. Dans le cas particulier de la transplantation d'îlots, les îlots sont isolés du pancréas puis cultivés à 37°C avant transplantation chez le patient. Il est donc difficile de décrire une phase réelle de reperfusion, les îlots vont donc subir plus de contraintes dues à la**

technique d'isolement qu'un organe solide en transplantation. Plus les cellules subissent un temps long d'ischémie, plus les cellules souffrent lors de la phase de reperfusion. Afin de ralentir ces processus délétères, le pancréas est préservé en hypothermie à 4°C et placé dans des milieux permettant un maintien de la survie cellulaire.

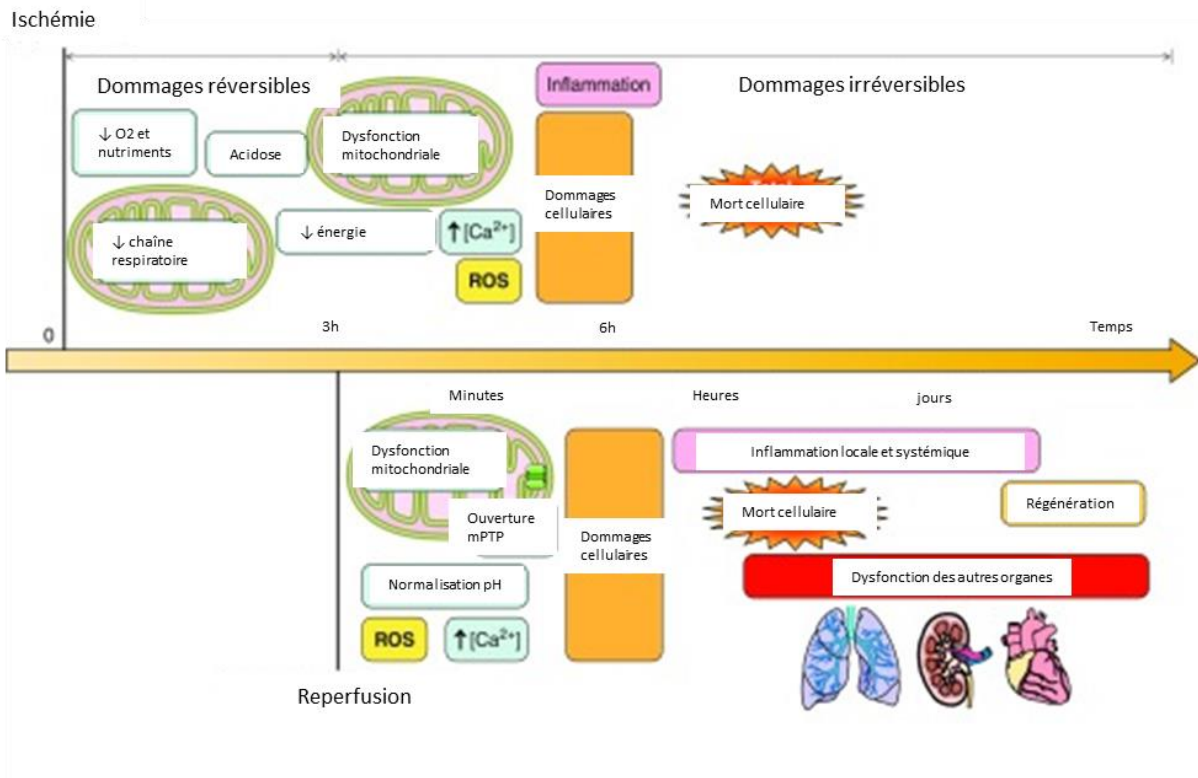


Figure 20 : Mise en place progressive des lésions ischémiques dans les cellules cardiaques [127]

#### 1.4. Méthodes de préservation des organes

La conservation d'un organe en hypothermie et en statique représente la méthode de préservation d'organe la plus simple, la moins couteuse et donc la plus utilisée dans le monde. La température du donneur est abaissée par injection intraveineuse de la solution de préservation à 4°C puis les organes sont simplement conservés dans une solution de préservation et à 4°C afin de limiter les dégâts liés à l'ischémie.

#### 1.4.1. Les solutions de préservation

La phase d'ischémie froide aboutit donc à des changements radicaux et extrêmement toxiques pour les cellules se traduisant par une perte de l'intégrité tissulaire et des dysfonctions de reprise du greffon. Les conditions de conservation des organes, et notamment les solutions de préservation, ont un rôle primordial pour le maintien de la qualité du greffon et pour la réussite de la greffe à court et long terme.

Une solution de préservation optimale doit donc aider l'organe à lutter contre les phénomènes délétères induits par l'ischémie :

- La diminution des réserves énergétiques
- Le déséquilibre ionique intracellulaire
- La formation de radicaux libres
- La désorganisation des membranes mitochondriales et cellulaires
- L'apparition d'un statut pro-inflammatoire
- La mise en place de programme de mort cellulaire (nécrose, apoptose)

#### 1.4.2. Historique des solutions de préservation

La première solution de préservation à entrer sur le marché a été la solution Collins en 1967 et a montré des résultats satisfaisants pour la préservation du rein, du cœur, du foie et du poumon [210]. Collins a eu pour idée de recréer les conditions ioniques intracellulaires (solution hyperpotassique avec peu de Na<sup>+</sup>). Certains composés de la solution Collins se sont cependant révélés toxiques (néphrotoxicité de la procaïne par exemple). La solution a alors été modifiée en Euro-Collins via le retrait de certains composants jugés toxiques pour les organes [211].

#### 1.4.2.1. L'UW : un tournant dans la préservation d'organes...

En 1988, une nouvelle solution a fait son apparition : l'University of Wisconsin solution (UW) qui a montré un allongement de la durée d'ischémie froide de foie de rat [212]. Les composants majeurs de l'UW sont l'acide lactobionique et le raffinose servant d'agents osmotiques, un colloïde (l'hydroxyethyl starch, HES), un tampon phosphate, du glutathione et de l'allopurinol comme antioxydants et de l'adénosine (un précurseur de l'ATP).

La formation d'œdème intracellulaire due à l'entrée de sodium dans les cellules et qui s'accompagne de molécule d'eau participent au gonflement intracellulaire. La présence de molécules exerçant une pression osmotique dans la solution de préservation est donc primordiale afin de limiter au maximum le gonflement des cellules [213]. Le gonflement des cellules entraîne un gonflement de la mitochondrie qui s'accompagne d'un dysfonctionnement du métabolisme aérobie, d'une augmentation de la production de radicaux libres et de la destruction des membranes cellulaires. Les imperméants et les colloïdes, de par leur haut poids moléculaire, permettent de lutter contre la formation de ces œdèmes. Les imperméants peuvent être des sucres (glucose, raffinose) ou des anions (acide lactobionique, citrate). Les colloïdes (HES (Hydroxyéthyl-starch), PEG (polyéthylène glycol)) qui sont d'un poids moléculaire encore plus importants que les imperméants ne peuvent pas passer la membrane cellulaire.

L'ajout d'aprotinine dans l'UW a montré une amélioration de la préservation de poumon de rat via son activité anti-protéolytique et stabilisatrice de membrane [214]. L'utilisation de cette solution de préservation marque un tournant permettant d'améliorer le temps de conservation des organes en ischémie ainsi que les résultats immédiats de la greffe rénale, hépatique et pancréatique [215]. L'UW est depuis devenu la solution de référence pour les organes intra-abdominaux.

#### 1.4.2.2. ...Mais qui reste perfectible

Cependant, de nombreuses études expérimentales ont depuis fait état du caractère perfectible des solutions intracellulaires. Des études ont en effet montré

que des solutions de type extracellulaire (haute concentration en Na<sup>+</sup> et faible en K<sup>+</sup>) donnent de meilleurs résultats [216]. Il a été démontré qu'une solution de préservation de type extracellulaire était supérieure pour la préservation de reins porcins et la réussite de la greffe [216]. De la même façon, la solution IGL-1<sup>®</sup> a montré des résultats intéressants en préclinique pour la conservation de foie porcine par rapport à l'UW mais sans montrer d'avantages particuliers en clinique [217]. La forte concentration en potassium des solutions intracellulaires perturberait l'équilibre ionique de part et d'autre de la membrane accélérant le fonctionnement des pompes ioniques afin de rétablir une concentration ionique physiologique. Ces pompes étant ATP dépendantes, vont accélérer la réduction des réserves énergétiques déjà faibles lors de l'ischémie.

Il existe depuis l'invention de l'UW d'autres solutions de préservation. C'est le cas de la solution HTK (Histidine tryptophane ketoglutarate) comme le Custodiol<sup>®</sup>. Cette solution était utilisée au départ comme solution pour la préservation du cœur. Elle contient un puissant tampon (histidine), un stabilisateur de membrane (tryptophane) et un substrat énergétique (ketoglutarate). La solution Celsior<sup>®</sup> combine les forces de l'UW et de l'HTK. Elle a notamment été démontrée efficace pour la préservation du cœur [218].

#### 1.4.3. Préservation du pancréas

Des études sur l'animal ont montré que les solutions de type extracellulaire et contenant du PEG comme colloïde étaient supérieures à l'UW classique. Ainsi la préservation de pancréas de porcs dans la solution SCOT15<sup>®</sup> a permis d'améliorer les rendements en îlots comparé à l'UW et au CMRL1066<sup>®</sup> [219].

En revanche les études cliniques concernant l'efficacité de ces différentes solutions de préservation sur le pancréas ne permettent pas de dégager de tendance claire. Hubert *et al.* ont montré un rendement plus faible en îlots avec le Celsior<sup>®</sup> par rapport à l'UW [220]. Alors qu'une autre étude n'a pas montré de différences entre l'UW, le Celsior<sup>®</sup> et l'IGL-1<sup>®</sup> en clinique [221]. Une étude japonaise a montré qu'une solution de type extracellulaire (Kyoto solution) contenant du tréhalose améliorerait

significativement les rendements en îlots pancréatiques humains [222]. L'absence de résultats claires sur l'efficacité d'une ou l'autre solution pour la préservation de pancréas fait que l'UW est encore considérée comme la solution de préservation standard en clinique à l'heure actuelle.

Nous nous apercevons que cette étape d'ischémie froide à 4°C a permis la démocratisation de la transplantation d'organes mais que malgré les efforts fournis dans la création de solutions de préservation efficaces, les organes sont toujours soumis aux lésions d'ischémie-reperfusion qui impactent négativement la qualité des organes, le nombre d'organes disponibles pour la transplantation ainsi que la réussite de la greffe. Les améliorations apportées ne sont alors certainement pas suffisantes et doivent être poussées plus loin.

### **1.5. Stratégies d'amélioration de la qualité du pancréas**

L'amélioration des voies de survie cellulaire lors de la préservation d'organe pourrait permettre de retarder l'apparition des lésions due à l'ischémie. Il a par exemple été montré que la préservation de reins porcins en hypothermie et par une machine de perfusion réduisait la dégradation d'ATP et augmentait l'activation de marqueurs anti-apoptotiques comme AKT et ERK [223].

Outre le fait d'améliorer les voies de survie cellulaire, inhiber les voies de stress cellulaires pourrait également permettre d'améliorer la qualité du greffon lors de l'ischémie froide. L'utilisation d'un inhibiteur de p38 dans la solution de conservation de reins porcins a montré une amélioration de la viabilité du greffon [224]. L'injection dans le pancréas d'inhibiteur de JNK avant la préservation de pancréas a réduit l'apoptose des îlots et amélioré la fonction du greffon (porc et humain) [225, 226]. Une étude a également montré que l'utilisation de siRNA (small interfering RNA) pour bloquer l'apoptose prolonge la période de conservation à 4°C et préserve le cœur dans un modèle porcine [227].

Enfin, l'utilisation d'antioxydants pour améliorer la lutte contre les radicaux libres semble également primordiale. Par exemple, il a été montré que les muscles squelettiques oxydatifs sont en effet capables de mieux résister aux dégâts infligés

par l'ischémie-reperfusion que les muscles squelettiques glycolytiques en raison de leur réserve plus importante en antioxydants [228].

Nous allons voir deux stratégies qui ont montré des résultats prometteurs sur d'autres organes et présentent le potentiel de permettre une amélioration de la capacité du pancréas à lutter contre l'ischémie. Nous verrons dans un premier temps un préconditionnement à l'ischémie chez le donneur avant prélèvement de l'organe et un conditionnement de l'organe lors de la conservation à 4°C via l'utilisation d'un transporteur d'oxygène couplé à une activité antioxydante dans un second temps.

### 1.5.1. Le préconditionnement à l'ischémie

Le préconditionnement à l'ischémie consiste à l'application de cycles d'ischémie-reperfusion d'un organe via un clampage/déclampage de la circulation sanguine. Un tel processus permet d'habituer l'organe en question à des phénomènes d'ischémie-reperfusion et d'augmenter ses capacités de défense endogène.

#### 1.5.1.1. Le préconditionnement direct à l'ischémie

En 1983, Murry *et al.* ont montré que 4 cycles de 5 min d'occlusions et reperfusion de l'artère coronarienne gauche appliqué avant 90min d'occlusion et 3 jours de reperfusion résultait en 75% de réduction dans la taille de l'infarctus du cœur chez le chien [229]. Ce phénomène a été nommé préconditionnement direct à l'ischémie.

Le préconditionnement induit deux fenêtres de cardioprotection. La première a lieu 2 à 3h après le stimulus avant de disparaître et implique l'activation directe de protéines. La seconde fenêtre apparaît entre 48 et 72h plus tard et implique la transcription de gènes spécifiques [230].

Les effets moléculaires restent peu compris malgré l'identification d'un certain nombre de voies de signalisation impliquées. Le stimulus initie la production d'autocoïdes, adénosine, bradykinine...) par les cardiomyocytes [231, 232]. Ces



molécules lient alors des récepteurs spécifiques sur les membranes plasmiques des cardiomyocytes voisins afin d'induire des voies de signalisation qui stimulent notamment la mitochondrie. La mitochondrie réagirait par une production de radicaux libres capables d'activer certaines protéines kinases comme AKT et ERK. Dans la phase longue de protection, les protéines kinases activeraient certains facteurs de transcription (HIF1- $\alpha$ , Nuclear factor-kappa B (NFkB), nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2)) qui facilitent la synthèse de molécules cytoprotectrices (Heat shock proteins (HSP), inducible nitric oxide synthase (iNOS)) induisant un effet cardioprotecteur 12 à 24h après le stimulus [233]. Des hypothèses stipulent qu'une préservation de la mitochondrie avec moins de calcium intracellulaire, de production de radicaux libres et une inhibition des mPTP pourraient contribuer à l'effet protecteur [234].

#### 1.5.1.2. Le préconditionnement à distance à l'ischémie

Le désavantage majeur de ce préconditionnement direct est la difficulté d'une intervention chirurgicale directe au niveau de l'organe. La possibilité d'obtenir un effet protecteur via l'application d'un stimulus sur un organe ou un tissu à distance a été testé. En 93, Pryklenk *et al.* montrent que l'application d'un stimulus sur une artère coronaire pouvait induire des effets protecteurs sur d'autres organes [235]. On parle alors de préconditionnement à distance. Les mécanismes d'action restent peu connus (**Fig. 21**). Des études suggèrent que bon nombre de similitudes pourraient être faites avec le préconditionnement direct. La façon de déclencher ces voies de signalisation pourrait être cependant différente. Des études montrent en effet l'implication d'une voie neuronale et humorale [236]. Ainsi, la reperfusion de l'organe préconditionné à distance était nécessaire pour obtenir l'effet protecteur, suggérant une libération de facteurs dans le sang qui atteindraient le cœur. Dans une autre étude, le sang d'un animal préconditionné réduisait la taille de l'infarctus quand ils étaient transfusés chez un lapin non préconditionné confirmant l'hypothèse [237]. D'autre part, l'utilisation de bloqueur de ganglions, la résection d'innervation neurale des membres ou la résection du nerf vagal qui fournit le cœur ont montré un effet moins important du préconditionnement à distance suggérant également l'implication de voies neuronales [238]. La stimulation des voies neuronales semble être induite

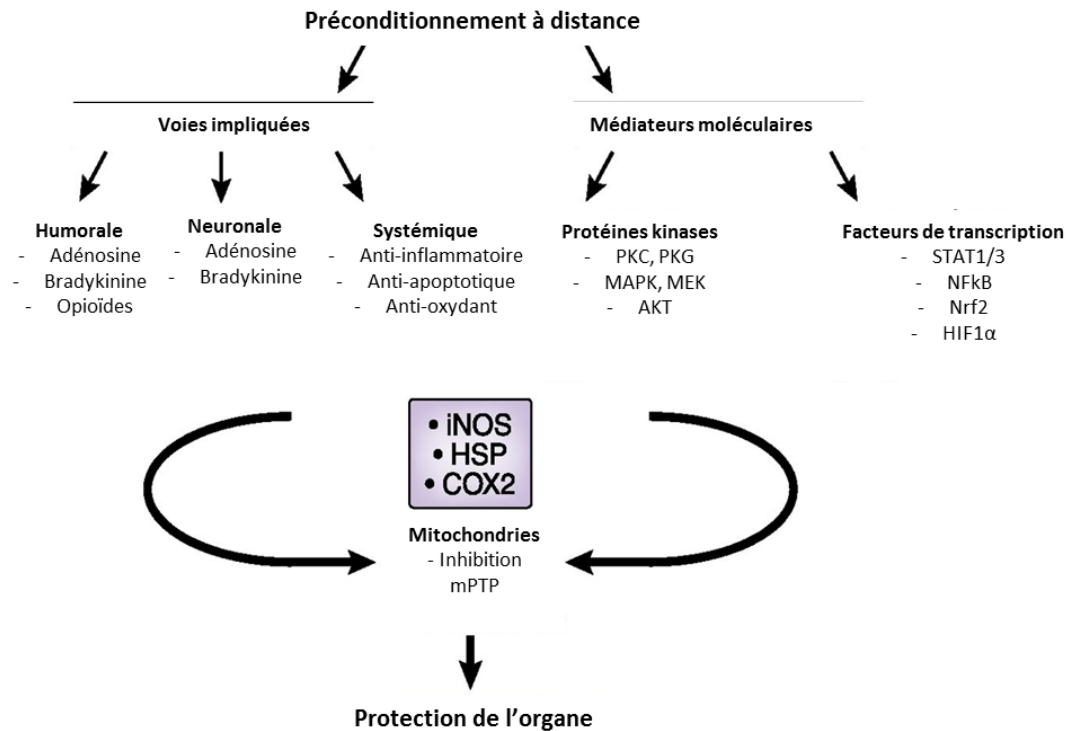
par les autocoïdes comme l'adénosine et la bradykinine. L'analyse protéomique de plasma d'animaux préconditionnés n'a pas permis l'identification de facteur cardioprotecteur bien que des études laissent suggérer qu'il existe, qu'il est thermolabile, hydrophobe et dispose d'un faible poids moléculaire (3-8 kDa) [239].

Un préconditionnement à distance permet d'améliorer la fonction respiratoire des mitochondries [240, 241], de réduire la production de radicaux libres, de préserver les réserves d'ATP lors de l'ischémie et d'inhiber l'ouverture des pores de perméabilités mitochondriaux [242-244] dans d'autres types cellulaires. PGC1 $\alpha$  est capable d'interagir avec une vingtaine de facteurs nucléaire (NRF1/2 ; FOXO3A...) afin de lier l'ADN et d'activer la transcription de gènes impliqués notamment dans la biogénèse mitochondriale, l'activation des défenses antioxydantes [245]. Cette protéine est capable d'induire une tolérance à l'ischémie dans le foie [246]. Un des rôles de la PGC1 $\alpha$  est également d'activer l'expression d'enzymes antioxydantes comme la SOD2 mitochondriale dans les muscles squelettiques [247]. PGC1 $\alpha$  étant un régulateur clé du métabolisme, son expression est finement régulée au niveau post-transcriptionnel par des acétylases (inhibition de l'activité) ou des déacétylases (activation de l'activité).

Certaines kinases participent également à la mise en place des effets bénéfiques du préconditionnement. Au cours de stress cellulaires, ERK et AKT contribuent à la survie des cellules et participent à l'effet bénéfique d'un préconditionnement à l'ischémie dans le cœur [248]. Les MAPK p38 et JNK, impliquées dans la réponse à différents stress cellulaires, ont également été montrés comme ayant un rôle dans différents modèles de préconditionnement. L'implication de p38 semble dépendre néanmoins de la méthode de préconditionnement (activation de p38 lors d'un préconditionnement direct [249] et pas d'effet sur la protéine lors d'un préconditionnement indirect [250]).

Au niveau des études cliniques, principalement effectués sur le rein et le cœur, des résultats variables sont obtenus [251]. Enormément de biais rendent compliqués la définition d'un protocole de préconditionnement clair et efficace. Ainsi les études comptent souvent de petites cohortes et contrairement aux animaux qui sont souvent jeunes, les patients présentent plus de comorbidités et une prise de médicaments diminuant le potentiel bénéfique du préconditionnement [252]. De plus,

les protocoles expérimentés en préclinique et cliniques sont extrêmement variés selon les études : durée du cycle, nombre de cycles, moment d'application du cycle (juste avant ou 24h avant), choix de l'anesthésie... Autant de variables qui n'aident pas à la définition d'un protocole clair bien que les preuves expérimentales soient incontestables.

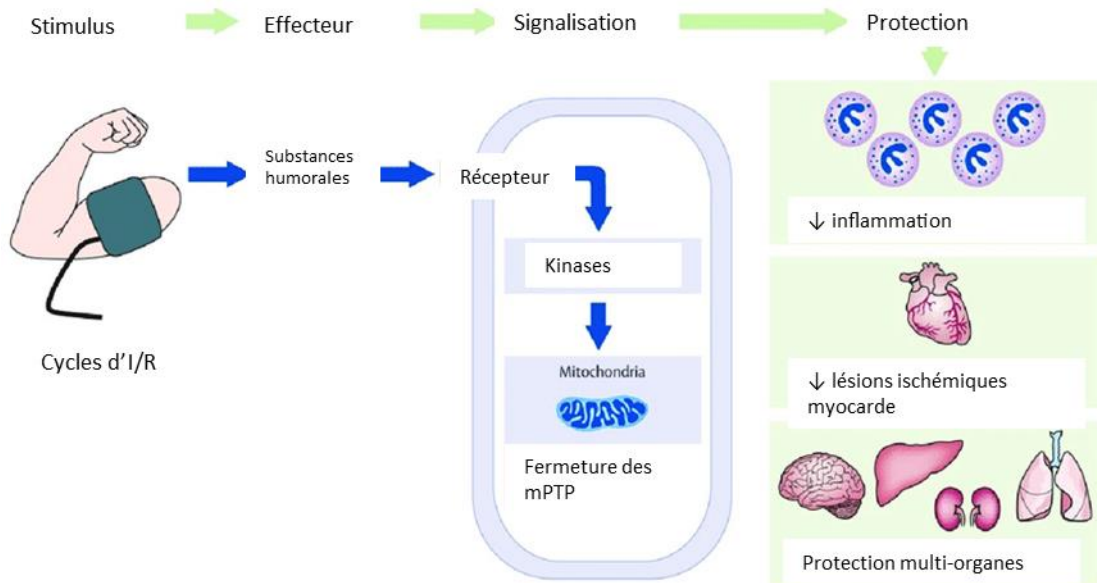


**Figure 21 : Mécanismes moléculaires induit par un préconditionnement à distance [253]**

### 1.5.1.3. Le préconditionnement à distance à l'ischémie et non invasif

La découverte qu'un préconditionnement à distance de manière non invasive peut également délivrer un effet neuro- et cardioprotecteur lors de l'ischémie rend l'utilisation d'un tel protocole encore plus intéressant (Fig. 22) [254, 255]. Ce stimulus du membre n'a lui non plus pas été bien compris mais pourrait agir via des mécanismes semblables aux autres moyens de préconditionner. Le protocole le plus efficace reste à déterminer bien que 3 cycles de 5 min d'ischémie-reperfusion soit le

plus utilisé. Des comorbidités (âge, diabète, obésité...) ont montré un impact négatif sur l'effet protecteur d'un préconditionnement [252].



**Figure 22 : Représentation schématique d'un préconditionnement à distance [256]**

La problématique d'ischémie/reperfusion apparaissant également lors de la transplantation d'organes, l'idée d'habituer un organe à la phase d'ischémie puis à la reperfusion est attractive. Un préconditionnement direct et indirect du pancréas a montré des effets bénéfiques lors de l'isolement d'îlots. Aucune étude à ce jour et à notre connaissance n'a étudié l'impact d'un préconditionnement à distance du pancréas de manière non invasive.

#### 1.5.1.4. Effet d'un préconditionnement sur les îlots

Hogan *et al.* ont montré que l'application de 10 min d'ischémie via clampage du tronc cœliaque et de l'artère mésentérique supérieure suivi de 10 min de reperfusion avant prélèvement de l'organe (rat) augmentait le nombre d'îlots récupérés par pancréas après 18h d'ischémie froide et diminuait l'expression de NADPH-dépendant oxydase dans le pancréas, une source de radicaux libres [257].

Cette étude a montré également par une analyse génomique, une diminution des gènes impliqués dans l'apoptose et le stress oxydatif. Il s'agit d'un préconditionnement direct du pancréas à l'ischémie et est donc en réalité très difficile à appliquer en clinique mais démontre le fort potentiel du préconditionnement. Delaune *et al.* ont en revanche montré qu'un préconditionnement à distance n'augmentent pas le nombre d'îlots par pancréas après l'isolement mais permet une perte moins importante d'îlots après 24h de culture, démontrant une meilleure intégrité des cellules [258]. 6 cycles de 4 minutes ont été appliqués après incision dans la cuisse gauche et clampage de l'artère fémorale. Ce protocole est plus vraisemblablement applicable en clinique mais demande encore une intervention chirurgicale de plus pour les chirurgiens. Une manière simplifiée d'appliquer un préconditionnement à distance serait d'influer les cycles d'ischémie de façon non invasive à l'aide d'un garrot autour d'un des membres supérieurs ou inférieurs.

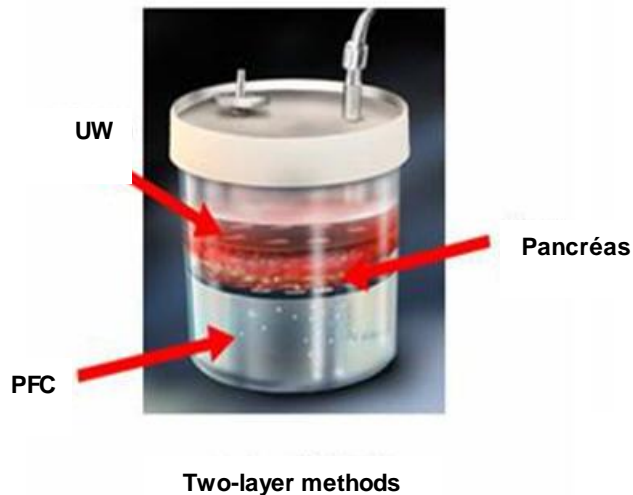
Un autre aspect primordial de la préservation d'organes consiste à prendre en considération que les cellules, bien qu'elles soient à 4°C, disposent toujours d'une certaine activité métabolique [259] et nécessitent donc notamment d'un apport en oxygène.

#### 1.5.2. L'oxygénation du greffon lors de l'ischémie froide

L'idée qu'un apport d'oxygène lors de la préservation du pancréas est crucial pour la survie du greffon a mené au développement de diverses méthodes. La supplémentation en oxygène des solutions de préservation représente le moyen le plus simple d'obtenir des résultats et le moyen de passer rapidement en clinique. Différentes sortes de transporteurs d'oxygène existent : les perfluorocarbures (PFCs), les hémoglobines (Hémoglobine-based oxygen carrier, HBOC) d'origine humaine ou bovine ou encore des transporteurs non protéiques comme ceux trouvés dans la solution Lifor® (nanoparticules liposomales permettant la délivrance d'oxygène).

### 1.5.2.1. La « two-layer method »

La two-layer method (TLM) (développée par Kuroda en 1988) utilisant des PFC a été beaucoup étudié [260]. Le pancréas est placé à l'interface d'une solution oxygénée via les PFCs et la solution de préservation (**Fig. 23**).



**Figure 23 : Représentation d'un pancréas préservé avec la Two-layer Method<sup>1</sup>**

Les PFCs représentent des molécules hydrophobes et lipophobes disposant d'un coefficient de solubilité de l'oxygène 20 à 50 fois plus élevé que les milieux de culture classiques selon le type de PFC utilisé [261]. L'oxygène diffuse graduellement par les PFCs et peut pénétrer dans le tissu. Cette technique a montré de nombreux résultats intéressants en expérimentale mais a échoué à montrer des résultats satisfaisant en clinique [262]. Cette méthode dépend beaucoup de la diffusion passive de l'oxygène et l'épaisseur plus importante du pancréas humain limite donc cet effet bénéfique de la TLM [263].

### 1.5.2.2. La persufflation

<sup>1</sup> [http://milkyway.mie.uc.edu/rbanerje/Research\\_areas/thermal-therapy/tissue-preservation](http://milkyway.mie.uc.edu/rbanerje/Research_areas/thermal-therapy/tissue-preservation)

Contrairement à la diffusion passive d'oxygène, la perfusion via les vaisseaux sanguins pourrait être plus intéressante avec un apport plus uniforme de l'oxygène (persufflation = injection directe d'oxygène dans les vaisseaux lors de l'hypothermie à 4°C). Cette méthode a réduit la mort cellulaire de pancréas porcins comparé à la TLM [264]. Cette méthode a également permis d'obtenir un rendement en îlots plus important sur des modèles de rat et humains et d'augmenter la quantité des réserves en ATP des greffons [265]. La persufflation est une alternative intéressante mais elle nécessite des manipulations supplémentaires afin de canuler le pancréas ainsi que l'utilisation de matériels supplémentaires par rapport à la conservation statique.

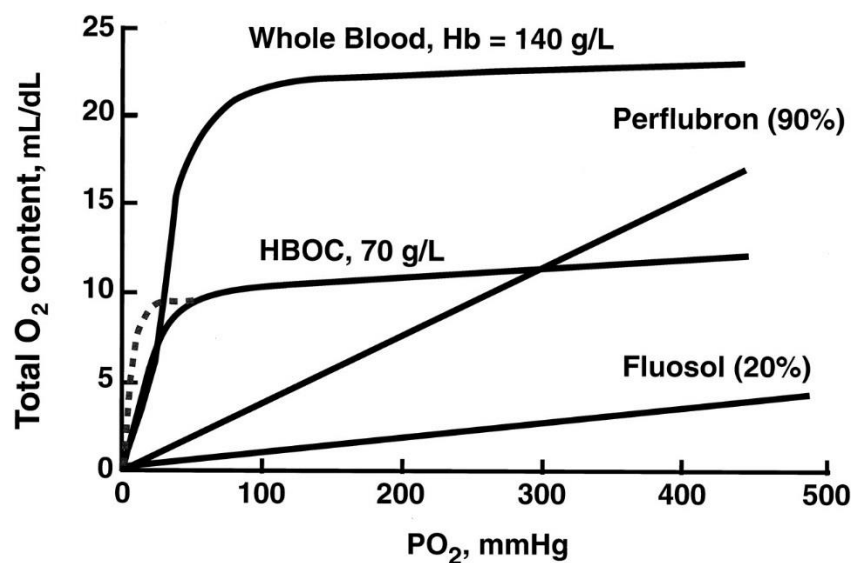
#### 1.5.2.3. Les machines de perfusion

Le système des machines de perfusion en hypothermie permet un passage en continue de la solution de préservation utilisée à travers les vaisseaux sanguins du pancréas. Ceci permet l'élimination des déchets métaboliques (lactate, H<sup>+</sup>). Les solutions sont généralement acellulaires, isotonique, bien oxygénés, une composition qui ressemble plus au plasma qu'au fluide intracellulaire (solution extracellulaire). La perfusion se fait via le lit vasculaire de l'organe à une pression suffisante (40 – 60 mmHg). Pour éviter la formation d'œdème dû à la pression hydrostatique, des agents oncotiques (albumine, colloïdes) sont utilisés. L'objectif est de permettre une certaine activité métabolique à 10°C plutôt qu'à 4°C permettant une certaine production d'énergie. Ainsi, une augmentation de la consommation d'oxygène et des réserves en ATP ont été observées lors de la préservation de pancréas humains en machine de perfusion (4°C) par rapport à une conservation en statique démontrant l'intérêt de l'oxygène pour la préservation des organes en hypothermie [266]. Mais son coût et sa complexité d'utilisation représentent un frein à une utilisation courante en clinique.

#### 1.5.2.4. Les hémoglobines

Les hémoglobines sont les transporteurs naturels de l'oxygène. Contrairement aux transporteurs d'oxygène synthétiques, les hémoglobines lient l'oxygène de manière covalente [267]. L'hémoglobine humaine est une protéine hétéro-

tétramérique (6nm). Chaque chaîne peptidique contient un hème, un cofacteur qui contient un atome de fer ferreux ( $Fe^{++}$ ) servant à la fixation de l'oxygène. La fixation de l'oxygène entraîne de légers changements de conformation de la molécule s'accompagnant d'une rupture de ponts hydrogène avec libération de protons. Contrairement aux PFCs, dont l'efficacité comme transporteurs d'oxygène augmente linéairement et indéfiniment avec la pression en oxygène, l'hémoglobine atteint déjà 90% de son efficacité maximum lorsque la pression en oxygène dépasse les 60 mmHg (Fig. 24).



**Figure 24 : Saturation des hémoglobines et PFCs en fonction de la pression en oxygène<sup>m</sup>**

Un paramètre important de ces molécules est leur p50 représentant la pression partielle en oxygène qui correspond à une saturation de 50% des sites de fixation de l'oxygène. Lorsque la pression partielle environnante diminue, l'hémoglobine libère ses molécules d'oxygène et de manière inverse lie des molécules si la pression partielle augmente. La p50 de l'hémoglobine humaine qui peut lier 4 molécules d'oxygène est de 16 mmHg. Bon nombre d'études ont porté sur la modification d'hémoglobine humaine (64 kDa) ou bovine lors de la transplantation d'organes. Le problème de ces molécules est leur instabilité en dehors des globules rouges et leur oxydation rapide en méthémoglobine avant d'être dégradées. Cette

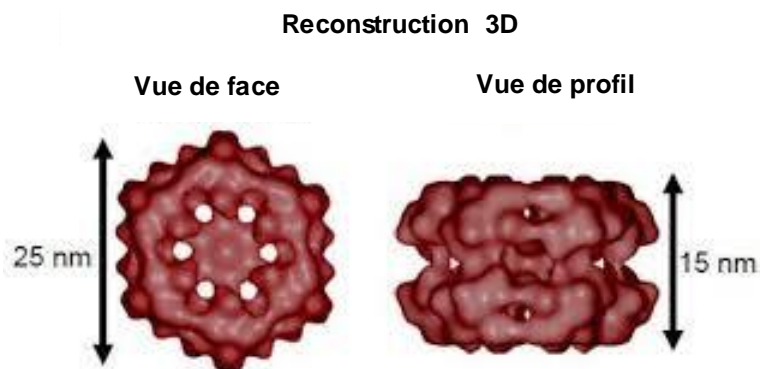
<sup>m</sup> <http://clinchem.aaccjnls.org/content/43/9/1724>



forme oxydée de l'hémoglobine est toxique et induit la production de radicaux libres [268]. De plus, ces transporteurs d'oxygène ne sont pas capables de fonctionner à 4°C, température à laquelle sont conservés les organes en clinique.

Des études ont montré les qualités d'une hémoglobine (qui porte le nom de M101) retrouvée dans l'*arenicola marina*, un invertébré marin [269]. La particularité de cette hémoglobine provient du mode de vie du ver marin qui la contient. L'*arenicola marina* est en effet un ver retrouvé dans les plages et est soumis aux variations de marées. Il est soumis à des variations de concentration en oxygène et en température qui varient quotidiennement. Cette hémoglobine qui est le fruit de milliers d'années d'évolution, permet donc la survie de cet organisme dans des conditions extrêmes. Les propriétés de cette hémoglobine sont donc d'un fort intérêt pour la préservation d'organes en vue de la transplantation.

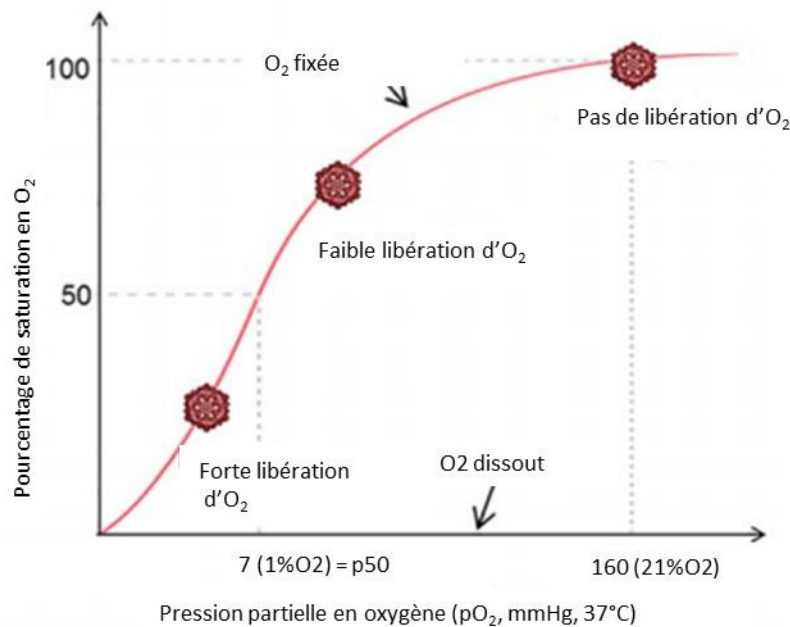
La molécule extracellulaire (non comprise dans les globules rouges) est active entre 4 et 37°C et se constitue d'un haut poids moléculaire (3600 kDa). Cette hémoglobine est constituée de 198 chaînes polypeptidiques : 156 chaînes portent un site actif capable de lier l'oxygène de façon réversible et 42 chaînes jouant un rôle dans le maintien de la structure quaternaire de la molécule (Fig. 25).



**Figure 25 : Représentation schématique de la structure de l'hémoglobine M101 [270]**

Son p50 est de 7mmHg, démontrant sa haute affinité pour l'oxygène et signifie qu'à cette pression en oxygène la molécule est saturée à 50% par l'oxygène et que donc 50% de l'oxygène qu'elle peut transporter a été libéré. Ainsi M101 délivre seulement ces molécules d'oxygène dans un milieu hautement hypoxique (7

mmHg = 1% d'oxygène) (**Fig. 26**). M101 délivre les molécules d'oxygène selon un simple gradient de concentration sans besoin d'effecteur allostérique particulier. M101 dispose également d'une activité SOD-like Cu/Zn dégradant les radicaux libres. De plus c'est une protéine non glycosylée la rendant non immunogène et qui n'induit pas de réponse allergénique après injection en intraveineuse chez la souris [271]. Aucun effet vasoconstricteur n'a été observé. Une étude dose dépendante a démontré la supériorité de l'UW supplémentée de M101 comparé à l'UW seul à une dose de 1, 2 et 5 g/L avec une réduction du taux de créatinine dans le sang après la transplantation de reins porcins préservés avec M101 [270].



**Figure 26 : Courbe de saturation en oxygène de M101, adaptée de [272]**

Des bénéfices en termes de survie, d'activité métabolique et d'intégrité cellulaire ont été montrés sur des cellules endothéliales soumises à 24h d'hypoxie (0% O<sub>2</sub>) à 4°C dans de l'UW et après une reperfusion à 37°C et 95% air [273]. M101 a montré des effets bénéfiques lors de conservation statique à 4°C de cœur et de poumon en précliniques et des effets de non-toxicité lors de préservation de reins en clinique [274, 275]. Une greffe de visage a également été effectuée après préservation du tissu en présence de M101, suite à une première greffe qui avait été rejetée.

M101 a également été testé lors de la conservation de greffons rénaux porcins en machine de perfusion. Les résultats ont montré que la présence du transporteur d'oxygène permettait une meilleure filtration glomérulaire une semaine après transplantation ainsi qu'une diminution de la fibrose rénale comparé au groupe sans M101 [276].

**De nombreuses études sur des modèles animaux démontrent qu'il est possible de diminuer et/ou retarder les lésions induites par l'ischémie lors de la préservation d'organes. Ainsi, le préconditionnement à l'ischémie représente potentiellement un des mécanismes protecteurs les plus puissants contre l'ischémie dû à l'activation endogène de différentes voies de signalisation cellulaire. Le pouvoir le plus impressionnant d'un tel protocole est sa capacité à activer des défenses protectrices contre l'ischémie dans un organe situé à distance de la zone utilisée pour l'application des cycles d'ischémie. L'utilisation d'un protocole de préconditionnement à l'ischémie à distance et de façon non invasive pourrait permettre une application rapide à la clinique. De l'autre côté, il est montré que bien que réduit par l'hypothermie, les cellules disposent toujours d'une certaine activité métabolique nécessitant un certain apport en oxygène. L'utilisation de perfluorocarbures, de machines de perfusion ou d'introduction d'oxygène directement dans le réseau vasculaire a montré un impact bénéfique par rapport à la conservation sans oxygénation sur des organes comme le rein et le foie. Mais leur utilisation en clinique pour la préservation du pancréas se révèle soit inefficace soit couteux et encombrant. L'utilisation d'un transporteur à forte affinité pour l'oxygène comme M101 et qui est de plus à l'heure actuelle, le seul transporteur capable de fonctionner à 4°C dispose d'un potentiel intéressant pour améliorer la viabilité des cellules lors de la préservation.**



## 2. Objectifs

Cette thèse a pour objectif d'améliorer les conditions de préservation du pancréas lors de l'ischémie froide afin de diminuer et/ou retarder l'apparition des conséquences de l'ischémie.

Pour se faire, cette étude est divisée en trois parties :

- 1) L'étude de l'effet d'une cinétique d'ischémie froide sur le pancréas humain et de rat
- 2) L'étude de l'effet d'un préconditionnement à l'ischémie à distance et non invasif en amont du prélèvement du pancréas
- 3) L'étude de l'effet d'un transporteur d'oxygène d'origine marine lors de la préservation du pancréas

L'étude de la cinétique d'ischémie froide va nous permettre de définir des marqueurs des conséquences de l'ischémie sur le pancréas et les îlots et nous serviront pour tester l'efficacité des deux stratégies d'optimisation.



### 3. Matériels et méthodes

#### 3.1. Pancréas et îlots humains

Toutes les expérimentations impliquant du matériel humain (pancréas et îlots) ont été réalisées en accord avec l'Agence de la Biomédecine (numéro d'autorisation : PFS12-013).

#### 3.2. Éthique et animaux

Toutes les expérimentations impliquant des animaux ont été réalisées en accord avec les directives de l'institut national de la santé et le comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animal de Strasbourg (CREMEAS, numéro d'autorisation : C67-482-28).

Les expérimentations ont été réalisées sur des rats Wistar mâles (8 semaines, 200/250g) provenant du fournisseur Janvier (Le Genest St Isle, France). L'animalerie dispose d'un statut sanitaire EOPS (exempt d'organismes pathogènes spécifiques) et dont la température est contrôlée ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Les animaux étaient hébergés dans des cages standardisés collectives et nourris avec une alimentation complète de maintenance pour animaux adultes (SAFE-A04, Villemoisson-sur-Orge, France). La nourriture et l'eau étaient disponible *ad libitum*.

#### 3.3. Préconditionnement à l'ischémie à distance et non invasif

Les rats sont anesthésiés par injection intra-péritonéale d'un mélange kétamine/xylazine (Imalgène® 1000/Rompun™, Sanofi, Paris, France) à raison de 100 µl/100 g de poids corporel. Un garrot est appliqué au niveau de l'artère fémorale gauche pendant 5 min (phase d'ischémie). La patte gauche prend alors rapidement une couleur bleue et se raidit confirmant que la circulation sanguine est coupée à ce niveau. Puis le garrot est enlevé autorisant de nouveau une circulation du flux sanguin (phase de reperfusion). Trois cycles de 5 min d'ischémie suivies de 5 min de reperfusion sont ainsi effectués. La dernière phase de reperfusion est de 30 min afin

de laisser le temps aux effecteurs biologiques d'agir sur le pancréas. Des rats 'contrôle' ne subissant pas les cycles d'ischémie-reperfusion sont anesthésiés pour une même période que les rats préconditionnés. Puis les pancréas sont prélevés comme décrit en 3.6.1. et conservés pendant 4h dans une solution de préservation et à 4°C. Des morceaux de tissu pancréatique sont congelés dans de l'azote liquide après 0, 2 et 4h d'ischémie froide et conservés à – 80°C. Sur une autre série d'expériences, des isollements d'îlots ont été réalisés après 2 ou 4h d'ischémie froide dans les mêmes conditions.

### 3.4. Préservation du pancréas

#### 3.4.1. Solutions de préservation

Les pancréas de rat ont été conservés dans une solution HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Thermo Fischer Scientific, Waltham, États-Unis) (**Tableau 1**) supplémentée avec 2,3 mM de chlorure de calcium, 25 mM de solution HEPES (Thermo Fischer Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) et 4,2 mM de bicarbonate de sodium (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, États-Unis).

Composants	Concentration (mM)
NaCl	137
KCl	5.40
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25
MgSO <sub>4</sub>	1.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.44
CaCl <sub>2</sub>	1.30
NaHCO <sub>3</sub>	4.20
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (glucose)	5.50

**Tableau 1 : Composition de l'HBSS**

Cette solution de préservation est de type extracellulaire avec une forte concentration en ions sodiques et une faible concentration en ions potassiques. Elle représente notre solution de préservation 'contrôle' pour les pancréas de rat.



- **Solution de préservation contrôle (rat)** : HBSS + 2,3 mM CaCl<sub>2</sub> + 25mM HEPES + 4,2 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>
- **Solution de préservation M101 (rat)** : HBSS + 2,3 mM CaCl<sub>2</sub> + 25mM HEPES + 4,2 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + M101 (2g/L)

Les pancréas humains ont été préservés dans une solution UW Belzer® (**Tableau 2**).

Composants	Concentration (mM)
Na+	28
K+	125
PO <sub>4</sub>	25
Raffinose	30
Lactobionate	100
Glutathione	3
Allopurinol	1
HES	50 g/L

**Tableau 2 : Composition de l'UW**

Cette solution de préservation, la plus couramment utilisée en clinique, est de type intracellulaire avec une forte concentration en ions potassiques et une faible concentration en ions sodiques. Elle représente notre solution de préservation 'contrôle' pour les pancréas humains.

- **Solution de préservation contrôle (humain)** : UW Belzer®
- **Solution de préservation M101 (humain)** : UW Belzer® + M101 (2g/L)

### 3.4.2. Préservation du pancréas de rat

#### 3.4.2.1. Cinétique d'ischémie froide sur le pancréas de rat

Les pancréas de rats sont prélevés et sont conservés dans la solution de préservation pendant 18h à 4°C (n=6). Des morceaux de pancréas ont été prélevés après 0-2-4-6-8-12 et 18h d'ischémie. Une extraction des métabolites a été effectuée sur tissu frais. Une partie du tissu a été congelée instantanément dans l'azote liquide pour l'extraction des protéines à une date ultérieure. Des morceaux de tissu

pancréatique ont également été mis en bloc dans de la colle OCT (Optimal cutting temperature) puis congelés instantanément dans de l'azote liquide et conservés à – 80°C.

Sur une autre série d'expériences, les îlots ont été isolés comme décrit en 3.6.2. après 30min-4-6-8-12h ou 18h d'ischémie froide du pancréas. La fonctionnalité, le comptage et la viabilité des îlots ont été effectués juste après l'isolement.

#### 3.4.2.2. Préservation du pancréas de rat avec M101

Le transporteur d'oxygène M101 est simplement ajouté à la solution de préservation à une concentration de 2g/L (solution de préservation-M101) sans besoin de charger la solution en oxygène au préalable.

##### 3.4.2.2.1. Effet de M101 sur le pancréas

L'effet de M101 sur le tissu pancréatique est observé selon le protocole suivant :

- **Condition contrôle** : 2ml de solution de préservation contrôle sont injectés dans le pancréas, l'organe est prélevé puis immergé dans la solution de préservation pendant 12h.
- **Condition M101** : 2ml de solution de préservation contrôle sont injectés dans le pancréas, l'organe est prélevé puis immergé dans la solution de préservation-M101 pendant 12h.

Des morceaux de tissu pancréatique sont prélevés et congelés après 0-2-4-6-8 et 12h d'ischémie froide. Un échantillon de la solution de préservation a été congelé après 6h d'ischémie dans les deux conditions afin de mesurer le niveau de HGBM1 sécrété par le pancréas ainsi que le niveau de glucose consommé.

### 3.4.2.3. Effet de M101 sur les îlots

L'effet de M101 sur les îlots est observé selon le protocole suivant :

- **Condition contrôle** : 2ml de solution de préservation contrôle sont injectés dans le pancréas, l'organe est prélevé puis immergé dans la solution de préservation pendant 6h.
- **Condition préservation avec M101** : 2ml de solution de préservation contrôle sont injectés dans le pancréas, l'organe est prélevé puis immergé dans la solution de préservation-M101 pendant 6h.
- **Condition perfusion du pancréas et préservation avec M101** : 2ml de solution de préservation-M101 sont injectés dans le pancréas, l'organe est prélevé puis immergé dans la solution de préservation-M101 pendant 6h.

Puis les îlots sont isolés comme décrit en 3.6.2. Un test de fonctionnalité (décrit en 3.6.2.2.), un comptage en îlots équivalents (IEQ) (décrit en 3.6.2.3.) et une extraction de protéines des îlots (décrit en 3.8.) sont réalisés.

## 3.4.3. Préservation du pancréas humain

### 3.4.3.1. Cinétique d'ischémie froide sur le pancréas humain

Des pancréas humains non éligibles à la transplantation ont été prélevés par les chirurgiens des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg puis placés en ischémie froide (n=24). Des morceaux de pancréas ont été prélevés à leur arrivée au laboratoire et ont été conservés à -80°C. Nous disposons donc d'un panel d'échantillons de tissu pancréatique ayant subi une ischémie froide variant entre 6 et 15H (**Tableau 3**). Les îlots ont été isolés et ont été utilisés pour les expériences pour la culture en présence de M101 (voir partie 3.11.).

	Pancréas humain
Âge	63,2 ± 3,4 ans (20/84)
IMC	28,3 ± 1,4 (18,5/38,7)
Ischémie froide	9 ± 0,5h (6/15,1)

**Tableau 3 : Caractéristiques des pancréas humains**

Les données sont représentées par les moyennes ± SEM (valeur minimale/valeur maximale).

#### 3.4.3.2. Préservation du pancréas humain avec M101

Des pancréas humains non éligibles à la transplantation ont été prélevés puis placés en ischémie froide (n=3) (ischémie = 9 ± 0h, âge = 53 ± 7,5 ans, IMC = 29,7 ± 7). La durée d'ischémie était de 6h entre le prélèvement et leur arrivée au laboratoire. De la solution Belzer® implémentée de M101 (2g/L) est injectée dans le pancréas puis l'organe est placé dans cette même solution de préservation pendant 3h à 4°C. Des morceaux de pancréas sont congelés dans de l'azote liquide après 0-1 et 3h d'ischémie et conservés à -80°C. Une extraction de protéines est réalisée à une date ultérieure.

Les îlots ont été isolés après 9h d'ischémie. La fonctionnalité et un comptage des îlots sont réalisés après 12h de culture dans du milieu CMRL1066 (10% SVF, 1% ABAM (antibiotique/ antimycotique, Gibco, Life Technologies, Paisey, UK)) à 37°C.

Le rendement en îlots lorsque le pancréas est préservé en présence de M101 est comparé au rendement de pancréas contrôle ayant subi sensiblement le même temps d'ischémie froide (**Tableau 4**).

Rendement en îlots	Contrôle	M101	p
Âge	71 ± 4 ans (61/83)	53 ± 7,5 ans (38/60)	P=0 ,0525
IMC	26 ± 1,2 (22,9/30)	29,7 ± 7 (21,2/43,6)	n.s
Ischémie froide	9,048 ± 0,29h (8,3/9,9)	9 ± 0h	n.s

**Tableau 4 : Caractéristiques des pancréas humains utilisés pour l'étude sur le rendement en îlots**

Les données sont représentées par les moyennes ± SEM (valeur minimale/valeur maximale).

La fonctionnalité des îlots lorsque le pancréas est préservé en présence de M101 est comparé à la fonctionnalité d'îlots de pancréas contrôle ayant subi sensiblement le même temps d'ischémie (**Tableau 5**).

Fonctionnalité des îlots	Contrôle	M101	p
Âge	59,7 ± 12 ans	53 ± 7,5 ans (38/60)	n.s
IMC	29,7 ± 4,1	29,7 ± 7 (21,2/43,6)	n.s
Ischémie froide	8,8 ± 1,34h	9 ± 0h	n.s

**Tableau 5 : Caractéristiques des pancréas humains utilisés pour l'étude sur la fonctionnalité des îlots**

Les données sont représentées par les moyennes ± SEM (valeur minimale/valeur maximale).

### **3.5. Digestion enzymatique du pancréas de rat**

Les pancréas de rats sont prélevés et sont conservés dans la solution de préservation pendant 4h à 4°C (n=6). Puis le pancréas est perfusé avec de la collagénase *Clostridium histolyticum* (1mg/ml de solution de préservation, type XI, Sigma-Aldrich) via le canal cholédoque et placé dans un bain-marie à 37°C. Des morceaux de tissu pancréatiques sont prélevés au début (T0min) et à la fin de la digestion enzymatique (T10min), congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C.

### **3.6. Prélèvement de pancréas et isolement d'îlots de rat**

#### **3.6.1. Prélèvement du pancréas**

Les rats sont anesthésiés par injection intra-péritonéale d'un mélange kétamine/xylazine (Imalgène® 1000/Rompun™, Sanofi, Paris, France) à raison de 100 µl/100 g de poids corporel. Après laparotomie, le canal cholédoque est dégagé puis ligaturé à l'embouchure duodénale. Un cathéter est inséré dans le canal cholédoque à l'embouchure hépatique puis l'animal est mis à mort par exsanguination. 2 ml de solution de préservation froide sont alors injectés dans le pancréas puis celui-ci est finalement prélevé, immergé dans 7 ml de solution de préservation et placé dans la glace (~4°C).

#### **3.6.2. Isolement des îlots**

Pour l'isolement des îlots, la contrainte technique de l'injection de la collagénase après la phase d'ischémie froide nous a amené à prélever les organes en bloc afin de pouvoir fixer le cathéter dans le canal cholédoque. De la même manière que pour le prélèvement de pancréas, les rats sont anesthésiés, le canal cholédoque est ligaturé à l'embouchure duodénale et un cathéter est inséré dans le canal à l'embouchure hépatique puis fixé à l'aide de fil de suture. L'animal est mis à mort par exsanguination et 2 ml de solution de préservation froide sont injectés dans

le pancréas. Une ligature au niveau du foie et du colon sont réalisés et les organes sont prélevés en bloc, immergés dans 130 ml de solution de préservation puis placés dans la glace. Une fois que le temps d'ischémie froide du pancréas désiré est écoulé, 8 ml de la collagénase *Clostridium histolyticum* (1mg/ml de solution de préservation, type XI, Sigma-Aldrich). Le pancréas seul est ensuite récupéré puis l'étape de digestion du tissu exocrine est effectué pendant 10 min à 37°C afin d'activer l'enzyme. L'enzyme est ensuite inactivé à l'aide de milieu M199 froid et complété avec 10% de SVF (Sigma-Aldrich) et 1% d'ABAM. Le digestat est alors filtré à travers une membrane de porosité de 500 µm (Sigma-Aldrich). Trois centrifugations permettent ensuite de rincer le filtrat au M199 afin d'éliminer toute trace de collagénase. Une purification par gradient discontinu de Ficoll (Ficoll PM400, Dutcher) est alors réalisée pour récupérer les îlots. Les îlots étant moins denses que les cellules exocrines, les différentes densités du gradient vont permettre de récupérer les îlots dans les premières phases du Ficoll. Après le dernier rinçage, le culot est donc suspendu dans 12ml de Ficoll de densité 1,108. Viennent ensuite s'ajouter délicatement 10ml de Ficoll de densité 1,096, 10ml de densité 1,069 puis 5ml d'HBSS d'une densité de 1. Une centrifugation sans accélération ni frein est réalisée. Une fois la centrifugation terminée, les îlots sont visibles aux interphases 2/3 et 3/4 et sont récupérés. Trois rinçages au M199 sont effectués pour éliminer toute trace de Ficoll puis les îlots sont finalement mis en culture dans du milieu M199 (10% SVF, 1% ABAM) à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

La viabilité et fonctionnalité des îlots sont évaluées immédiatement après l'isolement.

#### 3.6.2.1. Viabilité des îlots

Un marquage des îlots à la fluorescéine diacétate (FDA, 5mg/ml dans de l'acétone, Sigma-Aldrich) et à l'iodure de propidium (IP, 0.1 mg/ml, Sigma-Aldrich). La FDA est métabolisée par les cellules vivantes résultant en la production de fluorescéine qui fluoresce dans le vert. L'IP est un intercalant de l'ADN capable d'incorporer seulement les cellules qui ont une membrane plasmique endommagée caractéristique des cellules mortes ou en train de mourir et fluoresce dans le rouge. Une dizaine d'îlots par condition sont donc marqués à ce mélange FDA/PI pendant 4

min puis la fluorescence émise par ces îlots est observée par un microscope à fluorescence (Nikon Eclipse 50i microscope). Le pourcentage de cellules vivantes (vertes) par rapport aux cellules mortes (rouges) est estimé visuellement par des manipulateurs expérimentés en double aveugle.

### 3.6.2.2. Fonctionnalité des îlots

La fonctionnalité des îlots est représentée par leur capacité à sécréter de l'insuline en réponse à une stimulation au glucose (Glucose-stimulated insulin secretion, GSIS). Une solution de Krebs (10% SVF) est utilisée pour le test. Ainsi pour une condition testée, 10 îlots sont rincés puis synchronisés 30 min dans du milieu de Krebs basal à 2,8 mM de glucose permettant d'amener tous les îlots à un état basal de sécrétion d'insuline. Les 10 îlots sont ensuite transférés dans un bain de Krebs basal (B1, 1h), puis dans du Krebs stimulé à 16,6 mM de glucose (S, 1h) et finalement de nouveau dans du Krebs basale (B2, 1h). Les 10 îlots sont récupérés à la fin de l'expérience et sont placés dans une solution d'acide-alcool permettant la lyse des cellules et le dosage de la quantité d'insuline totale présente. L'insuline libérée dans les surnageants B1, S et B2 est quantifiée par un kit ELISA (Merckodia, Upsalla, Suède) et les résultats sont exprimés en µg/L. La quantité d'insuline sécrétée est divisée par le contenu en insuline totale des 10 îlots afin de normaliser entre les conditions. Un index de stimulation peut être calculé par la formule suivante :

$$\text{Index de stimulation} = S / ((B1 + B2) / 2)$$

### 3.6.2.3. Comptage des îlots

Les îlots sont comptés en îlots équivalents (IEQ) selon la méthode rapportée par Ricordi et al. [277]. Un IEQ représente l'équivalent d'un îlot pancréatique avec un diamètre de 150 µm. Cette standardisation du comptage des îlots permet de prendre en compte leur taille très variable et donc de normaliser d'une préparation à une autre.



### **3.7. Prélèvement de pancréas et isolement des îlots humains**

Les pancréas humains non éligibles à la transplantation ont été prélevés par les chirurgiens des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Tous les organes du donneur sont refroidis par injection intravasculaire d'une solution de préservation à 4°C puis le pancréas est prélevé et placé dans cette même solution le temps du transport au laboratoire.

A son arrivée, le pancréas est disséqué (la rate, le duodénum et le tissu gras sont retirés) puis un cathéter est posé dans le canal de Wirsung. La collagénase à 4°C est alors injectée pour perfuser le pancréas entier. Le pancréas est placé ensuite dans une chambre de digestion appelée chambre de Ricordi. Cette chambre est connectée à un circuit fermé de solution circulante à 37°C permettant d'assurer l'oxygénation du tissu, la sortie des îlots pancréatiques et leur collecte. Les îlots sont alors séparés du tissu exocrine en fonction de leur densité sur gradient de Ficoll. Les îlots sont ensuite récupérés dans les premières phases du Ficoll et sont rincés plusieurs fois dans du milieu CMRL1066 afin d'éliminer l'excès de Ficoll. Finalement les îlots sont mis en culture dans du CMRL (10% SVF, 1% ABAM) à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.8. Culture d'îlots humain avec M101**

Différentes préparations d'îlots humains sont mises en culture dans du CMRL (2% BSA, 1% ABAM) pendant 24h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Trois conditions différentes sont réalisées :

- Condition 150 IEQ/cm<sup>2</sup> : les îlots sont répartis à une densité de 150 IEQ/cm<sup>2</sup> dans du CMRL.
- Condition 600 IEQ/cm<sup>2</sup> : les îlots sont répartis à une densité de 600 IEQ/cm<sup>2</sup> dans du CMRL.
- Condition 600 IEQ/cm<sup>2</sup> + M101 : les îlots sont répartis à une densité de 600 IEQ/cm<sup>2</sup> dans du CMRL supplémenté avec M101 à 1 g/L.

La fonctionnalité des îlots est évaluée après 24h de culture. Les protéines cytoplasmiques et nucléaires sont extraites des îlots et sont conservées à – 80°C. Le surnageant des milieux après 24h de culture sont également congelées.

### **3.9. Extraction des protéines du pancréas et des îlots**

Les protéines du tissu pancréatique sont extraites à partir de tissu congelé dans du tampon de lyse (Tris 20mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, NaCl 150 mM, Triton-X-100 0,5% ; Sigma-Aldrich) en présence d'un mélange d'inhibiteurs de protéases et phosphatase (1/100<sup>ème</sup>) (HALT™ protease and phosphatase inhibitor cocktail, Thermo Fischer Scientific). Un broyeur mécanique à billes accélère la lyse des cellules et après 1h d'incubation dans la glace, une centrifugation de 20 min à 12 000g permet de récupérer les protéines dans le surnageant et sont conservées à -80°C.

Les protéines des îlots sont extraites à l'aide d'un kit d'extraction de protéines cytoplasmiques et nucléaires sur cellules vivantes en présence d'un mélange d'inhibiteurs de protéases et phosphatase (HALT™ protease and phosphatase inhibitor cocktail, Thermo Fischer Scientific). Les extraits protéiques sont dosés à l'aide d'un test à l'acide bicinchonique (BCA, Thermo Fischer Scientific) et sont conservés à – 80°C.

#### **3.9.1. Western Blot**

Une quantité équivalente de protéines de chaque échantillon est mélangée avec du tampon de charge (BioRad, Hercules, USA) et du  $\beta$ -mercaptoethanol (1/100) (Sigma-Aldrich). Les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 5min, déposés dans des gels à différentes concentrations de polyacrylamide en fonction du poids moléculaire de la protéine étudiée. Des marqueurs de taille sont également ajoutés dans le gel (Seebblue® plus 2, Magic Mark™, Life Technology). La migration est effectuée à 200V pendant 45 min dans un tampon de migration. Les protéines sont ensuite transférées du gel à une membrane de nitrocellulose ou PVDF

(polyvinylidene fluoride) à 100V pendant 1H dans un tampon de transfert. La membrane est ensuite bloquée pendant 1h à température ambiante à l'aide d'une solution de blocage (5% de BSA (Sigma-Aldrich) dans du TBS-T (Tris buffered saline-Tween 0,1%)) puis incubée toute la nuit avec l'anticorps primaire à 4°C. L'anticorps secondaire couplé à HRP (Horseradish peroxydase) est incubé à température ambiante pendant 1h (**Tableau 6**). La solution de révélation (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Fischer Scientific) est appliquée à la membrane pendant 1 min puis l'acquisition est réalisée par un Chemidoc (BioRad). L'analyse des densités des bandes est réalisée par le logiciel ImageLab (BioRad) et les résultats sont exprimés par rapport à la quantité de  $\beta$ -actine présente dans les échantillons ou avec un ratio protéine phosphorylée/protéine totale.

Nom	Provenance	Dilution	Conjugué	Fournisseur
Anticorps primaires				
Anti p-p38	Lapin	1/1000	/	Cell signaling
Anti p38	Lapin	1/1000	/	Cell signaling
Anti SOD2	Lapin	1/1000	/	Sigma-Aldrich
Anti PGC1 $\alpha$	Lapin	1/1000	/	Cell signaling
Anti HIF1- $\alpha$	Souris	1/100	/	Novus Biological
Anti $\beta$ -actine	Lapin	1/10000	/	Abcam
Anti-GAPDH	Lapin	1/10000	/	Abcam
Anticorps secondaires				
Anti lapin	Chèvre	1/10000	HRP	Sigma-Aldrich
Anti Souris	Lapin	1/10000	HRP	Sigma-Aldrich

**Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés**

### 3.9.2. Mesure du métabolisme mitochondrial

L'activité du complexe 1 mitochondriale est mesurée dans les extraits protéiques grâce à un kit ELISA (Abcam). Les valeurs sont exprimées en densité optique/min ou par rapport à la valeur du contrôle.

### 3.9.3. Mesure de l'hypoxie

L'activation de HIF1- $\alpha$  est mesurée dans les extraits protéiques humains grâce à un kit ELISA (Active Motif). Le kit permet la reconnaissance des éléments de reconnaissance de l'hypoxie (hypoxia response element, HRE) démontrant le taux d'activation de HIF1- $\alpha$ . Les résultats sont exprimés par rapport à la valeur du contrôle.

### 3.9.4. Mesure des défenses antioxydantes

L'activité de l'enzyme antioxydante catalase est mesurée dans les extraits protéiques grâce à un kit ELISA (Abcam). Les résultats sont exprimés en coup par seconde (CPS).

### 3.9.5. Mesure des MAPK

La quantité de protéines phosphorylées et de protéines totales (ERK, JNK et p38) est mesurée dans les extraits protéiques grâce à un kit ELISA (Abcam) ou par western blot. Les résultats sont exprimés sous forme de ratio protéines phosphorylées/protéines totales.

### 3.9.6. Mesure de la kinase AKT

La quantité de protéines phosphorylées et de protéines totales d'AKT est mesurée dans les extraits protéiques grâce à un kit ELISA (Abcam). Les résultats sont exprimés sous forme de ratio protéines phosphorylées/protéines totales.

### 3.9.7. Mesure de la mort cellulaire

#### 3.9.7.1. Mesure de la nécrose

La quantité de HMGB1 est mesurée dans la solution de préservation grâce à un kit ELISA. Les valeurs sont exprimées en ng/ml.

#### 3.9.7.2. Mesure de l'apoptose

La quantité de caspase 3 clivée est mesurée dans les extraits protéiques grâce à un kit ELISA (R&D, Minneapolis, Etats-Unis). Les résultats sont exprimés par rapport à la valeur du contrôle.

### 3.10. Extraction des métabolites du pancréas

Les métabolites du tissu pancréatique sont extraits à partir de tissu frais via l'acide perchlorique 2M (Thermo fisher Scientific) pour détruire les composés protéiques et l'hydroxyde de potassium 2M (Thermo fisher Scientific) pour stabiliser l'échantillon à un pH neutre. Une centrifugation à 13 000g pendant 15min permet la précipitation des protéines et de l'acide perchlorique, le surnageant est récupéré et conservé à -80°C. Le contenu en métabolites est normalisé par rapport à la quantité de tissu pancréatique (en mg) utilisée pour l'extraction.

L'ATP, la X/H et le lactate ont été dosés à partir des extraits de métabolites via des kits de dosage spécifiques (ATP-ab83355, X/H-ab155900, L-lactate-ab65331, Abcam) suivant les recommandations du fournisseur. Les résultats sont exprimés en métabolites/ $\mu$ g de protéines ou par rapport au contrôle T0h dans le cas du lactate.

### 3.11. Analyses histologiques

#### 3.11.1. Mesure des radicaux libres

Des coupes de tissu pancréatiques (5 $\mu$ m) congelés dans de l'OCT ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica, Wetzlar, Allemagne), apposées sur des lames (Superfrost, Thermo Fischer Scientific) puis stockées à -80°C. Ces lames ont ensuite été incubées avec du dihydroéthidium (2,5.10<sup>-6</sup> M) (DHE) pendant 30 min à 37°C. En

présence de radicaux libres, la molécule va s'oxyder en éthidium capable de s'incorporer dans l'ADN des cellules et de fluorescer dans le rouge après excitation. La fluorescence est observée au microscope à fluorescence (Nikon Eclipse 50i microscope) puis quantifiée à l'aide du logiciel Nis-Element-Br. Les résultats sont exprimés par le ratio intensité de fluorescence/surface.

### 3.11.2. Immunomarquages

Des coupes de tissu pancréatiques (5 $\mu$ m) conservées dans des blocs de paraffine ont été réalisées à l'aide d'un microtome et apposées sur des lames. Les coupes d'organes sont tout d'abord déparaffinées : les lames sont placées pendant 30 min à 60°C puis sont rincées dans du toluène (3 bains successifs de 5min). Les coupes sont réhydratées par passages successifs dans des bains d'éthanol (100%, 90% et 70%) puis par un dernier rinçage à l'eau distillée. Une étape de démasquage des sites antigéniques est réalisée dans du tampon citrate (10mM) à 95°C pendant 5 minutes. Le blocage des sites antigéniques non-spécifiques est effectué pendant 1h avec du sérum de chèvre (5% dans du PBS-T 0,1%) (Sigma). Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-T (phosphate buffered saline-Tween 0,01%) 5% sérum sur la nuit à 4°C. Après rinçage, les lames sont incubées avec l'anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante. Le milieu de montage contient du 2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamide (DAPI à 1,5  $\mu$ g/ml) (FluorSave Reagent, Merck Millipore, Molsheim, France) et les lames sont observées au microscope à fluorescence (Nikon Eclipse 50i microscope).

### 3.12. Statistiques

Les résultats sont exprimés par leur moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (Standard Mean Error, SEM) ou par la médiane. Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad. Les données de distribution normales sont analysées avec des test paramétriques (Test-t) et les données de distribution non normales avec des tests non paramétriques (Mann-Whitney). Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque la valeur de p est inférieure à 0,05.

## 4. Résultats

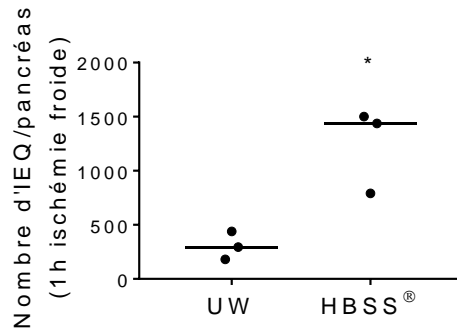
L'objectif de cette première étude était d'observer les conséquences de l'ischémie froide au cours d'une cinétique sur le tissu pancréatique lors de sa préservation et sur les îlots après isolement. Une meilleure compréhension de l'impact de l'ischémie sur le pancréas dans son ensemble permettrait un ciblage des besoins nécessaires du pancréas lors de la préservation. L'étude a été effectuée sur pancréas humain puis sur pancréas de rat. L'impact de la digestion du pancréas, qui pourrait avoir les mêmes conséquences que la reperfusion, a également été étudié sur l'organe.

### 4.1. Effet de l'ischémie froide et de la digestion sur le pancréas et les îlots

#### 4.1.1. Effet de l'ischémie froide

##### 4.1.1.1. Effet de deux solutions (UW et HBSS) sur le rendement en îlots

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer le type de solution de préservation que nous allions utiliser pour notre modèle sur de rat. Nous avons observé un nombre plus important d'îlots récupérés lorsque les pancréas étaient préservés dans l'HBSS après 1h d'ischémie par rapport à l'UW ( $1242 \pm 227$  IEQ/pancréas avec préservation du pancréas dans l'HBSS contre  $300 \pm 74$  IEQ/pancréas avec préservation du pancréas dans l'UW ;  $p < 0,05$ ) (Fig. 27). L'HBSS a donc été utilisée préférentiellement à l'UW pour la suite de notre étude sur le modèle de rat.



**Figure 27 : Amélioration du nombre d'îlots de rats récupérés après 1h d'ischémie froide avec l'HBSS**

Les îlots récupérés par pancréas sont comptés en îlots équivalents (IEQ). Des pancréas sont placés à 4°C pendant 1h d'ischémie dans de l'UW ou de l'HBSS et les îlots sont isolés selon la méthode conventionnelle d'isolement (n=3). Chaque point représente une préparation d'îlots de pancréas différents. Les résultats sont représentés par la médiane. \* p<0,05.

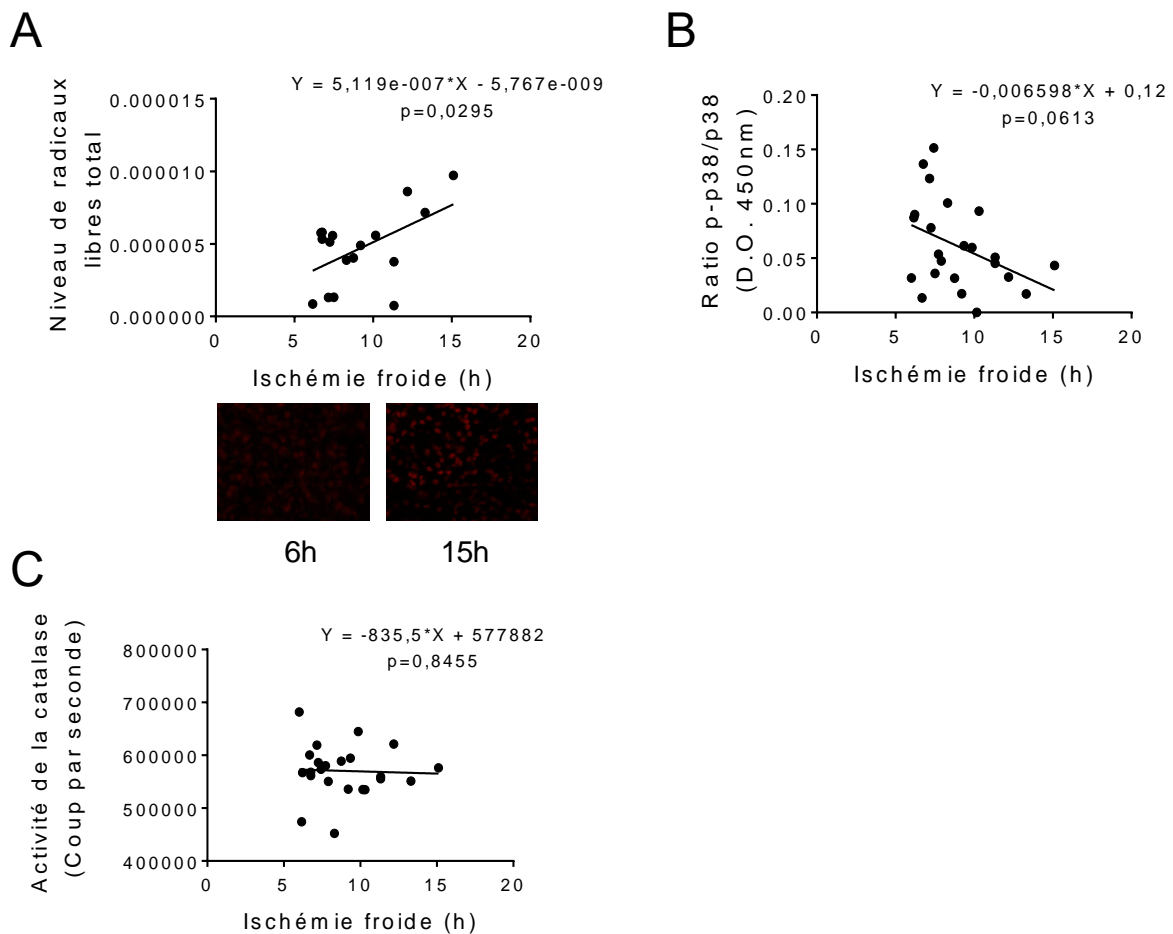
Nous avons ensuite observé l'impact de la préservation du pancréas à 4°C sur le pancréas humain puis sur les îlots après isolement. Le temps d'ischémie minimum était de 6h, temps correspondant au temps de prélèvement, de conditionnement, et d'acheminement du pancréas au laboratoire.

#### 4.1.1.2. Effet de l'ischémie froide sur le pancréas humain

Le stress oxydant présent au niveau pancréatique a été étudié par un marquage des radicaux libres et l'activité de la catalase, enzyme antioxydante. Une corrélation positive entre la durée d'ischémie et la quantité totale de radicaux libres (p<0,05) (**Fig. 28A**) a été observée alors que l'activité de catalase n'est pas modifiée par le temps passé en ischémie (**Fig. 28C**). Ceci révèle un déséquilibre de la balance pro et antioxydant révélant l'apparition d'un stress. La phosphorylation de la MAPK p38, impliquée dans la réponse au stress cellulaire induisant une activation de l'apoptose et/ou de l'inflammation, est diminuée entre des temps d'ischémie de 6 et 15h (p= 0.061) (**Fig. 28B**). L'absence de données entre 0 et 6h de préservation ne nous permet pas de dire si l'ischémie a induit une élévation de la phosphorylation de



cette protéine ou si elle correspondait à un niveau basal d'activation dans le pancréas humain.

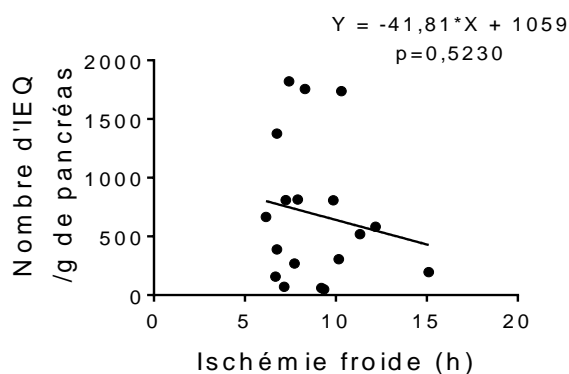


**Figure 28 : Augmentation du stress oxydant et inhibition de p38 dans le pancréas humain en fonction du temps d'ischémie**

La quantité de radicaux libres total dans le pancréas humain ( $n=17$ ) est évaluée par l'intensité de fluorescence du marquage à la DHE et normalisée par la surface de la coupe du tissu (A). L'activité de la MAPK p38 ( $n=23$ ) (B) et de la catalase ( $n=24$ ) (C) sont mesurées à partir d'extraits protéiques de pancréas humain par kit ELISA. Les corrélations sont établies par la méthode de Spearman. Un point représente un pancréas humain différent ayant subi une durée d'ischémie froide variable.

#### 4.1.1.3. Effet de l'ischémie froide sur les îlots humains

Comme l'ischémie peut impacter les rendements d'isolement et la qualité des îlots, nous avons étudié la corrélation entre les deux sur nos préparations. Les rendements sont établis par comptage des îlots marqués à la dithizone et après 12h de culture à 37°C. Aucune corrélation n'a été montrée sur notre cohorte (**Fig. 29**).



**Figure 29 : Impact de l'ischémie froide sur les îlots pancréatiques humain**

Les îlots sont comptés en îlots équivalents (IEQ) (n=18) et normalisés par rapport au poids du pancréas. Les corrélations sont établies par la méthode de Spearman. Un point représente un pancréas humain différent ayant subi une durée d'ischémie froide variable.

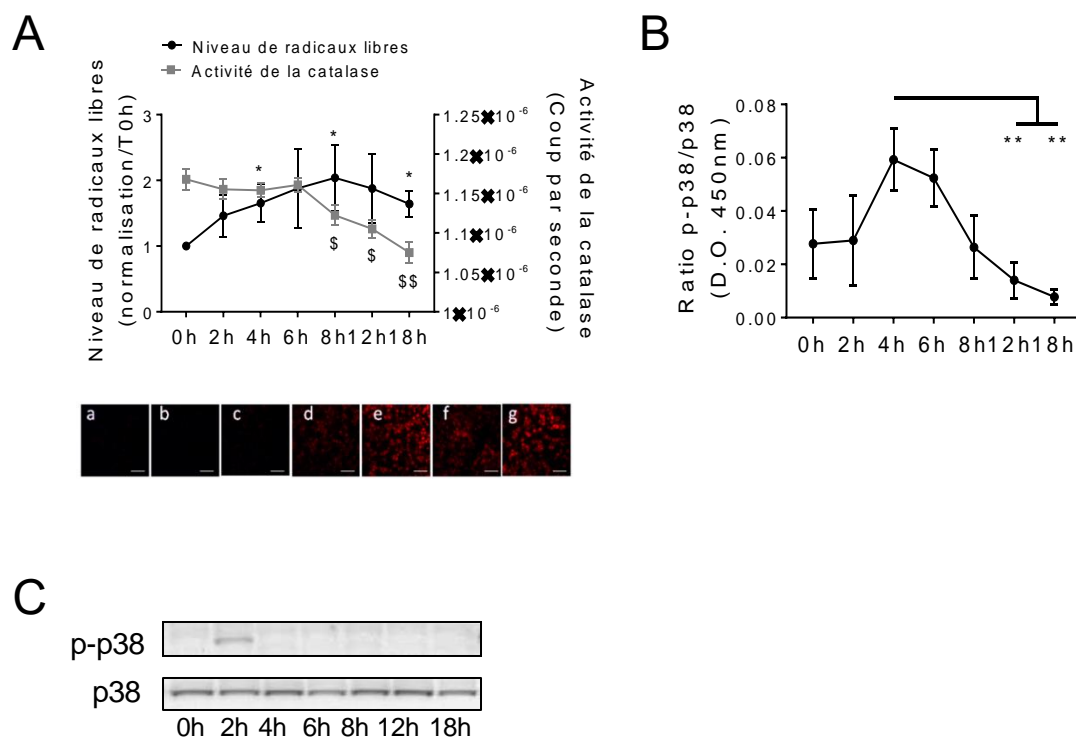
Afin de contrôler les temps d'ischémie, de réaliser une cinétique et de standardiser nos résultats, nous avons opté pour un modèle animal et plus particulièrement de rat. Ainsi nous avons mis en place un modèle nous permettant de réaliser une cinétique d'ischémie froide entre 0 et 18h, d'observer l'impact de l'ischémie à des temps très courts et de comparer les similitudes/différences entre les pancréas humains et de rat entre 6 et 15h d'ischémie.

#### 4.1.1.4. Effet de l'ischémie froide sur le pancréas de rat

##### 4.1.1.4.1. Etude des marqueurs observés chez l'Homme

Une augmentation progressive de la quantité totale de radicaux libres dans le tissu pancréatique est observée entre 4 et 18h, et devient significativement différente

du contrôle (T0h) à partir de 4h (T0h =  $1 \pm N/A$  ; T4h =  $1,65 \pm 0,29$  ;  $p < 0,05$ ) (Fig. 30A). En parallèle, une diminution de l'activité de la catalase, enzyme antioxydante, est observée après 8h de préservation ce qui pourrait accélérer l'accumulation des radicaux libres dans le tissu (Fig. 30A). L'augmentation de radicaux libres retrouvée à la fois dans le pancréas de rat et humain montrent la mise en place progressive d'un stress oxydant lors de l'ischémie. En revanche, contrairement à l'humain, l'activité de l'enzyme antioxydante catalase est impactée par l'ischémie. La MAPK p38 est activée transitoirement dans le pancréas après 4 et 6h d'ischémie avant d'être inhibée entre 8 et 18h d'ischémie comme observé chez l'humain (Fig. 30B-C).



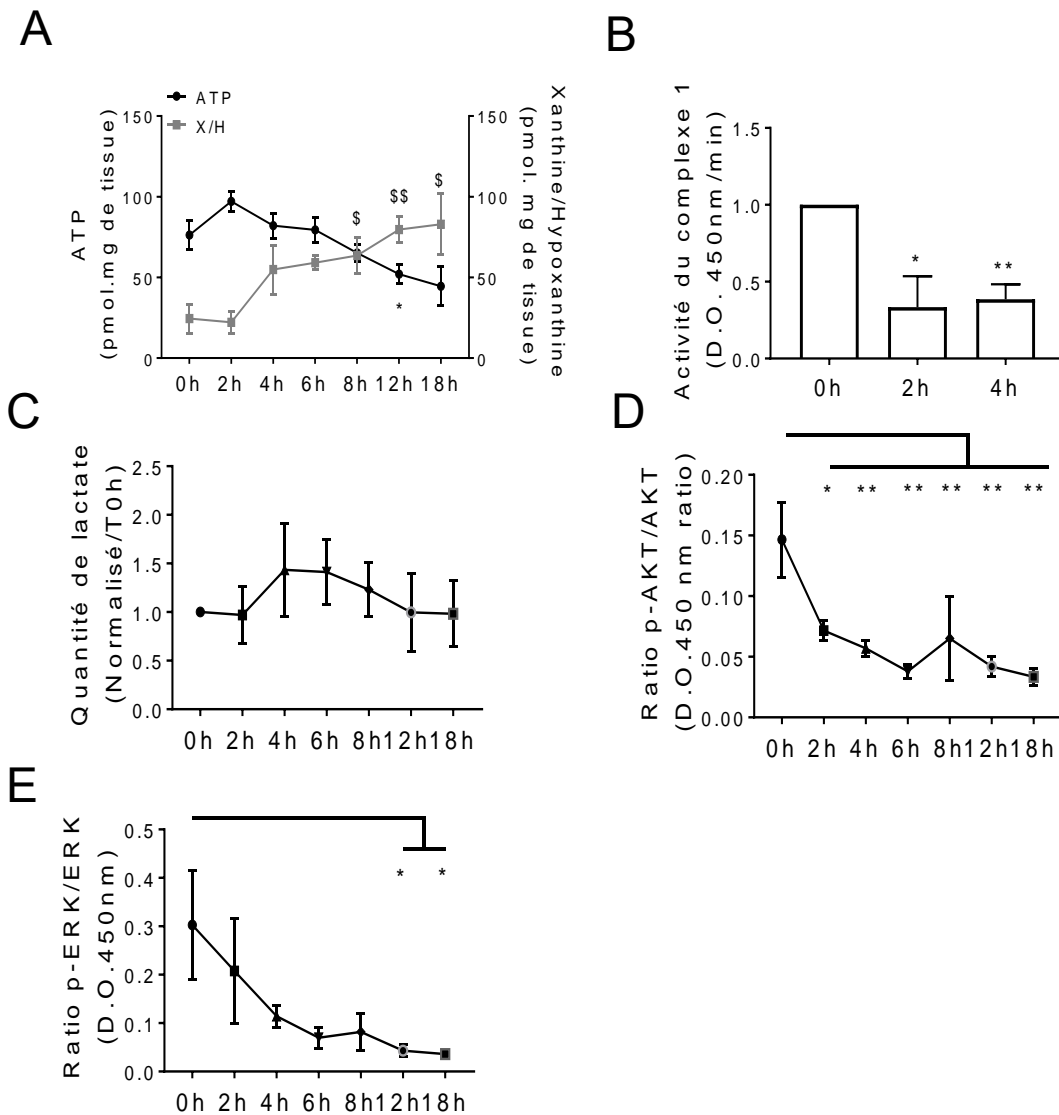
**Figure 30 : Augmentation du stress oxydant et activation transitoire de p38 dans le pancréas de rat en fonction du temps d'ischémie**

La quantité de radicaux libres total dans le pancréas de rat ( $n=4$ ) est évaluée par l'intensité de fluorescence du marquage à la DHE et normalisée par la surface de la coupe du tissu (A) (a= 0h, b= 2h, c= 4h, d= 6h, e= 8h, f= 12h et g= 18h d'ischémie). L'activité de la catalase est mesurée par kit ELISA à partir d'extraits protéiques de pancréas de rat ( $n=6$ ) (A). L'activité de la MAPK p38 est mesurée par kit ELISA ( $n=6$ ) (B) et par Western Blot (C) à partir d'extraits protéiques de pancréas de rat. Le pancréas est placé à 4°C puis du tissu pancréatique est congelé après 0-2-4-6-8-12 et 18h d'ischémie froide. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$ .

Pour aller plus loin dans la compréhension des évènements liés à l'ischémie, nous nous sommes intéressés au métabolisme du tissu pancréatique de rat.

#### 4.1.1.4.2. Effet de l'ischémie sur le métabolisme

D'un point de vue du métabolisme, nous avons observé une chute drastique des réserves en ATP dès l'arrêt de la circulation sanguine (diminution d'un facteur 10 de la quantité d'ATP entre un pancréas *in situ* et un pancréas après 5 minutes d'ischémie (données non montrées)). La production d'ATP est stabilisée durant les 6 premières heures d'ischémie froide ( $76,32 \pm 9,09$  pmol/mg de tissu à 0h d'ischémie contre  $79,4 \pm 7,8$  pmol/mg de tissu à 6h d'ischémie ; n.s.) avant de diminuer significativement à partir de 12h ( $79,4 \pm 7,8$  pmol/mg de tissu à 6h d'ischémie contre  $52,04 \pm 6,08$  pmol/mg de tissu à 12h d'ischémie ;  $p < 0,05$ ) (Fig. 31A). En parallèle, une augmentation progressive de la quantité de xanthine et d'hypoxanthine, produits de dégradation de l'ATP, est observée entre 4 et 18h de préservation ( $82,93 \pm 18,91$  pmol/mg de tissu à 18h contre  $22,13 \pm 7,05$  pmol/mg de tissu à 2h d'ischémie ;  $p < 0,05$ ) (Fig. 31A). L'activité du complexe 1 mitochondrial est rapidement inhibée par l'ischémie après 4h par rapport au contrôle T0h (T0h =  $1 \pm$  N/A ; T 4h =  $0,29 \pm 0,12$  ;  $p < 0,01$ ) (Fig. 31B), suggérant que la production stable d'ATP observée entre 0 et 6h serait due à la mise en place de la respiration anaérobie via la glycolyse. La tendance à une augmentation de la production de lactate (Fig. 31C), produit de la glycolyse, dans le tissu après 4h d'ischémie serait un indice de plus. Une diminution progressive de l'activité d'AKT ( $0,14 \pm 0,03$  à 0h d'ischémie contre  $0,07 \pm 0,008$  après 2h d'ischémie ;  $p < 0,05$ ) et ERK ( $0,3 \pm 0,11$  à 0h d'ischémie contre  $0,04 \pm 0,013$  après 12h d'ischémie ;  $p < 0,05$ ) est observée dans le pancréas lors de l'ischémie.



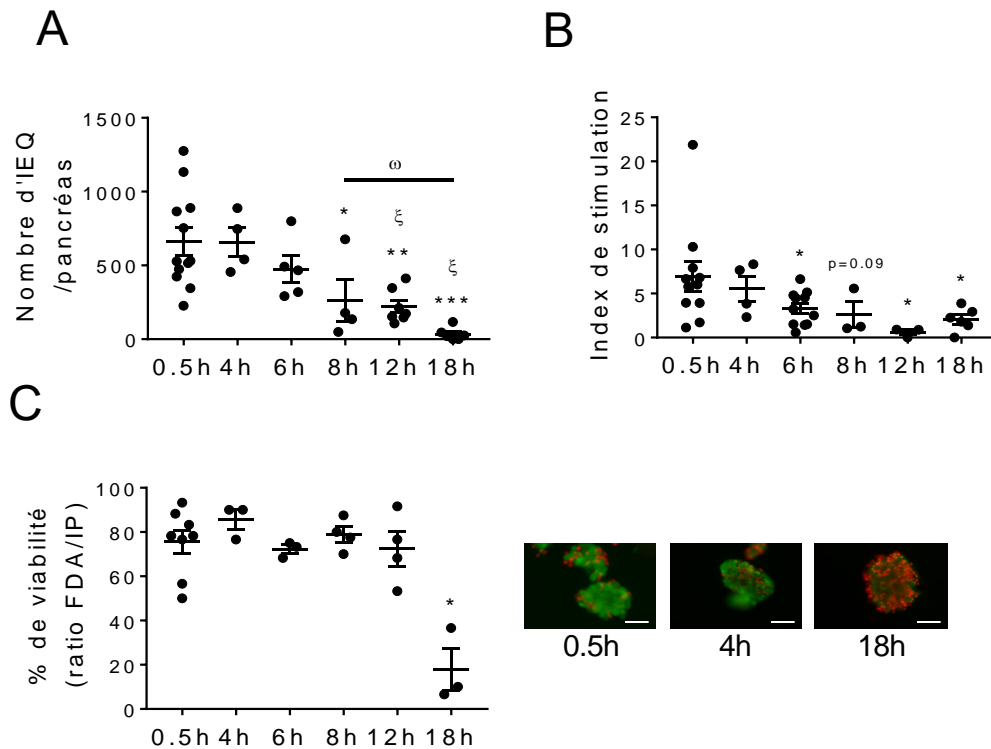
**Figure 31 : Augmentation du stress oxydant et activation transitoire de p38 dans le tissu pancréatique de rat en fonction du temps d'ischémie**

Après extraction des protéines ou des métabolites de tissu pancréatique, la quantité d'ATP ( $n=6$ ) (A), de xanthine/hypoxanthine ( $n=6$ ) (A), l'activité du complexe 1 mitochondrial ( $n=3$ ) (B), la quantité de lactate ( $n=4$ ) (C), le ratio p-AKT/AKT (D) ( $n=6$ ) et le ratio p-ERK/ERK (E) ( $n=6$ ) sont mesurés par kit. Des pancréas sont placés à 4°C puis du tissu pancréatique est congelé après 0-2-4-6-8-12 et 18h d'ischémie. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p<0,05$  ; \*\*  $p<0,01$  ; \*\*\*  $p<0,001$ .

L'impact de l'ischémie sur le tissu pancréatique avec l'activation du stress oxydant, de l'inflammation pourrait impacter également les îlots.

#### 4.1.1.5. Effet de l'ischémie froide sur les îlots

L'impact de l'ischémie froide est évalué sur la qualité des îlots isolés après préservation du pancréas pendant 0,5-4-6-8-12 ou 18h. Le rendement en îlots par pancréas commence à diminuer après 6h d'ischémie pour atteindre la significativité après 8h d'ischémie ( $259 \pm 141$  IEQ/pancréas après 8h contre  $663 \pm 93$  IEQ/pancréas après 30 min d'ischémie ;  $p < 0,05$ ) (**Fig. 32A**). La capacité des îlots à sécréter de l'insuline en réponse à une stimulation au glucose (représenté par l'index de stimulation) est diminuée progressivement et atteint la significativité après 6h ( $3,3 \pm 0,58$  après 6h contre  $6,91 \pm 1,7$  après 30 min d'ischémie) (**Fig. 32B**). En revanche, la viabilité des îlots (représenté en % de viabilité) n'est impactée qu'après 18h d'ischémie ( $17 \pm 9\%$  après 18h contre  $75 \pm 5\%$  après 30min d'ischémie ;  $p < 0,05$ ) (**Fig. 32C**) qui est un temps extrême de préservation d'organe.



**Figure 32 : Diminution du rendement, de la fonctionnalité et de la viabilité des îlots en fonction du temps d'ischémie du pancréas**

Les îlots récupérés par pancréas sont comptés en îlots équivalents (IEQ) (A). La fonctionnalité des îlots représentant leur capacité à sécréter l'insuline est mesurée en fonction du temps d'ischémie du pancréas. Les résultats sont exprimés en index de stimulation exprimant le ratio entre la quantité d'insuline sécrétée par les îlots en présence de concentration de glucose élevée (16,7mM) par rapport à la moyenne de la quantité sécrétée dans une solution à faible concentration en glucose (2,8mM) avant et après la stimulation au glucose (B). La viabilité des îlots (marquage FDA/PI) est évaluée en fonction du temps d'ischémie du pancréas (C). Des pancréas sont placés à 4°C pendant 30min-4h-6h-8h-12h ou 18h d'ischémie et les îlots sont isolés selon la méthode conventionnelle d'isolement. Chaque point représente une préparation d'îlots de pancréas différents. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

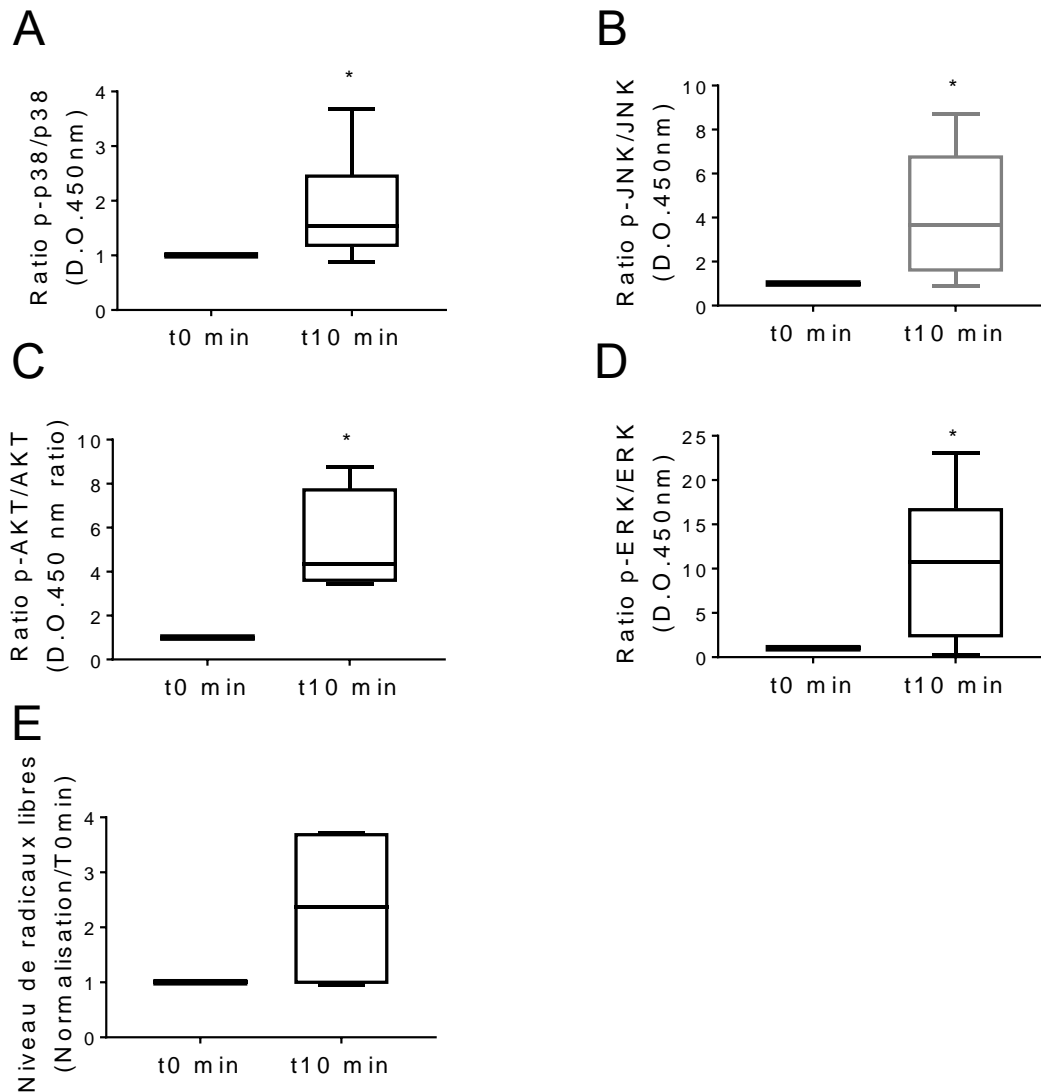
#### 4.1.2. Effet de la digestion du pancréas

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de la digestion enzymatique sur le pancréas. Lors de cette étape qui a pour but de libérer les îlots pancréatiques, les cellules subissent un choc métabolique avec un retour à 37°C qui

réactivent leur métabolisme brutalement. Nous avons observé ces effets après une ischémie de 4h du pancréas, une durée qui n'affectait pas la qualité des îlots.

Des pancréas de rat ont été conservés en ischémie froide pendant 4h avant la digestion à la collagénase à 37°C pendant 10min (temps de digestion requis pour digérer le tissu exocrine chez le rat). Les MAPK p38 et JNK, impliquées dans la réponse à différents stress cellulaire sont augmentées dans le tissu pancréatique après 10 min de digestion à 37°C (T0min = 1±N/A, T10min = 1,82 ± 0,35; p<0,05 pour p38 et T0min = 1±N/A, T10min = 4,15 ± 1,05;p<0,05 pour JNK) (Fig. 33A-B). Les kinases impliquées dans la survie cellulaire sont également augmentées dans le tissu après 10 min de digestion (T0min = 1±N/A, T10min = 5,2 ± 1,1; p<0,05 pour AKT et T0min = 1±N/A, T10min = 10,4 ± 3,3 ;p<0,05 pour ERK) (Fig. 33C-D). Une explosion du stress oxydant est bien connue lors de la reperfusion d'un organe. Nous n'avons cependant pas observé de changements significatifs après la période de digestion même si deux pancréas sur quatre ont affiché une augmentation de la quantité de radicaux libres dans le tissu (Fig. 33E).





**Figure 33 : Activation de kinases (AKT, ERK, p38, JNK) dans le tissu pancréatique de rat lors de la digestion enzymatique**

Après extraction des protéines, les ratio p-p38/p38 (n=6) (A) p-JNK/JNK (n=6) (B), p-AKT/AKT (n=4) (C) et p-ERK/ERK (n=6) (D) sont mesurés par kit ELISA. Les radicaux libres sont obtenus par marquage histologique (DHE, n=4) (E). Le pancréas est placé à 4°C pendant 4h d'ischémie puis est placé à 37°C pendant 10min après injection de collagénase dans l'organe. Les résultats sont représentés en moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$

#### 4.1.3. Discussion

Dans cette première partie, nous avons montré que l'ischémie froide induit une perturbation rapide du métabolisme (entre 0 et 4h d'ischémie) ainsi qu'une mise en place progressive du stress oxydant dans le pancréas (à partir de 4h d'ischémie). De plus, le pancréas subit un stress cellulaire lors de la digestion du tissu exocrine pouvant être comparé aux dommages liés à la reperfusion. Globalement cette suite d'évènements impacte négativement le nombre et la fonctionnalité des îlots après isolement.

La solution de préservation utilisée dans notre étude sur les pancréas de rat était l'HBSS. Son utilisation a été justifiée par les faibles rendements en îlots obtenus après préservation des pancréas en présence d'UW, pourtant reconnu comme étant une des meilleures solutions de préservation. Il a été montré que l'UW inhibait l'activité enzymatique de la collagénase [278] ce qui pourrait expliquer la diminution des rendements isolements. Afin d'observer un effet de l'ischémie et des traitements ultérieurs, il nous fallait une solution qui n'impactait pas les rendements. Ainsi, l'HBSS (137 mM Na<sup>+</sup>/ 6 mM K<sup>+</sup>), qui pourrait être considérée comme une solution extracellulaire au même titre que la solution SCOT15<sup>®</sup> (143 mM Na<sup>+</sup>/ 6 mM K<sup>+</sup>), a été utilisée pour notre étude. L'absence de colloïdes et d'antioxydants dans l'HBSS représentent les principales différences avec les autres milieux et vont nous permettre de caractériser plus précisément l'ischémie sur le modèle murin.

Notre modèle d'ischémie du pancréas de rat nous a permis de mettre en évidence les phénomènes précoces de l'ischémie dès le prélèvement de l'organe. Une diminution très rapide des réserves en ATP dès l'arrêt de la circulation sanguine du donneur a été montrée, de même qu'une diminution de l'activité des protéines AKT et ERK a été mise en évidence dans les premières heures de l'ischémie, indiquant certainement un impact de la température combinée au début de l'ischémie. L'hypothermie est utilisée dans la préservation d'organe afin de maintenir la survie des organes, elle limite le métabolisme cellulaire mais surtout le catabolisme qui pourraient être déclenchés par le manque d'oxygène notamment. Malgré l'hypothermie, nous avons montré une activation transitoire de la MAPK p38.

Cette MAPK exprimée le plus souvent au cours de différents stress permet au tissu de se défendre en activant l'expression de certains gènes mais est aussi capable d'activer la mort cellulaire [279]. D'ailleurs, il a été montré que son inhibition au moment de l'hypothermie permettait une meilleure viabilité de foie de rat et de poumons de chien [280, 281]. Ainsi, l'activation transitoire de p38 lors de l'ischémie pourrait être impliquée dans les effets délétères sur les îlots. En parallèle, une augmentation progressive des produits de dégradation de l'ATP que sont la xanthine et l'hypoxanthine est observée. Un produit qui, lors de la reperfusion et l'apport brusque en oxygène, sera dégradé en produisant des radicaux libres.

Nos résultats démontrent une augmentation progressive des radicaux libres dans le pancréas lors de l'ischémie. Aucun antioxydant n'est présent dans l'HBSS (rat) ni dans le Custodiol® et le SCOT15® (humain), ce qui nous a permis de caractériser le stress oxydant au cours de la cinétique et de l'implication des enzymes antioxydantes endogènes. Nous observons que chez le rat, l'activité de l'enzyme antioxydante catalase est stable durant les six premières heures d'ischémie avant de diminuer progressivement et donc de renforcer le stress oxydant. En revanche, il n'existe aucune corrélation entre l'activité de la catalase dans les pancréas humains et le temps d'ischémie (après 6h). Il a été démontré que les îlots humains disposent d'une expression plus importante d'enzymes antioxydantes, dont la catalase et la SOD, par rapport aux îlots de rats [282]. Une capacité plus importante des îlots humains à lutter contre le stress oxydant pourrait expliquer que l'activité de la catalase ne soit pas réduite lors de cette intervalle d'ischémie dans le pancréas humain alors qu'elle l'est chez le rat. Une étude plus approfondie des défenses oxydantes pourrait s'avérer nécessaire.

La période de digestion a été décrite comme délétère dans le cadre de l'isolement d'îlots. Certaines études montrent une augmentation du stress oxydant pendant cette phase de remise à température (34-36°C) [206, 283]. De plus, les îlots et le tissu, au cours de la digestion, vont être exposés à l'oxygène atmosphérique de plus en plus puisque le tissu va être digéré en morceaux de plus en plus petit, permettant à l'oxygène de diffuser vers des cellules jusque-là en hypoxie voire en anoxie. Ainsi, les cellules rencontrent des conditions très proches des conditions de reperfusion. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'impact de la digestion sur les cellules et les îlots. Le retour à 37°C réactive le métabolisme cellulaire et une

augmentation logique des kinases AKT et ERK impliquées dans le métabolisme et la survie cellulaire est observée. Il apparaît également que les MAPK p38 et JNK dans le pancréas sont activées à 10 minutes de digestion, ce qui confirme les résultats d'Abdelli *et al.*, sur le pancréas porcin [284]. L'activation de p38 et JNK a également été retrouvée dans des îlots issus de pancréas ayant subi une ischémie longue [285], et a été corrélée avec une prise de greffe plus longue. Ainsi, il apparaît que la phase de digestion induit un stress supplémentaire dont l'effet est d'autant plus important que la phase d'ischémie est longue, ce qui s'apparenterait au phénomène de reperfusion.

Pour preuve, une ischémie courte (entre 30 min et 4h) n'impacte pas le rendement en îlots de rat. Alors qu'après 6h d'ischémie, une diminution progressive du nombre d'îlots par pancréas confirme la mise en place de lésions délétères pour l'îlot. Ces résultats appuient les études qui démontrent qu'une ischémie longue de plus de 16h réduit le nombre d'îlots de rats récupérés par pancréas [285, 286]. De même, au cours d'isolement d'îlots humains, la corrélation temps d'ischémie et rendement a été mise en évidence sur des cohortes importantes (par ex. 276 isolement pour l'étude de Chicago, [119]) et sur des temps d'ischémie très variables (0 à 24 h, [119, 287-290]). Ceci expliquerait l'absence de corrélation sur notre cohorte, trop petite et avec des temps d'ischémie trop restreints entre 6 et 15h.

Nous avons également démontré une diminution progressive de la capacité des îlots à sécréter de l'insuline à partir de 6h d'ischémie du pancréas. La limite haute de durée d'ischémie est fixée à 12h chez l'Homme au vu du faible impact sur la fonction des îlots *in vitro* et il est possible que cette limite soit plus courte chez le rat (6-8h d'ischémie). D'autres études ont également démontré que des temps prolongés d'ischémie influençaient négativement le contenu total en insuline [288]. En revanche, dans l'intervalle accepté par la plupart des centres transplantateurs (12h maximum d'ischémie froide), l'ischémie froide a virtuellement peu d'impact sur la sécrétion d'insuline *in vitro* [291]. Malgré l'impact délétère observé à partir de 6h d'ischémie sur la fonction et le rendement en îlots, la viabilité des îlots n'a été impactée qu'à partir de 18h d'ischémie. Ce résultat nous montre que le test de viabilité effectué ne constitue pas une méthode robuste d'évaluation de la qualité de l'îlot.

#### 4.1.4. Conclusion sur l'impact de l'ischémie

Cette première partie démontre et confirme que l'ischémie induit une cascade d'événements complexes et interconnectés dans le tissu pancréatique se répercutant sur la qualité de l'îlot après isolement.

L'inhibition très rapide du métabolisme aérobie suivie de l'augmentation progressive du stress oxydant dans le pancréas représente deux événements majeurs très certainement impliqués dans la détérioration des îlots. L'apparition du stress oxydant et de l'activation transitoire de p38 coïncident avec la diminution de la qualité des îlots. L'amélioration des conditions de conservation permettrait également l'augmentation de l'utilisation des greffons marginaux (exemple : donneur décédé), plus sensibles au stress de l'ischémie afin de réduire la pénurie d'organes [292]. Notre hypothèse est donc qu'une inhibition du stress oxydant et du stress cellulaire induite par l'ischémie permettrait une amélioration de la qualité des îlots après isolement. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers deux stratégies différentes : un préconditionnement à l'ischémie, afin d'activer les défenses endogènes du pancréas contre les effets de l'ischémie, et l'utilisation d'un transporteur d'oxygène couplé à une activité antioxydante, afin de satisfaire la demande en oxygène toujours existante à 4°C.

La seconde partie s'intéresse donc au préconditionnement à l'ischémie, technique expérimentale, consistant en l'application de cycles courts et répétés d'ischémie. Le préconditionnement a le potentiel de protéger les organes contre une période d'ischémie sévère et prolongée. Ceci représente donc un fort intérêt dans le cadre de la préservation d'organes en vue de la transplantation.

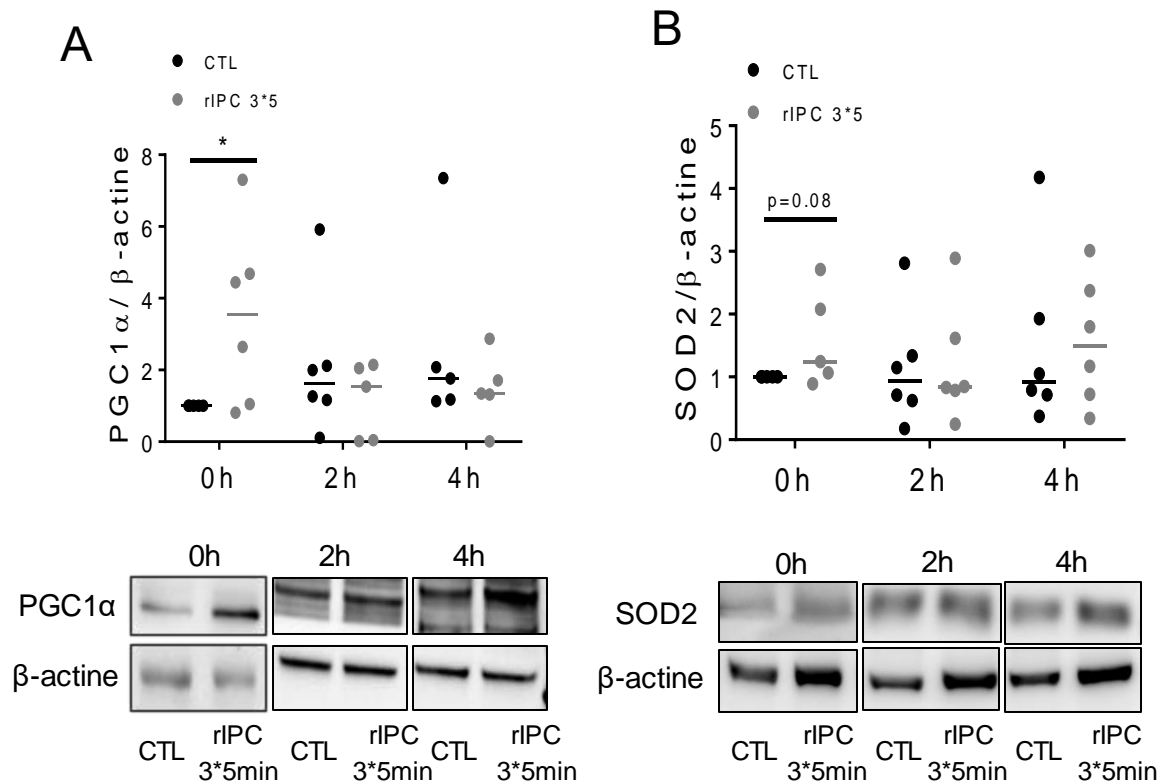
## 4.2. Préconditionnement du pancréas à distance à l'ischémie

L'objectif de cette partie était de d'optimiser la qualité des pancréas et des îlots pancréatiques par un preconditionnement à l'ischémie reperfusion à distance par garrot à la patte arrière de l'animal.

### 4.2.1. Impact d'un preconditionnement de 3\*5min à l'ischémie sur le pancréas de rat

#### 4.2.1.1. Impact sur les défenses antioxydantes

Le coactivateur transcriptionnel PGC1 $\alpha$  est notamment impliqué dans la biogénèse mitochondriale et son expression est augmentée dans les pancréas qui ont été preconditionnés (T0h CTL = 1 $\pm$ N/A, T0h rIPC (remote ischemic preconditioning) 3\*5min = 3,49  $\pm$  1,01 ; p<0,05) (Fig. 34A). Après 2h et 4h d'ischémie, aucune différence n'a été observée entre le preconditionnement et la condition contrôle. La SOD2, présente dans les mitochondries, constitue la première ligne de défense contre les radicaux libres et a été montré comme étant augmenté en réponse à un preconditionnement sur d'autres organes. Ici, nous avons observé une augmentation de l'expression de SOD2 dans les pancréas preconditionnés au moment du prélèvement (T0h CTL = 1 $\pm$ N/A, T0h rIPC 3\*5min = 1,6  $\pm$  0,3 ; p= 0,08) (Fig. 34B). A l'instar de PGC1 $\alpha$ , aucune différence d'expression entre les deux conditions n'a été observée après 2 et 4h d'ischémie. Aucun impact du preconditionnement sur l'expression de la catalase n'est observé (donnée non montrée). Ces résultats démontrent une activation des défenses antioxydantes dans le pancréas induit par le protocole de preconditionnement au moment de l'induction de l'ischémie uniquement et valide notre preconditionnement.



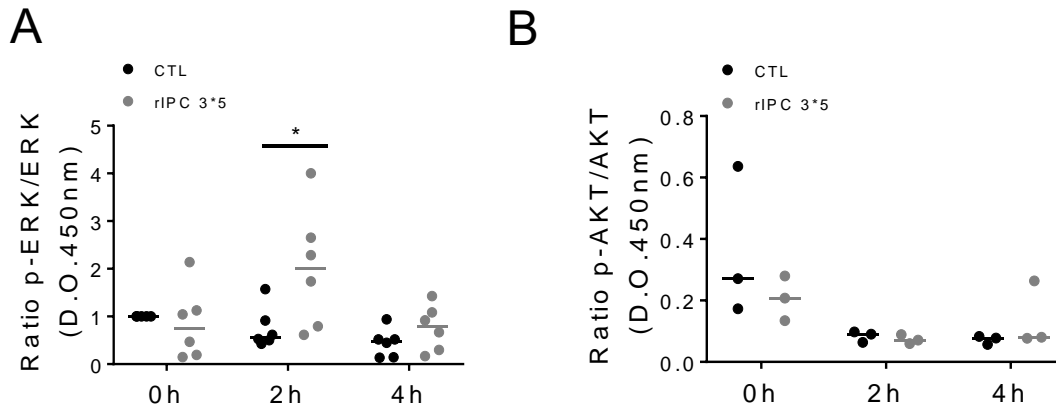
**Figure 34 : Augmentation des défenses antioxydantes dans les tissus pancréatiques de rat préconditionnés à l'ischémie**

Après extraction des protéines de tissu pancréatique, l'expression de PGC1 $\alpha$  (A) et de SOD2 (B) sont analysées par western blot ( $n=5-6$ ). 3 cycles de 5 min d'ischémie suivis de 5 min de reperfusion et d'une dernière période de reperfusion de 30 min sont réalisés sur l'artère fémorale gauche de rat anesthésié (rIPC = remote ischemic preconditioning). Les rats CTL subissent le même temps d'anesthésie mais sans application du preconditionnement. Les pancréas sont ensuite prélevés puis placés à 4°C et des morceaux de tissu sont congelés après 0-2 et 4h d'ischémie. Les résultats sont normalisés par rapport au CTL 0h et sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.2.1.2. Impact sur les voies de survie du pancréas

La MAPK ERK et la kinase AKT sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire et permettent notamment une amélioration de la survie cellulaire. Une augmentation de l'activité de ERK est observée dans les pancréas preconditionnés après 2h d'ischémie par rapport au contrôle (T2h CTL =  $0,76 \pm 0,18$ ,

T2h IRPC 3\*5min =  $2,01 \pm 0,51$  ;  $p < 0,05$ ) (Fig. 35A). Aucun effet sur l'activité d'AKT n'est observé (Fig. 35B).



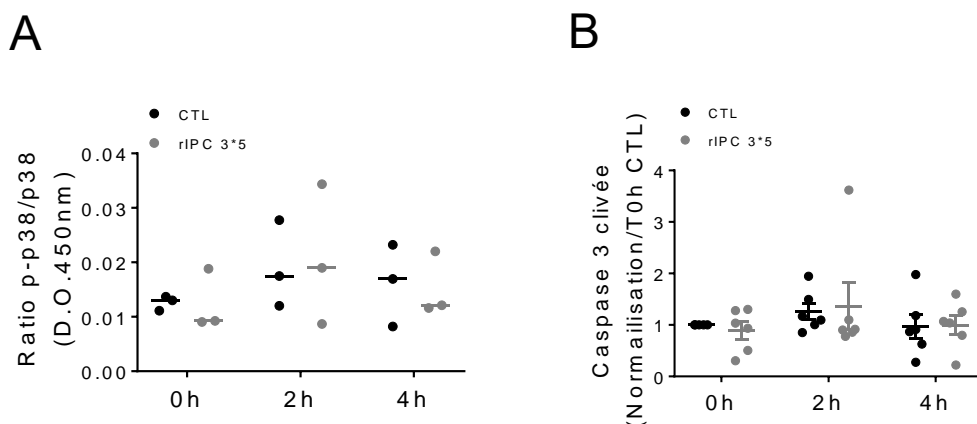
**Figure 35 : Activation transitoire de la MAPK ERK dans les tissus pancréatiques de rat préconditionnés à l'ischémie**

Après extraction des protéines de tissu pancréatique, le ratio p-ERK/ERK ( $n=6$ ) (A) et p-AKT/AKT ( $n=3$ ) (B) sont mesurés par kit ELISA. 3 cycles de 5 min d'ischémie suivis de 5 min de reperfusion et d'une dernière période de reperfusion de 30 min sont réalisés sur l'artère fémorale gauche de rat anesthésié (rIPC = remote ischemic preconditioning). Les rats CTL subissent le même temps d'anesthésie mais sans application du preconditionnement. Les pancréas sont ensuite prélevés puis placés à 4°C et des morceaux de tissu sont congelés après 0-2 et 4h d'ischémie. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.2.1.3. Impact sur l'apoptose et inflammation

Les MAPK p38 et JNK sont impliquées dans la réponse au stress cellulaire notamment par activation de l'inflammation et/ou de l'apoptose. La caspase 3 clivée est un des effecteurs des réponses apoptotiques. Le preconditionnement à l'ischémie n'a pas eu impact sur l'activité des MAPK p38 dans le tissu pancréatique (Fig. 36A). Aucun effet sur la quantité de caspase 3 clivée dans le pancréas n'est observé (Fig. 36B).





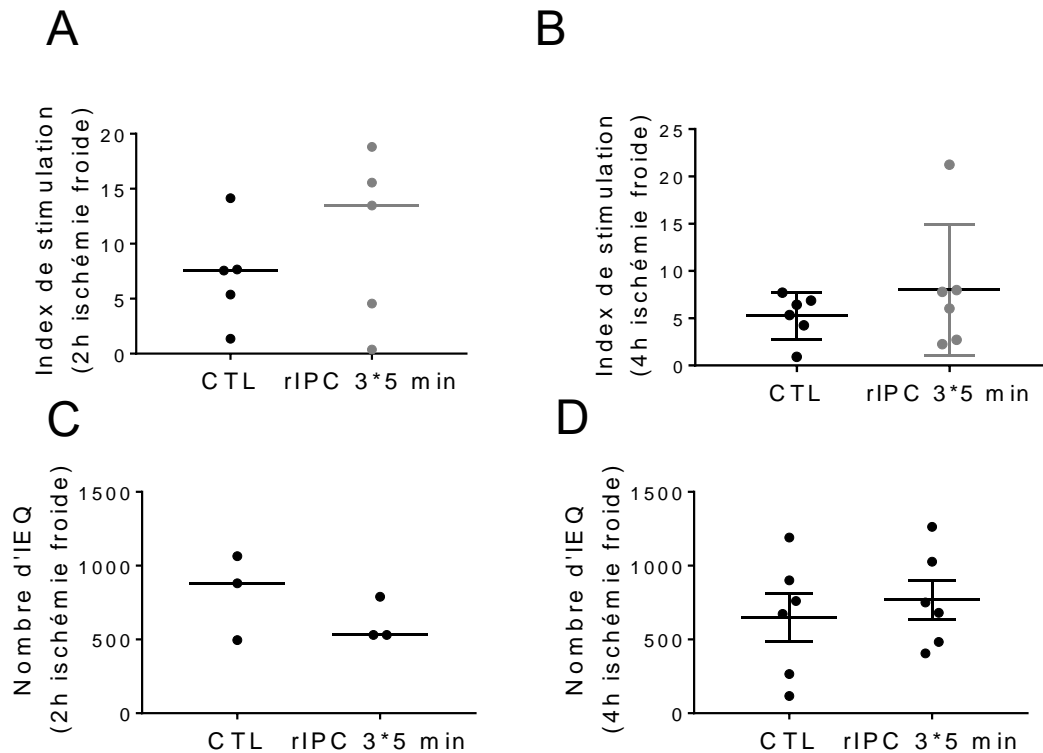
**Figure 36 : Pas d'impact d'un préconditionnement à l'ischémie sur la MAPK p38 et sur l'apoptose dans le tissu pancréatique de rat**

Après extraction des protéines de tissu pancréatique, le ratio p-p38/p38 (A) et la quantité de caspase 3 clivée (B) sont mesurés par kit ELISA ( $n=3-6$ ). 3 cycles de 5 min d'ischémie suivis de 5 min de reperfusion et d'une dernière période de reperfusion de 30 min sont réalisés sur l'artère fémorale gauche de rat anesthésié (rIPC = remote ischemic preconditioning). Les rats CTL subissent le même temps d'anesthésie mais sans application du préconditionnement. Les pancréas sont ensuite prélevés puis placés à 4°C et des morceaux de tissu sont congelés après 0-2 et 4h d'ischémie. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM ( $n=6$ ) ou avec la médiane ( $n=3$ ).

Le préconditionnement à l'ischémie a permis une augmentation des défenses antioxydantes et de voies de survies dans le tissu pancréatique. L'objectif suivant a donc été d'observer si ces bénéfices retrouvés au niveau de l'organe pouvaient avoir un impact sur les îlots après isolement.

#### 4.2.2. Impact d'un préconditionnement de 3\*5 min sur les îlots de rat

Le préconditionnement des pancréas avant isolement des îlots n'a pas montré d'impact significatif sur la fonction ou sur les rendements d'isolement après 2 ou 4h d'ischémie froide (Fig. 37A-B-C-D).

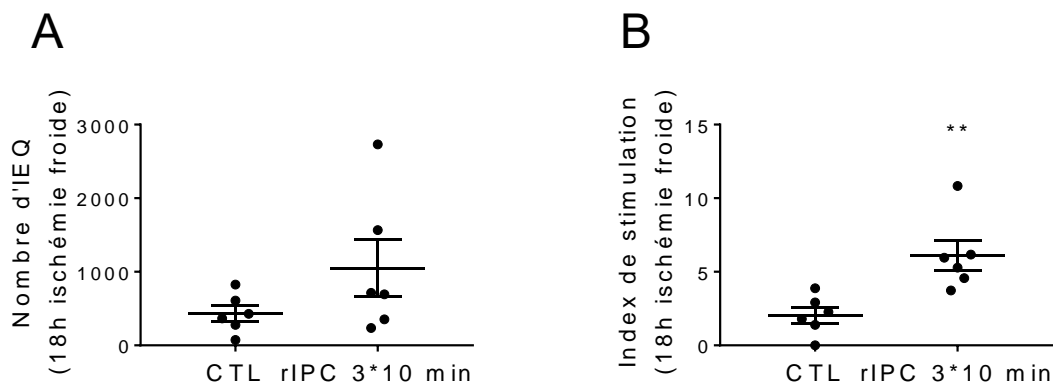


**Figure 37 : Pas d'impact d'un préconditionnement de 3\*5 min sur les îlots après 2 ou 4h d'ischémie**

La fonctionnalité des îlots représentant leur capacité à sécréter l'insuline est mesurée après 2h (A) ou 4h d'ischémie (B) (n=6). Les résultats sont exprimés en index de stimulation exprimant le ratio entre la quantité d'insuline sécrétée par les îlots en présence de concentration de glucose élevée (16,7mM) par rapport à la moyenne de la quantité sécrétée dans une solution à faible concentration en glucose (2,8mM) avant et après la stimulation au glucose. Les îlots récupérés par pancréas sont comptés en îlots équivalents (IEQ) (n=6) après 2h (C) ou 4h d'ischémie (D). 3 cycles de 5 min d'ischémie suivis de 5 min de reperfusion et d'une dernière période de reperfusion de 30 min sont réalisés sur l'artère fémorale gauche de rat anesthésié (rIPC = remote ischemic preconditioning). Les rats CTL subissent le même temps d'anesthésie mais sans application du préconditionnement. Les pancréas sont placés à 4°C puis des isoléments d'îlots sont réalisés après 2 ou 4h d'ischémie. Chaque point représente une préparation d'îlots de pancréas différents. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM (n=5-6) ou avec la médiane (n=3).

#### 4.2.3. Impact d'un préconditionnement de 3\*10min sur les îlots de rat

Le passage à des cycles de preconditionnement plus long de 3\*10 minutes induit une amélioration de l'index de stimulation des îlots après 18h d'ischémie ( $6,1 \pm 1$  pour les preconditionnés contre  $2 \pm 0,5$  pour les non preconditionnés ;  $p < 0.01$ ) (**Fig. 38B**). Le rendement en îlots récupérés par pancréas n'a pas été impacté (**Fig. 38A**).



**Figure 38 : Amélioration de la fonctionnalité des îlots de pancréas preconditionnés (3\*10 min) après 18h d'ischémie froide**

Les îlots récupérés par pancréas sont comptés en îlots équivalents (IEQ) ( $n=6$ ) après 18h d'ischémie (A). La fonctionnalité des îlots représentant leur capacité à sécréter l'insuline est mesurée après 18h d'ischémie (B) ( $n=6$ ). Les résultats sont exprimés en index de stimulation exprimant le ratio entre la quantité d'insuline sécrétée par les îlots en présence de concentration de glucose élevée (16,7mM) par rapport à la moyenne de la quantité sécrétée dans une solution à faible concentration en glucose (2,8mM) avant et après la stimulation au glucose. 3 cycles de 10 min d'ischémie suivis de 10 min de reperfusion et d'une dernière période de reperfusion de 30 min sont réalisés sur l'artère fémorale gauche de rat anesthésié (rIPC = remote ischemic preconditioning). Les rats CTL subissent le même temps d'anesthésie mais sans application du preconditionnement. Les pancréas sont placés à 4°C puis des isolements d'îlots sont réalisés après 18h d'ischémie. Chaque point représente une préparation d'îlots de pancréas différents. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0.01$ .

#### 4.2.4. Discussion

Dans cette étude nous avons montré que le préconditionnement à l'ischémie réalisé par garrot au niveau de la cuisse avec des cycles de 3 fois 5 minutes avait un impact sur le tissu pancréatique mais un impact limité sur les îlots. Une étude pilote a permis de démontrer que des cycles de 10 minutes étaient bénéfiques pour la fonction des îlots.

Le préconditionnement à distance par garrot au niveau de la patte arrière a permis de modifier certains paramètres du tissu pancréatique, validant l'efficacité de notre méthode. Tout d'abord, nous avons montré un impact positif des cycles de préconditionnement de 3 fois 5 minutes sur la mitochondrie. Tout comme dans le foie [246], il semblerait que l'action de PGC1 $\alpha$  induise une tolérance à l'ischémie dans le pancréas, notamment par l'activation de l'expression d'enzymes antioxydantes comme SOD2, également retrouvée dans les muscles squelettiques [247]. PGC1 $\alpha$ , étant également impliquée dans la prolifération des mitochondries, entraîne une respiration plus importante mais aussi une production de radicaux [249]. Par son action sur la SOD, ce coactivateur exerce une sorte de rétrocontrôle sur sa propre activité [249]. Ainsi, grâce à ce rôle dans la lutte contre le stress oxydant de PGC1 $\alpha$ , le préconditionnement direct du pancréas permettait la diminution du stress oxydant après 18h d'ischémie froide [257]. Par ailleurs, il a été montré que le maintien de l'intégrité des mitochondries était en relation avec l'activation de ERK par le préconditionnement [250]. Dans nos conditions, l'activation de ERK, transitoire à 2h, montre donc un impact positif sur le tissu des cycles de 3 fois 5 minutes. En effet, l'activation de ERK a été associée au processus de protection cellulaire du préconditionnement direct du cœur [248] ou du foie [293] car son inhibition en annule les effets bénéfiques [293]. Ainsi, l'activation de ERK démontre que le pancréas préconditionné est capable de répondre transitoirement à l'insulte ischémique. Cependant, nous n'avons observé aucun effet du préconditionnement sur les marqueurs en lien avec le stress ou la mort cellulaire. En effet, le préconditionnement n'empêche pas l'activation de la p38. L'implication de p38 dans le préconditionnement semble complexe. Lors du préconditionnement direct du cœur, l'effet protecteur de p38 a été mis en évidence. Une activation de p38 transitoire juste après les cycles était suivie d'une inhibition de son activité lors de l'insulte

ischémique elle-même [294]. Au contraire, au cours d'un préconditionnement à distance, aucun effet sur l'activité de p38 n'a été observé malgré la réduction de la taille de l'infarctus du myocarde [248]. La caractérisation de l'activation de p38 permettrait de mieux comprendre son implication dans les effets de l'ischémie dans le pancréas.

De par ces effets modérés sur le tissu pancréatique, une action limitée sur les îlots était prévisible. En effet, ni la fonction des îlots, ni le rendement d'isolement n'ont été impactés après 2h ou 4h d'ischémie. Ces résultats sont en lien avec ceux de Delaune *et al.* qui n'ont montré aucune incidence en terme de rendement d'îlots et de fonction après application d'un préconditionnement à distance (6 cycles de 4 minutes d'ischémie via clampage de l'artère fémorale de façon invasive) et sans période d'ischémie froide [258]. Prenant en considération les quelques marqueurs impliqués dans la survie cellulaire activés au niveau du pancréas et les résultats de Hogan *et al.*, il nous est apparu que l'optimisation des longueurs et du nombre de répétition des cycles pourraient améliorer l'impact sur le tissu endocrine. Hogan *et al.* [257] avait montré une augmentation du rendement des îlots avec une application unique de 10 minutes d'ischémie et après 18h d'ischémie (clampage direct des artères irriguant le pancréas). D'autres ont montré des effets bénéfiques suite à des cycles répétés de longueurs variables (10, 20min, répétés 3, 5 fois).

Nous avons donc réalisé un cycle unique de 45, 60 ou 120 minutes (données non montrées) ou encore des cycles de 10 ou de 20 (données non montrées) minutes répétées trois fois. L'impact sur les îlots a été le plus important avec la séquence de 3 fois 10 minutes et de 120 minutes avec une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Le maintien de la fonction des îlots malgré les 18 h d'ischémie a montré un réel bénéfice de cette longueur de cycle. Afin de déterminer le cycle parfait, le recours à une méthode de plan d'expérience permettrait de cribler un grand nombre de possibilités et limiter l'utilisation d'animaux, le modèle cellulaire n'ayant pas été fiable en matière de prédiction.

Notre étude a permis de mettre en évidence plusieurs paramètres :

- Le premier est le caractère temporel du préconditionnement. Nous avons mis en évidence des modulations transitoires de la PGC1 $\alpha$  ou encore de ERK, validant l'impact à distance de l'ischémie provoquée à la patte mais aussi

l'absence d'effet durable. Cependant, nous n'avons pas étudié l'effet retardé du préconditionnement qui est décrit dans la littérature. Il existe des changements transcriptionnels entre 24h et 48h après stimulus pourraient également induire des effets positifs [295]. D'ailleurs, la préservation des îlots 24h après culture démontrant une meilleure intégrité des îlots mise en évidence par Delaune *et al.*, pourrait être la conséquence de l'activation de voies de survie retardée.

- Le rôle central qu'exerce la mitochondrie dans le préconditionnement permet une meilleure préservation de nombreux organes, et son étude permettrait de comprendre les mécanismes mis en jeu dans le pancréas. Ainsi, une analyse approfondie (nombre de mitochondrie, étude des pores de transition...) des mitochondries permettrait de montrer si cette augmentation de l'expression de SOD2 est due à un nombre plus important de mitochondries ou si c'est le coactivateur transcriptionnel PGC1 $\alpha$  qui a permis une augmentation de l'expression du gène codant pour l'enzyme.
- L'impact de la température sur l'activation transitoire des protéines ne peut pas être exclu, il est donc possible que le préconditionnement bénéficierait d'une préservation accrue en normothermie comme lors de son application en chirurgie cardiaque par exemple [296]. Il serait intéressant de tester le préconditionnement sur des pancréas maintenus à température ambiante mais perfusé afin de confirmer cette hypothèse si cette protection était maintenue dans le temps.

Enfin, la composition et l'impact des facteurs libérés par l'ischémie de la patte n'ont pas été abordés dans cette étude et reste donc à réaliser afin de valider le préconditionnement à distance par garrot. Certaines études, sur la protection du cœur par un préconditionnement, ont permis de mettre en avant des mécanismes potentiels avec l'implication d'un relargage d'adénosine, d'opioïdes de bradykinine. Un prétraitement à l'adénosine par exemple est montré comme atténuant les lésions ischémiques *in vivo* et *in vitro* [297]. La découverte de facteurs permettant l'activation des voies de survie permettrait la supplémentation des solutions de préservation

pour se défaire de la problématique des différents protocoles de préconditionnement et de standardiser la protection. D'autre part ces facteurs circulants vont impacter les autres organes. Il sera essentiel de vérifier leur innocuité sur les organes vitaux, tels que le cœur, le foie ou encore le rein. En effet, le préconditionnement à distance peut être bénéfique pour d'autres organes, mais cela dépend des séquences de préconditionnement [298, 299].

Enfin, nous avons mis en évidence que l'impact transitoire du préconditionnement pourrait être lié à une absence d'énergie nécessaire pour maintenir le métabolisme et la phosphorylation des protéines. Au cours de l'ischémie, le pool d'ATP chute alors que les cellules ont un besoin basal en oxygène pour assurer leur survie. Nous nous sommes alors tournés vers une stratégie d'oxygénation du pancréas lors de l'ischémie qui fait l'objet de cette troisième et dernière partie.

### 4.3. Conditionnement du pancréas lors de l'ischémie froide via un transporteur d'oxygène

L'objectif de cette troisième partie était d'étudier l'impact d'un transporteur d'oxygène d'origine marine naturellement couplée à une activité antioxydante lors de la conservation du pancréas à 4°C. Dans un premier temps, le but est de valider l'effet bénéfique de la molécule sur des îlots en condition hypoxique.

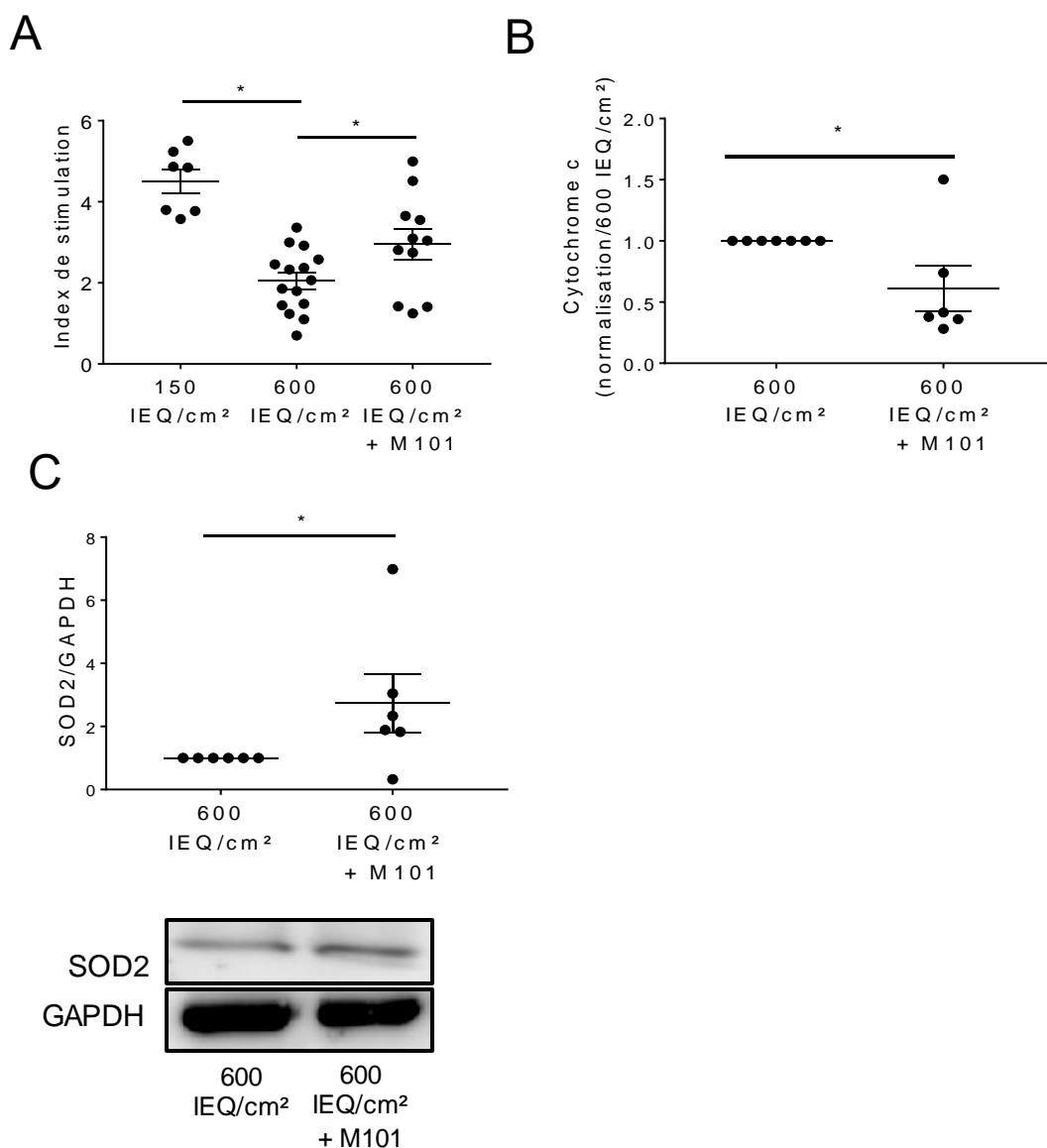
#### 4.3.1. Validation de l'effet bénéfique du transporteur d'oxygène sur des îlots de rat et humains en condition hypoxique

L'objectif de cette partie est de tester l'impact du transporteur d'oxygène M101, une hémoglobine de ver marin, lors de la culture d'îlots soumis à un stress hypoxique généré par un haut confinement (600 IEQ/cm<sup>2</sup>). Lors de la culture des îlots, les cellules ne peuvent compter que sur la diffusion de l'oxygène pour leur survie. Une densité importante d'îlots dans un espace de culture restreint va donc générer un stress hypoxique.

##### 4.3.1.1. Effet de M101 lors de la culture d'îlots humains en confinement

En premier lieu, nous avons observé que le confinement des îlots à une densité de 600 IEQ/cm<sup>2</sup> a un impact hautement délétère sur leur index de stimulation et donc sur la capacité des îlots à sécréter de l'insuline ( $2.04 \pm 0,19$  à 600 IEQ/cm<sup>2</sup> contre  $4,51 \pm 0,29$  à 150IEQ/cm<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ) (**Fig. 39A**). Il est ensuite observé que lorsque les îlots sont mis en culture avec M101 à 600 IEQ/cm<sup>2</sup>, l'index de stimulation est amélioré ( $2,95 \pm 0,37$  à 600 IEQ/cm<sup>2</sup> + M101 et  $2,96 \pm 0,34$  à 600 IEQ/cm<sup>2</sup> + M201 contre  $2.04 \pm 0,19$  à 600 IEQ/cm<sup>2</sup> ;  $p < 0,05$ ) (**Fig. 39A**). La culture des îlots avec M101 a également induit une diminution du relargage de cytochrome c dans le milieu de culture après 24h ( $0,61 \pm 0,19$  à 600 IEQ/cm<sup>2</sup> + M101 contre  $1 \pm N/A$  à 600 IEQ/cm<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ) (**Fig. 39B**) ainsi qu'une augmentation de l'expression de SOD2 dans les îlots ( $2,73 \pm 0,92$  à 600 IEQ/cm<sup>2</sup> + M101 contre  $1 \pm N/A$  à 600 IEQ/cm<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ) (**Fig. 39C**).





**Figure 39 : Amélioration de la fonctionnalité des îlots humains cultivés en conditions hypoxiques avec M101**

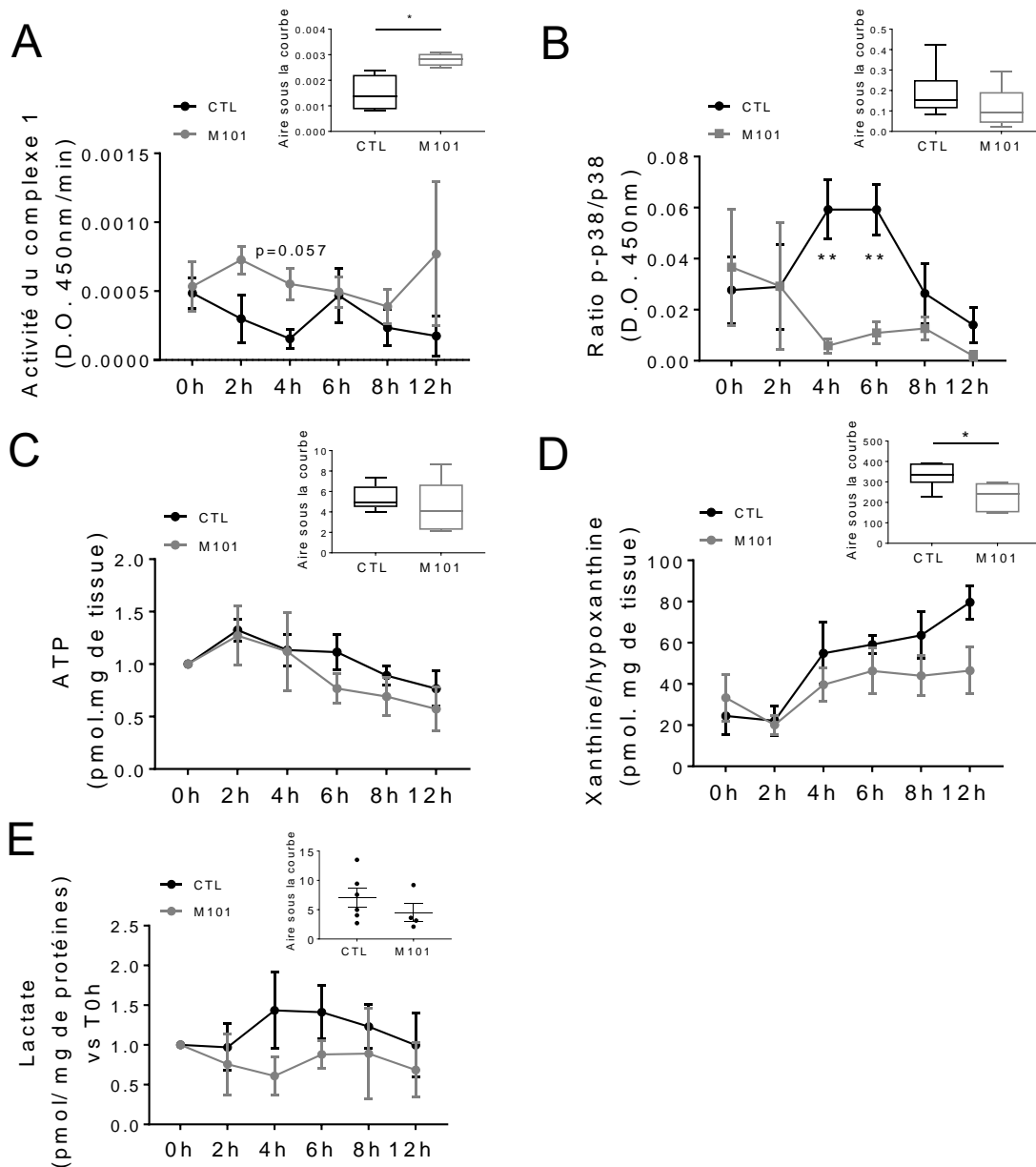
La fonctionnalité des îlots représentant leur capacité à sécréter l'insuline est mesurée après 24h de culture ( $n=7-15$ ) (A). Les résultats sont exprimés en index de stimulation exprimant le ratio entre la quantité d'insuline sécrétée par les îlots en présence de concentration de glucose élevée (16,7mM) par rapport à la moyenne de la quantité sécrétée dans une solution à faible concentration en glucose (2,8mM) avant et après la stimulation au glucose. Le cytochrome c est dosée dans le milieu de culture 24h après la culture ( $n=6$ ) (B). L'insuline et le cytochrome c sont dosées par kit ELISA. Après extraction des protéines, l'expression de SOD2 ( $n=6$ ) (C) est analysée par western blot. Des îlots humains sont isolés puis mis en culture à 37°C et à différentes densités (150 IEQ/cm<sup>2</sup> vs 600 IEQ/cm<sup>2</sup> ± M101 à 1g/L). Les résultats sont représentés par la moyenne ± SEM. \*  $p<0,05$ .

Nous avons donc observé un impact bénéfique de ce transporteur d'oxygène lors de la culture d'îlots en condition hypoxique et à 37°C. La suite de l'étude a consisté à tester l'effet de M101 lors de la préservation du pancréas à 4°C.

#### 4.3.2. Validation de l'effet de M101 lors de la préservation à 4°C du pancréas de rat

##### 4.3.2.1. Effet de M101 sur le pancréas lors d'une cinétique d'ischémie

L'ajout de M101 dans la solution de préservation a permis une augmentation de l'activité du complexe 1 mitochondriale dans le tissu pancréatique au cours de la cinétique d'ischémie (représenté par l'AUC) ( $0,0028 \pm 0,0001$  avec M101 contre  $0,0015 \pm 0,0003$  dans le groupe contrôle,  $p < 0,05$ ) (**Fig. 40A**). L'activité de la MAPK p38 impliquée dans le stress cellulaire est diminuée après 4 et 6h d'ischémie en présence de M101 (4h d'ischémie =  $0,006 \pm 0,003$  avec M101 contre  $0,059 \pm 0,01$  dans le groupe contrôle,  $p < 0,01$  ; 6h d'ischémie =  $0,01 \pm 0,004$  avec M101 contre  $0,059 \pm 0,01$  dans le groupe contrôle,  $p < 0,05$ ) (**Fig. 40B**). Le but initial de l'utilisation d'un transporteur d'oxygène était d'augmenter la capacité des cellules pancréatiques à produire de l'énergie cellulaire et donc d'améliorer leur survie lors de cette phase de conservation à 4°C. De manière surprenante, la présence d'M101 n'a induit aucune différence au niveau de la quantité d'ATP mesurée dans le tissu (**Fig. 40C**). M101 a en revanche permis une diminution de la quantité de xanthine/hypoxanthine (produit de dégradation de l'ATP) dans le tissu (représenté par l'AUC) ( $333 \pm 24$  avec M101 contre  $229 \pm 28$  dans le groupe contrôle,  $p < 0,05$ ) (**Fig. 40D**). Aucune différence significative n'est observée sur la quantité de lactate (**Fig. 40E**).

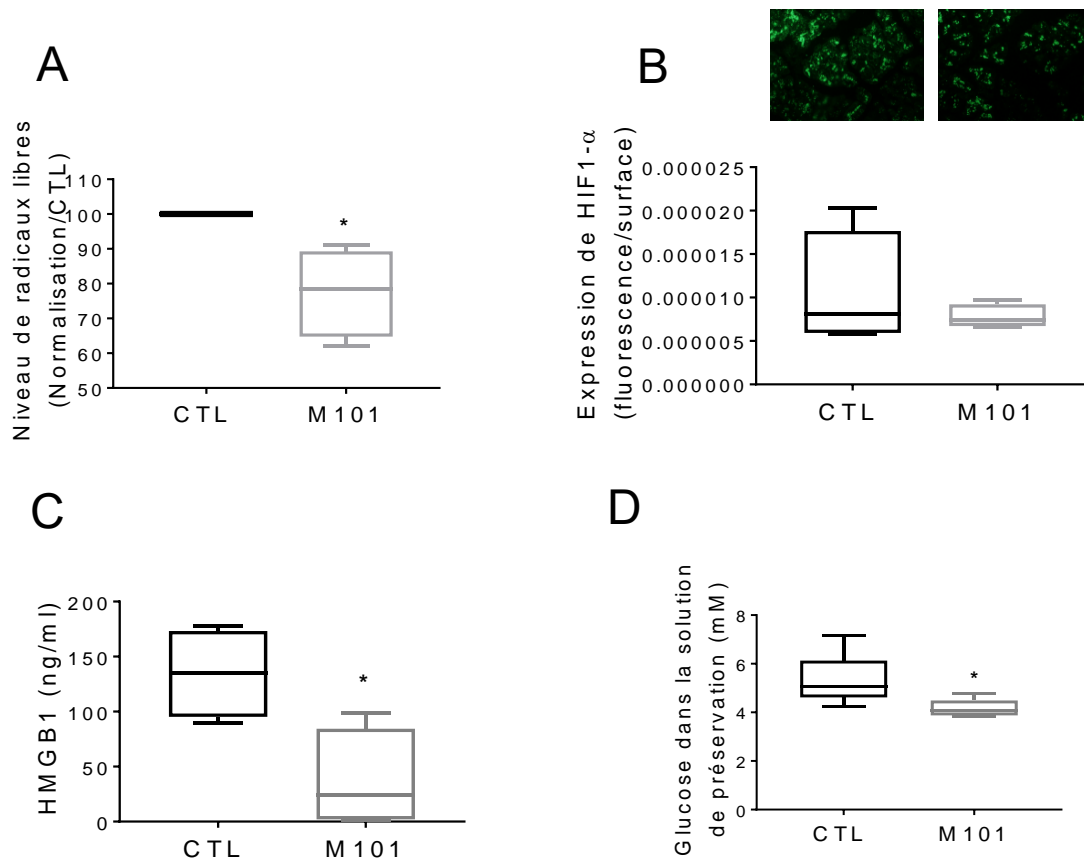


**Figure 40 : Augmentation de l'activité mitochondriale et inhibition de l'activation transitoire de p38 lors de l'ischémie en présence de M101**

Après extraction des protéines ou des métabolites du tissu pancréatique, l'activité du complexe 1 mitochondriale (n=4) (A), le ratio p-p38/p38 (n=6) (B), la quantité d'ATP (n=6) (C), de xanthine/hypoxanthine (n=6) (D) et de lactate (n=4) (E) sont mesurés par kit. Le pancréas est placé à 4°C dans une solution de préservation avec ou sans M101 (2g/L), puis des morceaux de tissu sont congelés après 0-2-4-6-8 et 12h d'ischémie. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM. \* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,001.

#### 4.3.2.2. Effet de M101 sur le pancréas après 6h d'ischémie

Après 6h d'ischémie, nous avons observé que la présence de M101 dans la solution de préservation a diminué la quantité de radicaux libres dans le tissu pancréatique ( $77 \pm 6\%$  avec M101 contre  $100 \pm NA$  dans le groupe contrôle,  $p < 0,05$ ) (**Fig. 41A**). En revanche, le niveau d'expression de HIF1- $\alpha$  n'est pas modifié par la molécule après 6h d'ischémie (**Fig. 41B**), suggérant un taux d'hypoxie similaire dans les deux conditions. La quantité de HMGB1, un marqueur de nécrose, accumulé dans la solution de préservation était près de 4 fois moins importante lorsque M101 est présent dans la solution de préservation ( $36,7 \pm 22,5$  ng/ml avec M101 contre  $134,5 \pm 20,5$  ng/ml dans le groupe contrôle,  $p < 0,05$ ) (**Fig. 41C**). La solution de préservation possédant 1 g de glucose par litre (5,5 mM), la présence de M101 montre une plus faible quantité de glucose dans la solution de préservation après 6h d'ischémie, suggérant que plus de glucose est absorbé et consommé par les cellules ( $4,16 \pm 0,17$  mM avec M101 contre  $5,3 \pm 0,48$  mM dans le groupe contrôle,  $p < 0,05$ ) (**Fig. 41D**).



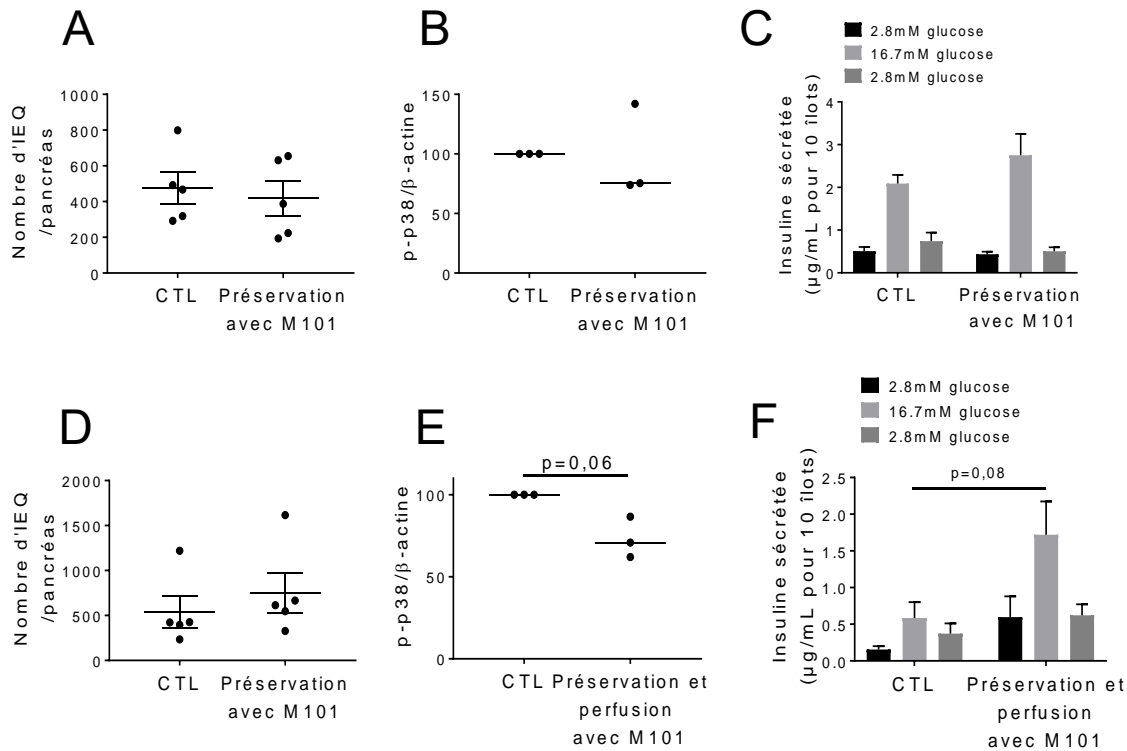
**Figure 41 : Diminution du stress oxydant, de la nécrose et augmentation de la consommation de glucose dans le tissu pancréatique après 6h d'ischémie en présence de M101**

La quantité de radicaux libres total dans le pancréas de rat ( $n=4$ ) est évaluée par l'intensité de fluorescence du marquage à la DHE et normalisée par la surface de la coupe du tissu (A). L'immunomarquage de HIF1- $\alpha$  est effectué sur des coupes de tissu en paraffine ( $n=4$ ) (B). La quantité de HMGB1 ( $n=4$ ) (C) et de glucose ( $n=5$ ) (D) dans la solution de préservation sont mesurées par kit. Le pancréas est placé à 4°C dans une solution de préservation avec ou sans M101 (2g/L), puis des morceaux de tissu ainsi que la solution de préservation sont congelés après 6h d'ischémie. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p<0,05$ .

#### 4.3.2.3. Effet de M101 injecté dans le pancréas et dans la solution de préservation sur les îlots de rat

L'impact de M101 sur la qualité des îlots a ensuite été mesuré par les rendements d'isolement, l'activation de p38 et la réponse à une stimulation au glucose. Deux

conditions d'utilisation ont été testés, la présence de M101 dans le milieu de préservation uniquement (**Fig. 42A-B-C**) et la présence de M101 dans le milieu de préservation et perfusé dans le pancréas (**Fig. 42D-E-F**). Le calcul des rendements d'isolement n'a mise en évidence aucun impact de M101, qu'il soit injecté ou présent uniquement dans la solution de préservation (**Fig. 42A-D**). Au cours d'un test de stimulation au glucose, la quantité d'insuline sécrétée tends à être plus importante lorsque M101 est injecté dans le pancréas ( $3,85 \pm 1,1$  mM avec M101 contre  $2,09 \pm 0,2$  mM dans le groupe contrôle,  $p=0,08$ ) (**Fig. 42F**), confirmant l'hypothèse que la molécule doit être injectée pour être efficace. L'activité de p38 est diminuée dans les îlots provenant de pancréas perfusés et préservés avec M101 par rapport au contrôle ( $73,1 \pm 7,2$  % avec M101 contre  $100 \pm N/A$  % dans le groupe contrôle,  $p<0,05$ ) (**Fig. 42E**).

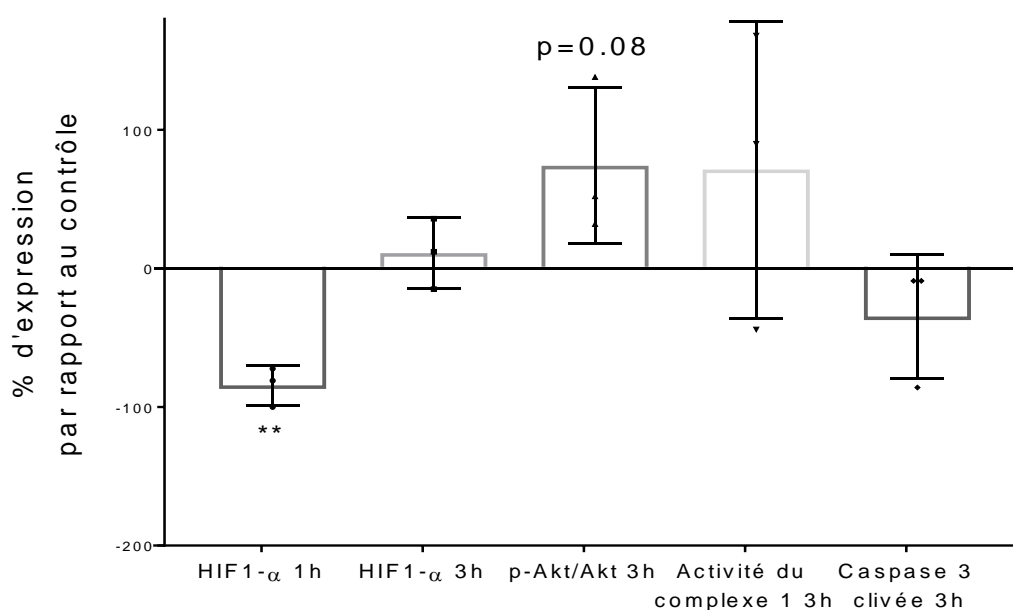


**Figure 42 : Amélioration de la qualité de l'îlot lorsque le pancréas est perfusé puis préservé dans la solution en présence de M101**

Des pancréas de rat sont soit préservés dans de la solution de préservation supplémentée de M101 (2g/L) ('préservation avec M101') (A,B,C) soit perfusé avec de la solution de préservation supplémentée de M101 au moment du prélèvement puis préservé dans la solution de préservation supplémentée de M101 (2g/L) ('Préservation et perfusion avec M101') (D,E,F). Les pancréas sont ainsi conservés pendant 6h d'ischémie froide puis les îlots sont isolés. Les îlots récupérés par pancréas sont comptés en îlots équivalents (IEQ) (n=5) (A et D). L'expression de p-p38 est analysée par Western Blot (B et E). La fonctionnalité des îlots représentant leur capacité à sécréter l'insuline est mesurée (C et F). Les résultats sont exprimés en index de stimulation exprimant le ratio entre la quantité d'insuline sécrétée par les îlots en présence de concentration de glucose élevée (16,7mM) par rapport à la moyenne de la quantité sécrétée dans une solution à faible concentration en glucose (2,8mM) avant et après la stimulation au glucose. L'insuline est dosée par kit ELISA. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.3.2.4. Utilisation de M101 pour la préservation de pancréas humain

Le but a été finalement d'étudier si M101 pourrait également avoir un effet bénéfique sur les pancréas et les îlots humains. Nous avons dans un premier temps observé que M101 réduit le niveau d'expression de HIF1- $\alpha$  après 1h mais pas après 3h d'exposition à M101 en ischémie froide (Fig. 43). En parallèle, la kinase AKT montrait une tendance à être activée après 3h de préservation tandis que 2 pancréas sur 3 ont vu l'activité du complexe 1 augmentée en présence d'M101 après 3h. Enfin, 3 pancréas sur 3 montraient une diminution de la quantité de caspase 3 clivée dans le tissu (Fig. 43). Ces résultats montrent que malgré l'exposition tardive du pancréas au transporteur d'oxygène, un effet positif est observé au niveau du tissu au niveau de l'hypoxie et de l'activité des mitochondries.



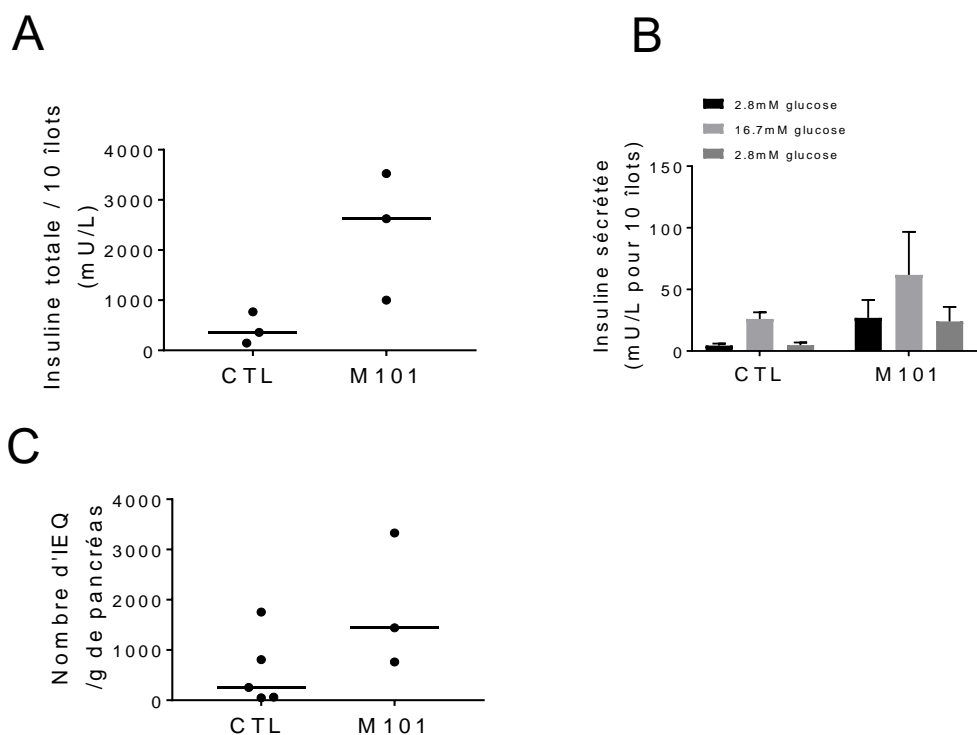
**Figure 43 : Diminution de l'hypoxie et activation de AKT dans le tissu pancréatique humain en présence de M101**

L'expression de HIF1- $\alpha$  est mesurée par immunomarquage sur des coupes de tissu en paraffine. L'activité de la kinase AKT, de la MAPK p38, du complexe 1 mitochondriale ainsi que la quantité de caspase 3 clivée sont mesurés par kit ELISA (n=3). 3 pancréas humain sont prélevés puis placés dans une solution de préservation qui varie selon l'équipe de préleveurs (Custodio® ou SCOT15®) à 4°C. Après 6h d'ischémie froide, les 3 pancréas sont



*injectés avec de la solution de préservation UW implémentée M101 (2g/L) et transférés dans cette même solution pendant 3h à 4°C. Des morceaux de pancréas sont congelés après 0-1 et 3h d'exposition à la molécule. Les résultats sont représentés en moyenne  $\pm$  SEM.*

Les îlots provenant des 3 pancréas humains préservés avec M101 ont montré une tendance à une augmentation de leur quantité d'insuline totale par rapport à des îlots de pancréas contrôle et disposant d'une durée d'ischémie similaire ( $2384 \pm 738$  mU/L avec M101 contre  $424 \pm 183$  mM mU/L dans le groupe contrôle) (**Fig. 44A**). Ceci semble être associé à une augmentation de la quantité d'insuline sécrétée à la fois en condition basale et stimulée ( $61,8 \pm 34,9$  mU/L avec M101 contre  $26,1 \pm 5,33$  mM mU/L dans le groupe contrôle) (**Fig. 44B**). Le nombre d'IEQ semble également être plus élevé lorsque les pancréas sont préservés avec M101 ( $2384 \pm 738$  IEQ/g de pancréas avec M101 contre  $424 \pm 183$  IEQ/g de pancréas dans le groupe contrôle) (**Fig. 44C**). Les pancréas humains étant rares et précieux, le nombre d'échantillons ne permet pas d'obtenir de significativité mais donnent des résultats encourageants qui semblent suivre ceux observés chez le rat.



**Figure 44 : Tendance à une amélioration de la qualité de l'îlot lorsque le pancréas humain a été préservé en présence de M101**

Le contenu en insuline totale (A) et la fonctionnalité des îlots (B) représentant leur capacité à sécréter l'insuline est mesurée après 24h de culture (n=3). Les résultats sont exprimés en index de stimulation exprimant le ratio entre la quantité d'insuline sécrétée par les îlots en présence de concentration de glucose élevée (16,7mM) par rapport à la moyenne de la quantité sécrétée dans une solution à faible concentration en glucose (2,8mM) avant et après la stimulation au glucose. La quantité d'insuline totale présente dans les îlots ainsi que la quantité d'insuline sécrétée par les îlots en réponse au glucose sont mesurés par ELISA. Les îlots récupérés par pancréas sont comptés en îlots équivalents (IEQ) par g de pancréas (n=3-5) (C). 3 pancréas humain sont prélevés puis placés dans une solution de préservation qui varie selon l'équipe de préleveurs (Custodiol® ou SCOT15®) à 4°C. Après 6h d'ischémie froide, les 3 pancréas sont injectés avec de la solution de préservation UW-Belzer implémentée M101 (2g/L) et transférés dans cette même solution pendant 3h à 4°C. L'isolement d'îlot est ensuite réalisé et les expériences sur les îlots sont effectuées après une nuit de culture à 37°C dans du milieu CMRL1066. Des îlots provenant d'expériences précédentes et provenant de pancréas ayant subi une durée d'ischémie non significativement différente ont servi de contrôle pour l'expérience. Les résultats sont représentés en moyenne  $\pm$  SEM ou avec la médiane.

### 4.3.3. Discussion

Dans cette partie, nous avons montré l'impact bénéfique qu'avait l'hémoglobine de ver marin M101 sur les îlots pancréatiques et sur la préservation du pancréas de rat et humain. Le but était dans un premier temps de valider l'effet du transporteur d'oxygène M101 sur des îlots humains cultivés à haute densité afin de générer un stress hypoxique [300]. Après validation de l'efficacité de M101 sur l'hypoxie des îlots pancréatiques, M101 a été utilisé pour la préservation des pancréas et a montré un impact positif sur le tissu et sur les îlots.

#### 4.3.3.1. Validation de la molécule sur les îlots humains

L'oxygène est une des variables les plus importantes lors de la culture de cellules impactant leur activité métabolique et leur survie. Les cellules sont typiquement cultivées à 21% d'oxygène et décrites comme étant cultivés en normoxie. Or la concentration d'oxygène réellement disponible pour les cellules est différente. Il existe en effet une différence de concentration entre la concentration en oxygène présent dans l'air ambiant et le milieu de culture (8mM dans l'air et 0,2mM dans un milieu à 37°C) [301]. Le volume de milieu utilisé agit comme barrière de diffusion entre la surface du liquide et la surface de la plaque de culture où reposent les cellules et impacte donc directement la quantité d'oxygène disponibles pour les cellules [301]. Un gradient de concentration en oxygène est alors retrouvé notamment dans le cœur des îlots les plus volumineux (150µm) [302]. A une densité trop importante, les cellules consomment l'oxygène à une vitesse excédant la capacité de l'oxygène à diffuser dans le milieu et résulte donc en l'apparition d'hypoxie [303]. Un tel modèle est donc idéal afin de tester la capacité oxygénante de M101.

A l'instar du modèle expérimental utilisé par Brandhorst *et al.* [300], nous cultivons des îlots humains à 600 IEQ/cm<sup>2</sup> pendant 24h à 21% d'oxygène. Ainsi de la même manière que Rodriguez *et al.* et Brandhorst *et al.* [300, 304], nous observons une diminution de la sécrétion d'insuline (index de stimulation) lorsque les îlots sont cultivés à 600 IEQ/cm<sup>2</sup> et comparé à 150 IEQ/cm<sup>2</sup> validant notre modèle. La

présence d'hypoxie génère du stress oxydant [154] endigué par la présence de M101. Une augmentation des capacités antioxydantes des îlots (augmentation de l'expression de l'enzyme antioxydante SOD2) a été montrée. Cette diminution potentielle du stress oxydant est corrélée à une préservation de la viabilité des îlots. En effet, l'hypoxie est à l'origine de l'apoptose sous le contrôle du facteur HIF et de la transcription de Bax et de Bcl-2 influençant le ratio dans les îlots [300, 305] qui se traduit par une fission de la mitochondrie et une libération du cytochrome c [306], qui était diminuée en présence de M101. La culture d'îlots avec des antioxydants a montré une amélioration de la survie des îlots ainsi qu'une diminution de l'apoptose [307, 308] montrant l'intérêt de lutter contre le stress oxydant. L'augmentation de l'expression de la SOD en présence de M101 combiné à l'activité antioxydante intrinsèque de la molécule pourrait donc être à l'origine de l'inhibition des processus apoptotiques dans les îlots induits par l'hypoxie.

Enfin, en parallèle, la présence de M101 dans le milieu de culture permet augmentation de la fonctionnalité de ces îlots. Les mécanismes de l'altération de la fonction des cellules  $\beta$  en hypoxie semblent être attribués à la transition du métabolisme aérobie vers la glycolyse anaérobie, aboutissant à une diminution de la production d'ATP nécessaires à la libération des granules d'insuline [309]. Le lactate, un marqueur classique de l'hypoxie, a en effet été retrouvé dans les îlots et dans le milieu de culture après 24h à 3% d'oxygène en parallèle d'une diminution de la sécrétion d'insuline [200]. Il apparaît donc que, outre son activité antioxydante, M101 avec sa forte affinité pour l'oxygène, permettrait une accélération du transfert d'oxygène entre l'air et les cellules dans le milieu de culture. Le maintien de l'activité mitochondriale qui en découle pourrait permettre de fournir suffisamment d'ATP permettant aux cellules  $\beta$  de libérer l'insuline en réponse au glucose. Les résultats obtenus dans cette partie montrent donc que M101 serait bénéfique pour les îlots et capable d'optimiser leur oxygénation.

Une application potentielle issue de ce travail serait d'augmenter la densité des îlots en culture avant transplantation. Ils sont aujourd'hui cultivés à une densité de 150 IEQ/cm<sup>2</sup>, ce qui représente un nombre important de flasque à manipuler (20 à 30, [310]) augmentant également le risque de contamination lors du changement de milieu. Augmenter la densité des îlots lors de la culture permettrait de faciliter la maintenance de ces flasques et d'éviter les contaminations tout en préservant la

masse d'îlots fonctionnels avant transplantation. Cependant, la fonction des îlots cultivés à cette densité en présence de M101 était moindre que celle des îlots cultivés à 150IEQ/cm<sup>2</sup>, ce point étant crucial pour l'efficacité de la greffe, une optimisation de la quantité du transporteur d'oxygène et de la densité s'avérera nécessaire pour obtenir des conditions idéales de culture. Outre cette découverte, nous avons validé l'utilisation de la molécule sur les îlots humains, ne révélant aucune toxicité voire même des effets anti-apoptotique et antioxydant. Ainsi cette molécule a été testée pour favoriser la survie du tissu pancréatique et des îlots lors de la phase d'ischémie froide également.

#### 4.3.3.2. Préservation de pancréas de rat et humains

Les organes étant préservés à 4°C, la solubilité de l'oxygène augmente et favorise donc l'accès des cellules à l'oxygène. Cet atout de la préservation à froid n'est cependant pas suffisant pour limiter les phénomènes d'hypoxie cellulaire. Les besoins des cellules, même ralentis par la température, demeurent importants. De la même manière que lors de la culture de cellules [301], l'oxygène présent est rapidement consommé par la très grande quantité de cellules qui composent l'organe, créant un gradient de concentration en oxygène. Une manière d'accélérer les échanges et d'augmenter la concentration en oxygène est d'utiliser M101 qui va transporter 156 molécules en oxygène par hème [269].

Appliqué à la préservation d'organe, M101 a montré un impact positif sur la qualité des pancréas et des îlots. Le pouvoir oxygénant de la M101 a été mis en évidence par le maintien de l'activité du complexe 1 mitochondrial durant le début de l'ischémie dans le tissu pancréatique de rat. Ces résultats, en accord avec l'étude de l'impact de M101 sur les cellules endothéliales [273], montrent que l'apport d'oxygène, (accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire) permet à la chaîne respiratoire de continuer à fonctionner. Ceci est corroboré par la diminution du taux de glucose dans le milieu de préservation démontrée dans d'autres modèles [311] et une tendance à une production limitée de lactate indiquant une phosphorylation oxydative maintenue.

Cependant, la mesure du facteur HIF-1 $\alpha$  a mis en évidence que l'oxygénation était transitoire pour le rat (aucun effet à 6h sur HIF) comme pour l'humain (effet perdu à 3h). Ainsi, la lutte contre l'hypoxie est limitée dans le temps, avec peu d'impact sur la production d'ATP au cours de la cinétique. Considérant le fait que la molécule est stable durant plus de 48h dans différentes solutions de préservation [270], la perte d'efficacité provient plus vraisemblablement d'un manque d'accessibilité à l'oxygène dissout dans la solution plutôt qu'une dégradation de la molécule. D'ailleurs, Glorion *et al.* a montré que l'expression de HIF1 $\alpha$  n'était pas impacté par M101 dans le poumon [274]. Il est possible que sans agitation, les cellules consomment l'oxygène ce qui décharge M101. Sans agitation et flux d'oxygène de la surface vers la molécule, elle ne peut pas se recharger. Il serait intéressant de tester l'effet de M101 sur la production d'ATP lors d'une conservation avec agitation afin de recharger continuellement la molécule en oxygène par exemple. La diminution de la dégradation de l'ATP, représentée par la xanthine/hypoxanthine mesurée, suggère tout de même une meilleure utilisation des ressources en ATP du pancréas en présence de M101 [138] et une diminution du stress oxydant. En effet la xanthine oxydée en acide urique aboutit à la production d'ions superoxyde. En limitant la dégradation de l'ATP, le stress oxydant est contenu.

Outre cette oxygénation qui serait potentialisée par une agitation, l'activité antioxydante de la molécule est très importante dans la préservation du pancréas. La concordance entre la diminution du stress oxydant et la nécrose en est la preuve. M101 en diminuant le stress oxydant généré par l'ischémie, permet de réduire l'apparition de phénomènes nécrotiques dans le tissu (diminution de HGBM1, DAMP activateur des TLRs inducteurs de signaux pro-inflammatoires) et donc de réduire la sécrétion de cytokines et de chemokines [190, 274]. La diminution du statut pro-inflammatoire du tissu lors de l'ischémie résulte en une inhibition de l'activation de ces voies, illustrée par la diminution de la MAPK p38 en présence de M101. Cette diminution de l'inflammation s'est révélée bénéfique pour les îlots pancréatiques contenus dans le pancréas. Nos résultats montrent que les îlots de rat *in vitro* sécrètent plus d'insuline en condition stimulée lorsque les pancréas ont été préservés en présence de M101. De plus, à l'instar de l'utilisation de la glutamine pour préserver les îlots du stress oxydant [312], M101 est plus efficace quand elle est injectée dans le pancréas par la voie ductale.

Une tendance similaire est observée lors de la perfusion et la préservation de trois pancréas humains. Malgré l'exposition tardive de ces pancréas à la molécule (exposition de 3h après 6h d'ischémie initiale sans la molécule), un effet positif semble être observé sur le rendement en nombre d'îlots, le contenu en insuline total et la capacité à sécréter de l'insuline en condition basale et stimulée. Ces résultats montrent qu'il serait possible de 'récupérer' des pancréas ayant déjà subi une certaine période d'ischémie. Les détracteurs des transporteurs d'oxygène pour la préservation d'organe mettent en avant la densité des tissus humains (par opposition aux tissus murins) empêchant la pénétration de l'oxygène profondément. Ceci a été montré avec les PFC [263]. L'avantage de M101 par rapport aux PFCs est que la molécule peut être injectée dans le tissu avant digestion sans problème de toxicité, de compatibilité puisque l'hémoglobine est soluble dans un milieu aqueux contrairement aux PFCs. Les validations réglementaires pourraient aussi être simplifiées, car M101 pourrait être ajouté aux milieux de préservation existants sans autres adjuvants.

Concernant les analyses sur les îlots humains qui confirment les résultats sur les îlots de rat, un point limitant doit être évoqué. Les pancréas humains étant du matériel rare et non standardisé, il est apparu que le groupe traité par M101 présentait une différence d'âge avec le groupe contrôle ( $p=0.0525$ ) pour les expériences sur les isollements. Les îlots extraits d'un pancréas préservé en présence de M101 issu d'un donneur de 38 ans montraient une sécrétion d'insuline plus importante. Il est cependant aujourd'hui impossible d'imputer cette sécrétion plus importante sur l'effet de l'âge, de M101, de l'expérimentation. Il est nécessaire d'augmenter le nombre d'isollements pour dégager une certitude. Cependant, en s'appuyant sur les résultats obtenus sur le rat, les résultats obtenus sur les pancréas humains semblent très prometteurs.

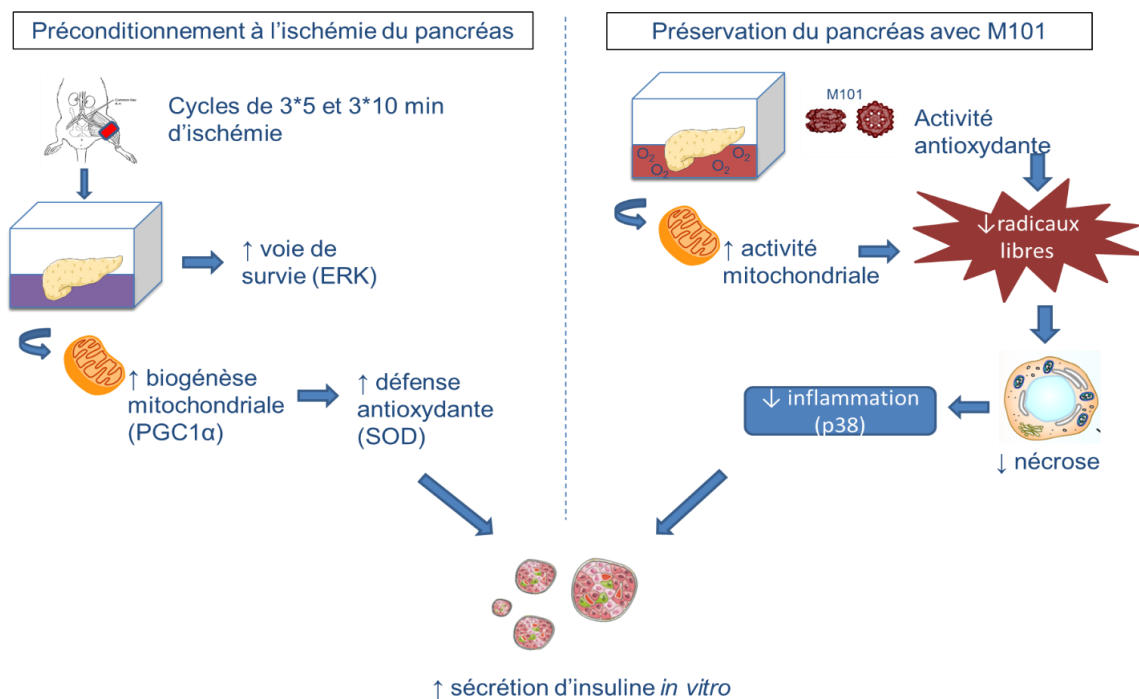
L'apport de M101 pourrait améliorer la préservation de greffons marginaux, comme par exemple les greffons provenant de donneurs décédés qui sont plus sensibles aux effets de l'ischémie froide dû à l'existence d'une durée variable d'ischémie chaude dû à l'arrêt cardiaque. La simplicité d'utilisation pour la préservation en statique en hypothermie représente un attrait considérable pour une utilisation en clinique. Le fait que la molécule ait déjà prouvé sa non-toxicité lors d'un premier essai clinique de sûreté et qu'un deuxième essai d'efficacité soit en cours

lors de la préservation du rein accélérera également la mise en place d'essais cliniques sur le pancréas.



## 5. Conclusions

Cette thèse avait pour objectif dans un premier temps de déterminer des marqueurs de l'ischémie sur le pancréas de rat et humain. Cette première partie nous a permis d'observer des changements métaboliques majeurs au niveau de l'organe (augmentation progressive du stress oxydant, de voie de stress cellulaire) en fonction du temps d'ischémie pouvant être corrélé à une perte progressive de la qualité des îlots après isolement. Nous avons ensuite testé l'effet d'un préconditionnement du pancréas à l'ischémie et d'un transporteur d'oxygène d'origine marine afin de diminuer/retarder l'apparition des lésions ischémiques dans le pancréas lors de la phase de conservation. Ces deux stratégies ont montré un apport bénéfique sur les lésions ischémiques et passant par des voies différentes aboutissant à une amélioration de la qualité des îlots après isolement. Une utilisation combinée de ces deux stratégies : le préconditionnement à distance du pancréas permettrait d'augmenter la masse et l'activité des mitochondries et l'utilisation du transporteur d'oxygène M101 permettrait le bon fonctionnement de ces mitochondries lors de la phase de conservation pour une protection renforcée du pancréas.



**Figure 45 : Bilan des effets d'un préconditionnement à l'ischémie et du transporteur d'oxygène M101 sur la préservation du pancréas**



## 6. Perspectives

Notre étude sur l'utilisation de M101 pour la préservation du pancréas présentant peu d'obstacle réglementaire, (intervention sur le donneur et molécule déjà en clinique et sur le point d'être mise sur le marché pour la préservation d'organe), pourrait être transférée en clinique rapidement sous réserve de confirmer certains points clés. La capacité de la molécule à oxygéner toutes les parties d'un organe solide et de grande taille comme le pancréas humain est notamment à déterminer. Une étude sur un modèle de préservation de pancréas porcins permettrait de répondre à cette question en établissant un modèle reproductible d'étude de différentes zones du pancréas (tête, queue, profondeur du tissu...) et de comparer au niveau tissulaire l'impact de l'oxygénation entre le tissu en surface et celui en profondeur. Une meilleure compréhension du mode d'action du transporteur d'oxygène M101 pourrait permettre d'optimiser son utilisation et donc ses effets positifs sur le greffon (température optimale de fonctionnement, besoin ou non d'agiter le milieu de préservation pour optimiser la captation de nouvelles molécules d'oxygène par la molécule).

Une des limites de notre étude sur le rat est l'absence de modèle de mort encéphalique. En effet, la majorité des organes transplantés proviennent d'individus en état de mort cérébrale ce qui mène à des changements hormonaux, une activation du système immunitaire et de l'inflammation notamment. Il a été décrit que la mort cérébrale réduit la tolérance des organes à la phase d'ischémie, réduit la survie du greffon après transplantation et diminue les rendements et la fonction d'îlots de rat [313, 314]. La plupart des études sur animaux sont effectuées en l'absence de mort cérébrale car c'est un modèle compliqué à mettre en place. De même dans notre étude, les pancréas prélevés sur les rats ont été prélevés sur donneur à cœur battant sous anesthésie et n'ont donc pas subi l'important syndrome inflammatoire de réponse systémique. Ce phénomène est dû à l'arrêt de l'activité cérébrale avec le maintien de la circulation sanguine qui provoque un dysfonctionnement général. Ceci va inclure une sécrétion massive de catécholamines, de cytokines, des problèmes d'hémodynamie ainsi que des problèmes thermiques et endocriniens [315]. Ces conséquences peuvent avoir un retentissement important sur le fonctionnement des organes du donneur en

entraînant potentiellement une hypoperfusion tissulaire et une augmentation de la production de radicaux libres. Certains de ces paramètres peuvent être pris en charge en clinique mais peuvent être tout de même responsables de la survie diminuée des organes après transplantation. Ce paramètre s'ajoute donc aux phénomènes d'ischémie décrits dans ce travail. Les perspectives de ce travail seraient donc de mettre en place un modèle de mort encéphalique sur le rat afin de s'approcher un maximum de la réalité clinique et d'étudier l'influence de ce paramètre sur les biomarqueurs mis en évidence dans cette partie. Il existe des modèles de mort encéphalique sur le rat consistant en une augmentation de la pression intracrânienne. Une phase de mise au point du modèle de mort encéphalique serait tout d'abord nécessaire avec validation de marqueurs confirmant la réussite de l'induction de la mort cérébrale (mesure de marqueurs inflammatoires :  $TNF\alpha$ ,  $IL1-\beta$ ...). En revanche, l'effet bénéfique du transporteur d'oxygène M101 observé sur nos pancréas humains qui proviennent de donneurs en état de mort encéphalique est encourageant sur le fait que ces organes dits plus sensibles peuvent également bénéficier des effets de la molécule.

Ensuite, il serait intéressant de combiner les deux approches développées dans ce travail. Les effets bénéfiques apportés par ces deux stratégies semblent passer par des voies différentes. D'un côté le préconditionnement à distance du pancréas semble permettre une augmentation du nombre et du fonctionnement des mitochondries du pancréas comme en atteste certains marqueurs protéiques ( $PGC1\alpha$ ,  $SOD2$ ). En revanche, cette masse mitochondriale aura une action limitée lors de la période d'ischémie due au manque d'oxygène. Un apport d'oxygène lors de la phase de conservation de pancréas pourrait donc permettre de valoriser la production plus importante de mitochondries du préconditionnement. Le transporteur d'oxygène M101 qui a montré une amélioration de l'activité mitochondriale, une réduction du stress oxydant et de la nécrose dans le pancréas pourrait être un candidat idéal. Il serait donc intéressant de combiner ces deux approches et de mesurer la production d'énergie, le niveau de stress oxydant et de nécrose lors de la préservation du pancréas. L'impact sur le nombre et la fonction des îlots après isolement pourraient ainsi également être amélioré.

## 7. Ouvertures

Prenons maintenant un peu de recul par rapport à ces travaux et replaçons les dans le contexte actuel de la transplantation de pancréas et d'îlots. En France en 2017, seulement 33% des pancréas éligibles à l'isolement d'îlots ont abouti à une transplantation d'îlots. Les phénomènes d'ischémie-reperfusion représentent une menace pour l'intégrité cellulaire lors de la phase de conservation réduisant la qualité de l'organe avant même la phase d'isolement. Les deux stratégies décrites dans ces travaux disposent d'un fort potentiel de protection du pancréas et des îlots et sont toutes les deux très facilement et rapidement applicables en clinique. Une optimisation du nombre de pancréas utilisés en vue de transplantation est donc largement envisageable à court terme qui permettrait de réduire le nombre de patients en attente de transplantation d'îlots.

Ces résultats montrent que la clé pour répondre à cette problématique de préservation d'organes se trouve dans la nature. Ainsi, les millions d'années d'évolution du ver marin *arenicole marina* ont permis le développement de cette hémoglobine afin d'assurer la vie de cet organisme dans des conditions variantes de normoxie et d'hypoxie, de changement de température. Le préconditionnement est également basé sur des phénomènes naturels d'adaptation à des phases d'ischémie afin de préparer les cellules à lutter contre ces phénomènes.

Un autre modèle naturel extrêmement intéressant est la capacité d'hibernation de certains mammifères, dans le but de réduire les besoins énergétiques lorsque la nourriture se fait plus rare en hiver. Ainsi, ces animaux sont capables de diminuer leur métabolisme et leur température corporelle, donc leurs besoins énergétiques lors de leur entrée en torpeur, et de réactiver le métabolisme et la température corporelle à 37°C au début du printemps. Et de manière extraordinaire, cela se fait sans dommages majeurs permettant aux animaux de réitérer ces cycles d'hibernation chaque année. Il s'avère que, contrairement à la transplantation d'organe où le métabolisme est réduit à cause de la mise à 4°C, les animaux hibernateurs diminuent leur métabolisme de façon active ce qui engendre une diminution de la température corporelle. Nous pourrions même aller encore plus loin dans la préservation d'organe avec la congélation. La grenouille *rana sylvatica* est en

effet capable de congeler entièrement son organisme lors des périodes de grand froid et de revenir progressivement à la vie lors du printemps. Comprendre les mécanismes de ce modèle naturel de plasticité métabolique représente donc une approche très intéressante pour allonger de façon significative la durée d'ischémie supportée par les organes à l'heure actuelle. L'Homme n'étant pas adapté génétiquement pour effectuer des périodes d'hibernation, il ne serait peut-être pas possible d'atteindre le même niveau de protection que les animaux hibernateurs, mais une combinaison de facteurs permettant la mise en dormance d'organe, de facteurs habituant l'organe à l'ischémie et d'un apport d'une certaine quantité d'oxygène pourrait permettre de s'approcher de la méthode idéale de préservation d'organe humain.

## 8. Références

1. **Hismiogullari AA, Bozdayi AM and Rahman K.** Biliary lipid secretion. *Turk J Gastroenterol.* 2007; 18: 65-70.
2. **Roder PV, Wu B, Liu Y, et al.** Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med.* 2016; 48: e219.
3. **Baker JS, McCormick MC and Robergs RA.** Interaction among Skeletal Muscle Metabolic Energy Systems during Intense Exercise. *J Nutr Metab.* 2010; 2010: 905612.
4. **Chandra R and Liddle RA.** Recent advances in the regulation of pancreatic secretion. *Curr Opin Gastroenterol.* 2014; 30: 490-4.
5. **Tyberg A, Karia K, Gabr M, et al.** Management of pancreatic fluid collections: A comprehensive review of the literature. *World J Gastroenterol.* 2016; 22: 2256-70.
6. **Saito K, Iwama N and Takahashi T.** Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas. *Tohoku J Exp Med.* 1978; 124: 177-86.
7. **In't Veld P and Marichal M.** Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 654: 1-19.
8. **Dolensek J, Rupnik MS and Stozer A.** Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets.* 2015; 7: e1024405.
9. **Da Silva Xavier G.** The Cells of the Islets of Langerhans. *J Clin Med.* 2018; 7.
10. **Jansson L, Barbu A, Bodin B, et al.** Pancreatic islet blood flow and its measurement. *Ups J Med Sci.* 2016; 121: 81-95.
11. **Begg DP and Woods SC.** Interactions between the central nervous system and pancreatic islet secretions: a historical perspective. *Adv Physiol Educ.* 2013; 37: 53-60.
12. **Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, et al.** Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53: 1087-97.
13. **Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, et al.** The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 2334-9.
14. **Bosco D, Armanet M, Morel P, et al.** Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes.* 2010; 59: 1202-10.
15. **Kim MK, Kim HS, Lee IK, et al.** Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: a review. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012: 509437.
16. **Tokarz VL, MacDonald PE and Klip A.** The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol.* 2018; 217: 2273-89.
17. **Magro MG and Solimena M.** Regulation of beta-cell function by RNA-binding proteins. *Mol Metab.* 2013; 2: 348-55.
18. **Hay DL, Chen S, Lutz TA, et al.** Amylin: Pharmacology, Physiology, and Clinical Potential. *Pharmacol Rev.* 2015; 67: 564-600.
19. **Morris A.** Acute effects of glucagon on the liver. *Nat Rev Endocrinol.* 2018; 14: 323.
20. **Eigler T and Ben-Shlomo A.** Somatostatin system: molecular mechanisms regulating anterior pituitary hormones. *J Mol Endocrinol.* 2014; 53: R1-19.
21. **Muller TD, Nogueiras R, Andermann ML, et al.** Ghrelin. *Mol Metab.* 2015; 4: 437-60.
22. **Tiscornia OM, Negri GA, Otero G, et al.** Pancreatic polypeptide: a review of its involvement in neuro-endocrine reflexes, islet-acinar interactions and ethanol-evoked

- physiopatologic pancreatic gland changes. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2015; 45: 155-64.
23. **Aragon F, Karaca M, Novials A, et al.** Pancreatic polypeptide regulates glucagon release through PPYR1 receptors expressed in mouse and human alpha-cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1850: 343-51.
  24. **Thorens B.** GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*. 2015; 58: 221-32.
  25. **Li XB, Gu JD and Zhou QH.** Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thorac Cancer*. 2015; 6: 17-24.
  26. **Akram M.** Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem Biophys*. 2014; 68: 475-8.
  27. **Wilson DF.** Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. *J Physiol*. 2017; 595: 7023-38.
  28. **Poburko D and Demaurex N.** Regulation of the mitochondrial proton gradient by cytosolic Ca(2)(+) signals. *Pflugers Arch*. 2012; 464: 19-26.
  29. **McTaggart JS, Clark RH and Ashcroft FM.** The role of the KATP channel in glucose homeostasis in health and disease: more than meets the islet. *J Physiol*. 2010; 588: 3201-9.
  30. **Yang SN, Shi Y, Yang G, et al.** Ionic mechanisms in pancreatic beta cell signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71: 4149-77.
  31. **Wang Z and Thurmond DC.** Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci*. 2009; 122: 893-903.
  32. **Cen J, Sargsyan E and Bergsten P.** Fatty acids stimulate insulin secretion from human pancreatic islets at fasting glucose concentrations via mitochondria-dependent and -independent mechanisms. *Nutr Metab (Lond)*. 2016; 13: 59.
  33. **Newsholme P and Krause M.** Nutritional regulation of insulin secretion: implications for diabetes. *Clin Biochem Rev*. 2012; 33: 35-47.
  34. **Brun T and Maechler P.** Beta-cell mitochondrial carriers and the diabetogenic stress response. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1863: 2540-9.
  35. **Rorsman P and Renstrom E.** Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2003; 46: 1029-45.
  36. **Najjar SM and Perdomo G.** Hepatic Insulin Clearance: Mechanism and Physiology. *Physiology (Bethesda)*. 2019; 34: 198-215.
  37. **Petersen MC, Vatner DF and Shulman GI.** Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2017; 13: 572-87.
  38. **Leto D and Saltiel AR.** Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13: 383-96.
  39. **Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, et al.** Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011; 93 Suppl 1: S52-9.
  40. **Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, et al.** Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol*. 2008; 199: 5-19.
  41. **Gaisano HY, Macdonald PE and Vranic M.** Glucagon secretion and signaling in the development of diabetes. *Front Physiol*. 2012; 3: 349.
  42. **Knudsen JG, Hamilton A, Ramracheya R, et al.** Dysregulation of Glucagon Secretion by Hyperglycemia-Induced Sodium-Dependent Reduction of ATP Production. *Cell Metab*. 2019; 29: 430-42 e4.
  43. **Ramnanan CJ, Edgerton DS, Kraft G, et al.** Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes Obes Metab*. 2011; 13 Suppl 1: 118-25.



44. **Sharabi K, Tavares CD, Rines AK, et al.** Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Mol Aspects Med.* 2015; 46: 21-33.
45. **Burrack AL, Martinov T and Fife BT.** T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017; 8: 343.
46. **Herold KC, Usmani-Brown S, Ghazi T, et al.** beta cell death and dysfunction during type 1 diabetes development in at-risk individuals. *J Clin Invest.* 2015; 125: 1163-73.
47. **Pociot F.** Type 1 diabetes genome-wide association studies: not to be lost in translation. *Clin Transl Immunology.* 2017; 6: e162.
48. **Noble JA and Valdes AM.** Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2011; 11: 533-42.
49. **Taplin CE and Barker JM.** Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity.* 2008; 41: 11-8.
50. **Couper JJ, Haller MJ, Ziegler AG, et al.** ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Phases of type 1 diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2014; 15 Suppl 20: 18-25.
51. **Tridgell DM, Spiekerman C, Wang RS, et al.** Interaction of onset and duration of diabetes on the percent of GAD and IA-2 antibody-positive subjects in the type 1 diabetes genetics consortium database. *Diabetes Care.* 2011; 34: 988-93.
52. **Wilcox NS, Rui J, Hebrok M, et al.** Life and death of beta cells in Type 1 diabetes: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2016; 71: 51-8.
53. **Rabinovitch A and Suarez-Pinzon WL.** Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. *Cell Biochem Biophys.* 2007; 48: 159-63.
54. **Petrovsky N, Silva D, Socha L, et al.** The role of Fas ligand in beta cell destruction in autoimmune diabetes of NOD mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 958: 204-8.
55. **Katsarou A, Gudbjornsdottir S, Rawshani A, et al.** Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers.* 2017; 3: 17016.
56. **Kahanovitz L, Sluss PM and Russell SJ.** Type 1 Diabetes - A Clinical Perspective. *Point Care.* 2017; 16: 37-40.
57. **Andreasson R, Ekelund C, Landin-Olsson M, et al.** HbA1c levels in children with type 1 diabetes and correlation to diabetic retinopathy. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2018; 31: 369-74.
58. **Viswanathan V.** Preventing microvascular complications in type 1 diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab.* 2015; 19: S36-8.
59. **Nathan DM and Group DER.** The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes Care.* 2014; 37: 9-16.
60. **Switzer SM, Moser EG, Rockler BE, et al.** Intensive insulin therapy in patients with type 1 diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2012; 41: 89-104.
61. **Mane K, Chalubaraju K, Niranjan M, et al.** Review of insulin and its analogues in diabetes mellitus. *J Basic Clin Pharm.* 2012; 3: 283-93.
62. **Matsuda E and Brennan P.** The effectiveness of continuous subcutaneous insulin pumps with continuous glucose monitoring in outpatient adolescents with type 1 diabetes: A systematic review. *JBI Libr Syst Rev.* 2012; 10: 1-10.
63. **Span N, Teplova A, Stam G, et al.** Systematic review: continuous intraperitoneal insulin infusion with implantable insulin pumps for diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 2014; 51: 339-51.
64. **Shirin A, Della Rossa F, Klickstein I, et al.** Optimal regulation of blood glucose level in Type I diabetes using insulin and glucagon. *PLoS One.* 2019; 14: e0213665.

65. **Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, et al.** Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes*. 2017; 66: 241-55.
66. **Morigny P, Houssier M, Mouisel E, et al.** Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie*. 2016; 125: 259-66.
67. **Tran TTT, Pease A, Wood AJ, et al.** Review of Evidence for Adult Diabetic Ketoacidosis Management Protocols. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017; 8: 106.
68. **Cryer PE.** Hypoglycemia in type 1 diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010; 39: 641-54.
69. **Chawla A, Chawla R and Jaggi S.** Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab*. 2016; 20: 546-51.
70. **Orasanu G and Plutzky J.** The pathologic continuum of diabetic vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53: S35-42.
71. **Nyengaard JR, Ido Y, Kilo C, et al.** Interactions between hyperglycemia and hypoxia: implications for diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2004; 53: 2931-8.
72. **Gardiner TA, Archer DB, Curtis TM, et al.** Arteriolar involvement in the microvascular lesions of diabetic retinopathy: implications for pathogenesis. *Microcirculation*. 2007; 14: 25-38.
73. **Duh EJ, Sun JK and Stitt AW.** Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight*. 2017; 2.
74. **Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP and Kanaka-Gantenbein C.** Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. *Diabetes Metab Res Rev*. 2017; 33.
75. **Said S and Hernandez GT.** The link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *J Nephropathol*. 2014; 3: 99-104.
76. **Schreiber AK, Nones CF, Reis RC, et al.** Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World J Diabetes*. 2015; 6: 432-44.
77. **Noor S, Zubair M and Ahmad J.** Diabetic foot ulcer--A review on pathophysiology, classification and microbial etiology. *Diabetes Metab Syndr*. 2015; 9: 192-9.
78. **Einarson TR, Acs A, Ludwig C, et al.** Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017. *Cardiovasc Diabetol*. 2018; 17: 83.
79. **Chen R, Ovbiagele B and Feng W.** Diabetes and Stroke: Epidemiology, Pathophysiology, Pharmaceuticals and Outcomes. *Am J Med Sci*. 2016; 351: 380-6.
80. **Vanstone M, Rewegan A, Brundisini F, et al.** Patient Perspectives on Quality of Life With Uncontrolled Type 1 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Qualitative Meta-synthesis. *Ont Health Technol Assess Ser*. 2015; 15: 1-29.
81. **Vantyghem MC and Press M.** Management strategies for brittle diabetes. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2006; 67: 287-96.
82. **Kent LA, Gill GV and Williams G.** Mortality and outcome of patients with brittle diabetes and recurrent ketoacidosis. *Lancet*. 1994; 344: 778-81.
83. **Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, et al.** Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery*. 1967; 61: 827-37.
84. **Squifflet JP, Gruessner RW and Sutherland DE.** The history of pancreas transplantation: past, present and future. *Acta Chir Belg*. 2008; 108: 367-78.
85. **Casanova D and en nombre de Grupo Espanol de Trasplante de P.** Pancreas transplantation: 50 years of experience. *Cir Esp*. 2017; 95: 254-60.
86. **Hampson FA, Freeman SJ, Ertner J, et al.** Pancreatic transplantation: surgical technique, normal radiological appearances and complications. *Insights Imaging*. 2010; 1: 339-47.

87. **van Der Hoeven JA, Ter Horst GJ, Molema G, et al.** Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat. *Ann Surg.* 2000; 232: 804-13.
88. **Dayoub JC, Cortese F, Anzic A, et al.** The effects of donor age on organ transplants: A review and implications for aging research. *Exp Gerontol.* 2018; 110: 230-40.
89. **Jiang AT, Bhsc, Rowe N, et al.** Simultaneous pancreas-kidney transplantation: The role in the treatment of type 1 diabetes and end-stage renal disease. *Can Urol Assoc J.* 2014; 8: 135-8.
90. **Niederhaus SV, Kaufman DB and Odorico JS.** Induction therapy in pancreas transplantation. *Transpl Int.* 2013; 26: 704-14.
91. **Gruessner AC and Gruessner RW.** Long-term outcome after pancreas transplantation: a registry analysis. *Curr Opin Organ Transplant.* 2016; 21: 377-85.
92. **Jenssen T, Hartmann A and Birkeland KI.** Long-term diabetes complications after pancreas transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2017; 22: 382-8.
93. **Humar A, Ramcharan T, Kandaswamy R, et al.** Technical failures after pancreas transplants: why grafts fail and the risk factors--a multivariate analysis. *Transplantation.* 2004; 78: 1188-92.
94. **Ballinger WF and Lacy PE.** Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery.* 1972; 72: 175-86.
95. **Najarian JS, Sutherland DE, Matas AJ, et al.** Human islet transplantation: a preliminary report. *Transplant Proc.* 1977; 9: 233-6.
96. **Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, et al.** Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. *Diabetes.* 1990; 39: 515-8.
97. **Shapiro AM, Pokrywczynska M and Ricordi C.** Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol.* 2017; 13: 268-77.
98. **Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al.** Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000; 343: 230-8.
99. **Ryan EA, Paty BW, Senior PA, et al.** Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes.* 2005; 54: 2060-9.
100. **Hering BJ, Clarke WR, Bridges ND, et al.** Phase 3 Trial of Transplantation of Human Islets in Type 1 Diabetes Complicated by Severe Hypoglycemia. *Diabetes Care.* 2016; 39: 1230-40.
101. **Lakey JR, Warnock GL, Rajotte RV, et al.** Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation.* 1996; 61: 1047-53.
102. **Brandhorst H, Brandhorst D, Hering BJ, et al.** Body mass index of pancreatic donors: a decisive factor for human islet isolation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1995; 103 Suppl 2: 23-6.
103. **Rickels MR and Robertson RP.** Pancreatic Islet Transplantation in Humans: Recent Progress and Future Directions. *Endocr Rev.* 2019; 40: 631-68.
104. **Berney T, Boffa C, Augustine T, et al.** Utilization of organs from donors after circulatory death for vascularized pancreas and islet of Langerhans transplantation: recommendations from an expert group. *Transpl Int.* 2016; 29: 798-806.
105. **Othonos N and Choudhary P.** Who Should Be Considered for Islet Transplantation Alone? *Curr Diab Rep.* 2017; 17: 23.
106. **Anazawa T, Okajima H, Masui T, et al.** Current state and future evolution of pancreatic islet transplantation. *Ann Gastroenterol Surg.* 2019; 3: 34-42.

107. **Pepper AR, Gala-Lopez B, Ziff O, et al.** Revascularization of transplanted pancreatic islets and role of the transplantation site. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 352315.
108. **Rosenberg L, Wang R, Paraskevas S, et al.** Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery.* 1999; 126: 393-8.
109. **Van Belle T and von Herrath M.** Immunosuppression in islet transplantation. *J Clin Invest.* 2008; 118: 1625-8.
110. **Filler G, Neuschulz I, Vollmer I, et al.** Tacrolimus reversibly reduces insulin secretion in paediatric renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15: 867-71.
111. **Auer VJ, Janas E, Ninichuk V, et al.** Extracellular factors and immunosuppressive drugs influencing insulin secretion of murine islets. *Clin Exp Immunol.* 2012; 170: 238-47.
112. **Geer EB, Islam J and Buettner C.** Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014; 43: 75-102.
113. **Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, et al.** Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care.* 2012; 35: 1436-45.
114. **Ryan EA, Shandro T, Green K, et al.** Assessment of the severity of hypoglycemia and glycemic lability in type 1 diabetic subjects undergoing islet transplantation. *Diabetes.* 2004; 53: 955-62.
115. **Merani S and Shapiro AM.** Current status of pancreatic islet transplantation. *Clin Sci (Lond).* 2006; 110: 611-25.
116. **Bucher P, Mathe Z, Bosco D, et al.** Morbidity associated with intraportal islet transplantation. *Transplant Proc.* 2004; 36: 1119-20.
117. **Kawahara T, Kin T, Kashkoush S, et al.** Portal vein thrombosis is a potentially preventable complication in clinical islet transplantation. *Am J Transplant.* 2011; 11: 2700-7.
118. **O'Gorman D, Kin T, Pawlick R, et al.** Clinical islet isolation outcomes with a highly purified neutral protease for pancreas dissociation. *Islets.* 2013; 5: 111-5.
119. **Wang Y, Danielson KK, Ropski A, et al.** Systematic analysis of donor and isolation factor's impact on human islet yield and size distribution. *Cell Transplant.* 2013; 22: 2323-33.
120. **Lakey JR, Rajotte RV, Warnock GL, et al.** Human pancreas preservation prior to islet isolation. Cold ischemic tolerance. *Transplantation.* 1995; 59: 689-94.
121. **Omori K, Kobayashi E, Komatsu H, et al.** Involvement of a proapoptotic gene (BBC3) in islet injury mediated by cold preservation and rewarming. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016; 310: E1016-26.
122. **Kin T, Senior P, O'Gorman D, et al.** Risk factors for islet loss during culture prior to transplantation. *Transpl Int.* 2008; 21: 1029-35.
123. **Yeh CC, Wang LJ, McGarrigle JJ, et al.** Effect of Manufacturing Procedures on Human Islet Isolation From Donor Pancreata Standardized by the North American Islet Donor Score. *Cell Transplant.* 2017; 26: 33-44.
124. **Nilsson B, Ekdahl KN and Korsgren O.** Control of instant blood-mediated inflammatory reaction to improve islets of Langerhans engraftment. *Curr Opin Organ Transplant.* 2011; 16: 620-6.
125. **Delaune V, Berney T, Lacotte S, et al.** Intraportal islet transplantation: the impact of the liver microenvironment. *Transpl Int.* 2017; 30: 227-38.

126. **Pouliquen E, Baltzinger P, Lemle A, et al.** Anti-Donor HLA Antibody Response After Pancreatic Islet Grafting: Characteristics, Risk Factors, and Impact on Graft Function. *Am J Transplant.* 2017; 17: 462-73.
127. **Paradis S, Charles AL, Meyer A, et al.** Chronology of mitochondrial and cellular events during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016; 310: C968-82.
128. **Fuhrman GJ and Fuhrman FA.** Oxygen consumption of animals and tissues as a function of temperature. *J Gen Physiol.* 1959; 42: 715-22.
129. **Privalov PL.** Cold denaturation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1990; 25: 281-305.
130. **Garcia-Gil FA, Albendea CD, Lopez-Pingarron L, et al.** Altered cellular membrane fluidity levels and lipid peroxidation during experimental pancreas transplantation. *J Bioenerg Biomembr.* 2012; 44: 571-7.
131. **Aloia RC.** The role of membrane fatty acids in mammalian hibernation. *Fed Proc.* 1980; 39: 2974-9.
132. **Heerlein K, Schulze A, Hotz L, et al.** Hypoxia decreases cellular ATP demand and inhibits mitochondrial respiration of a549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005; 32: 44-51.
133. **Rodrigues AF, Roecker R, Junges GM, et al.** Hypoxanthine induces oxidative stress in kidney of rats: protective effect of vitamins E plus C and allopurinol. *Cell Biochem Funct.* 2014; 32: 387-94.
134. **Nakamoto RK, Baylis Scanlon JA and Al-Shawi MK.** The rotary mechanism of the ATP synthase. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 476: 43-50.
135. **Farthing DE, Farthing CA and Xi L.** Inosine and hypoxanthine as novel biomarkers for cardiac ischemia: from bench to point-of-care. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015; 240: 821-31.
136. **El Banani H, Bernard M, Baetz D, et al.** Changes in intracellular sodium and pH during ischaemia-reperfusion are attenuated by trimetazidine. Comparison between low- and zero-flow ischaemia. *Cardiovasc Res.* 2000; 47: 688-96.
137. **Smith GL, Donoso P, Bauer CJ, et al.** Relationship between intracellular pH and metabolite concentrations during metabolic inhibition in isolated ferret heart. *J Physiol.* 1993; 472: 11-22.
138. **Berendsen TA, Izamis ML, Xu H, et al.** Hepatocyte viability and adenosine triphosphate content decrease linearly over time during conventional cold storage of rat liver grafts. *Transplant Proc.* 2011; 43: 1484-8.
139. **Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, et al.** Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. *Transfus Med Hemother.* 2011; 38: 125-42.
140. **Allen DG, Cairns SP, Turvey SE, et al.** Intracellular calcium and myocardial function during ischemia. *Adv Exp Med Biol.* 1993; 346: 19-29.
141. **Marban E, Kitakaze M, Kusuoka H, et al.** Intracellular free calcium concentration measured with <sup>19</sup>F NMR spectroscopy in intact ferret hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 6005-9.
142. **Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al.** Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012; 298: 229-317.
143. **Neuhof C and Neuhof H.** Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World J Cardiol.* 2014; 6: 638-52.
144. **Phillis JW and O'Regan MH.** The role of phospholipases, cyclooxygenases, and lipoxygenases in cerebral ischemic/traumatic injuries. *Crit Rev Neurobiol.* 2003; 15: 61-90.

145. **McNally JS, Saxena A, Cai H, et al.** Regulation of xanthine oxidoreductase protein expression by hydrogen peroxide and calcium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1623-8.
146. **Pike MM, Luo CS, Clark MD, et al.** NMR measurements of Na<sup>+</sup> and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchange. *Am J Physiol.* 1993; 265: H2017-26.
147. **Takeuchi A, Tatsumi S, Sarai N, et al.** Ionic mechanisms of cardiac cell swelling induced by blocking Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump as revealed by experiments and simulation. *J Gen Physiol.* 2006; 128: 495-507.
148. **Ray PD, Huang BW and Tsuji Y.** Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012; 24: 981-90.
149. **Vallelian F, Pimenova T, Pereira CP, et al.** The reaction of hydrogen peroxide with hemoglobin induces extensive alpha-globin crosslinking and impairs the interaction of hemoglobin with endogenous scavenger pathways. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45: 1150-8.
150. **Maes M, Galecki P, Chang YS, et al.** A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011; 35: 676-92.
151. **Sullivan LB and Chandel NS.** Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.* 2014; 2: 17.
152. **Lesnefsky EJ, Tandler B, Ye J, et al.** Myocardial ischemia decreases oxidative phosphorylation through cytochrome oxidase in subsarcolemmal mitochondria. *Am J Physiol.* 1997; 273: H1544-54.
153. **Aldakkak M, Stowe DF, Chen Q, et al.** Inhibited mitochondrial respiration by amobarbital during cardiac ischaemia improves redox state and reduces matrix Ca<sup>2+</sup> overload and ROS release. *Cardiovasc Res.* 2008; 77: 406-15.
154. **Solaini G, Baracca A, Lenaz G, et al.** Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1797: 1171-7.
155. **Gorenkova N, Robinson E, Grieve DJ, et al.** Conformational change of mitochondrial complex I increases ROS sensitivity during ischemia. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 19: 1459-68.
156. **Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N, et al.** Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB J.* 2003; 17: 714-6.
157. **Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, et al.** Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29: 2571-83.
158. **Younus H.** Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim).* 2018; 12: 88-93.
159. **Mytilineou C, Kramer BC and Yabut JA.** Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism Relat Disord.* 2002; 8: 385-7.
160. **Alva N, Palomeque J and Carbonell T.** Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and rewarming: can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia? *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013: 957054.
161. **Calvani M, Comito G, Giannoni E, et al.** Time-dependent stabilization of hypoxia inducible factor-1alpha by different intracellular sources of reactive oxygen species. *PLoS One.* 2012; 7: e38388.

162. **Chua YL, Dufour E, Dassa EP, et al.** Stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha protein in hypoxia occurs independently of mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem.* 2010; 285: 31277-84.
163. **Majmundar AJ, Wong WJ and Simon MC.** Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell.* 2010; 40: 294-309.
164. **Dengler VL, Galbraith M and Espinosa JM.** Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014; 49: 1-15.
165. **Del Rey MJ, Valin A, Usategui A, et al.** Hif-1alpha Knockdown Reduces Glycolytic Metabolism and Induces Cell Death of Human Synovial Fibroblasts Under Normoxic Conditions. *Sci Rep.* 2017; 7: 3644.
166. **Loboda A, Jozkowicz A and Dulak J.** HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Mol Cells.* 2010; 29: 435-42.
167. **Stokes RA, Cheng K, Deters N, et al.** Hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) potentiates beta-cell survival after islet transplantation of human and mouse islets. *Cell Transplant.* 2013; 22: 253-66.
168. **Akhtar MZ, Sutherland AI, Huang H, et al.** The role of hypoxia-inducible factors in organ donation and transplantation: the current perspective and future opportunities. *Am J Transplant.* 2014; 14: 1481-7.
169. **Bernhardt WM, Gottmann U, Doyon F, et al.** Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogenic kidney transplant model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 21276-81.
170. **Lunardi F, Zampieri D, Vadori M, et al.** Overexpression of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha in Primary Graft Dysfunction Developing in an Orthotopic Lung Transplantation Rat Model. *Transplant Proc.* 2017; 49: 722-5.
171. **Moritz W, Meier F, Stroka DM, et al.** Apoptosis in hypoxic human pancreatic islets correlates with HIF-1alpha expression. *FASEB J.* 2002; 16: 745-7.
172. **Langlois A, Dal S, Vivot K, et al.** Improvement of islet graft function using liraglutide is correlated with its anti-inflammatory properties. *Br J Pharmacol.* 2016; 173: 3443-53.
173. **Zhang Z, Yao L, Yang J, et al.** PI3K/Akt and HIF1 signaling pathway in hypoxiaischemia (Review). *Mol Med Rep.* 2018; 18: 3547-54.
174. **Manning BD and Toker A.** AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017; 169: 381-405.
175. **Liu G, Wang T, Wang T, et al.** Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats. *Biomed Rep.* 2013; 1: 861-7.
176. **Zdychova J and Komers R.** Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol Res.* 2005; 54: 1-16.
177. **Elsea CR, Roberts DA, Druker BJ, et al.** Inhibition of p38 MAPK suppresses inflammatory cytokine induction by etoposide, 5-fluorouracil, and doxorubicin without affecting tumoricidal activity. *PLoS One.* 2008; 3: e2355.
178. **Cai B, Chang SH, Becker EB, et al.** p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J Biol Chem.* 2006; 281: 25215-22.
179. **Sui X, Kong N, Ye L, et al.** p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett.* 2014; 344: 174-9.
180. **Nito C, Kamada H, Endo H, et al.** Role of the p38 mitogen-activated protein kinase/cytosolic phospholipase A2 signaling pathway in blood-brain barrier disruption after focal cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008; 28: 1686-96.

181. **Yang X, Liu Y, Yang XM, et al.** Cardioprotection by mild hypothermia during ischemia involves preservation of ERK activity. *Basic Res Cardiol.* 2011; 106: 421-30.
182. **Solan JL, Marquez-Rosado L and Lampe PD.** Cx43 phosphorylation mediated effects on ERK and Akt protect against ischemia reperfusion injury and alter stability of stress-inducible protein NDRG1. *J Biol Chem.* 2019.
183. **Rock KL and Kono H.** The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol.* 2008; 3: 99-126.
184. **Abrahamse SL, van Runnard Heimel P, Hartman RJ, et al.** Induction of necrosis and DNA fragmentation during hypothermic preservation of hepatocytes in UW, HTK, and Celsior solutions. *Cell Transplant.* 2003; 12: 59-68.
185. **Lin Y, Chen L, Li W, et al.** Role of high-mobility group box-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury and the effect of ethyl pyruvate. *Exp Ther Med.* 2015; 9: 1537-41.
186. **Luo C, Liu H, Wang H, et al.** Toll-Like Receptor 4 Signaling in High Mobility Group Box-1 Protein 1 Mediated the Suppression of Regulatory T-Cells. *Med Sci Monit.* 2017; 23: 300-8.
187. **Nano R, Racanicchi L, Melzi R, et al.** Human pancreatic islet preparations release HMGB1: (ir)relevance for graft engraftment. *Cell Transplant.* 2013; 22: 2175-86.
188. **Pavlosky A, Lau A, Su Y, et al.** RIPK3-mediated necroptosis regulates cardiac allograft rejection. *Am J Transplant.* 2014; 14: 1778-90.
189. **Zhao G, Fu C, Wang L, et al.** Down-regulation of nuclear HMGB1 reduces ischemia-induced HMGB1 translocation and release and protects against liver ischemia-reperfusion injury. *Sci Rep.* 2017; 7: 46272.
190. **Yu Y, Tang D and Kang R.** Oxidative stress-mediated HMGB1 biology. *Front Physiol.* 2015; 6: 93.
191. **Whelan RS, Kaplinskiy V and Kitsis RN.** Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol.* 2010; 72: 19-44.
192. **Elmore S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35: 495-516.
193. **Yin H and Zhu M.** Free radical oxidation of cardiolipin: chemical mechanisms, detection and implication in apoptosis, mitochondrial dysfunction and human diseases. *Free Radic Res.* 2012; 46: 959-74.
194. **Metukuri MR, Beer-Stolz D, Namas RA, et al.** Expression and subcellular localization of BNIP3 in hypoxic hepatocytes and liver stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 296: G499-509.
195. **Stadlbauer V, Schaffellner S, Iberer F, et al.** Occurance of apoptosis during ischemia in porcine pancreas islet cells. *Int J Artif Organs.* 2003; 26: 205-10.
196. **Broughton BR, Reutens DC and Sobey CG.** Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke.* 2009; 40: e331-9.
197. **Benjamin JS, Culpepper CB, Brown LD, et al.** Chronic anemic hypoxemia attenuates glucose-stimulated insulin secretion in fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2017; 312: R492-R500.
198. **Pae EK, Ahuja B, Kim M, et al.** Impaired glucose homeostasis after a transient intermittent hypoxic exposure in neonatal rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 441: 637-42.
199. **Rodriguez-Brotos A, Bietiger W, Peronet C, et al.** Impact of Pancreatic Rat Islet Density on Cell Survival during Hypoxia. *J Diabetes Res.* 2016; 2016: 3615286.



200. **Garcia-Contreras M, Tamayo-Garcia A, Pappan KL, et al.** Metabolomics Study of the Effects of Inflammation, Hypoxia, and High Glucose on Isolated Human Pancreatic Islets. *J Proteome Res.* 2017; 16: 2294-306.
201. **Sato Y, Inoue M, Yoshizawa T, et al.** Moderate hypoxia induces beta-cell dysfunction with HIF-1-independent gene expression changes. *PLoS One.* 2014; 9: e114868.
202. **Pae EK and Kim G.** Insulin production hampered by intermittent hypoxia via impaired zinc homeostasis. *PLoS One.* 2014; 9: e90192.
203. **Cheng K, Ho K, Stokes R, et al.** Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates beta cell function in mouse and human islets. *J Clin Invest.* 2010; 120: 2171-83.
204. **Giuliani M, Moritz W, Bodmer E, et al.** Central necrosis in isolated hypoxic human pancreatic islets: evidence for postisolation ischemia. *Cell Transplant.* 2005; 14: 67-76.
205. **Bloch K, Vennang J, Lazard D, et al.** Different susceptibility of rat pancreatic alpha and beta cells to hypoxia. *Histochem Cell Biol.* 2012; 137: 801-10.
206. **Bottino R, Balamurugan AN, Tse H, et al.** Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes.* 2004; 53: 2559-68.
207. **Lablanche S, Cottet-Rousselle C, Lamarche F, et al.** Protection of pancreatic INS-1 beta-cells from glucose- and fructose-induced cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition with cyclosporin A or metformin. *Cell Death Dis.* 2011; 2: e134.
208. **Piot C, Croisille P, Staat P, et al.** Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2008; 359: 473-81.
209. **Inserte J, Hernando V and Garcia-Dorado D.** Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2012; 96: 23-31.
210. **Collins GM, Bravo-Shugartman M and Terasaki PI.** Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet.* 1969; 2: 1219-22.
211. **Jamart J and Lambotte L.** Efficiency and limitation of Euro-Collins solution in kidney preservation. *J Surg Res.* 1983; 34: 195-204.
212. **Ontell SJ, Makowka L, Ove P, et al.** Improved hepatic function in the 24-hour preserved rat liver with UW-lactobionate solution and SRI 63-441. *Gastroenterology.* 1988; 95: 1617-24.
213. **Bejaoui M, Pantazi E, Folch-Puy E, et al.** Emerging concepts in liver graft preservation. *World J Gastroenterol.* 2015; 21: 396-407.
214. **Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, et al.** Addition of aprotinin to organ preservation solutions decreases lung reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 1998; 66: 225-30.
215. **Belzer FO, D'Alessandro AM, Hoffmann RM, et al.** The use of UW solution in clinical transplantation. A 4-year experience. *Ann Surg.* 1992; 215: 579-83; discussion 84-5.
216. **Hauet T, Han Z, Doucet C, et al.** A modified University of Wisconsin preservation solution with high-NA+ low-K+ content reduces reperfusion injury of the pig kidney graft. *Transplantation.* 2003; 76: 18-27.
217. **Giraud S, Thuillier R, Cudas R, et al.** The Optimal PEG for Kidney Preservation: A Preclinical Porcine Study. *Int J Mol Sci.* 2018; 19.
218. **De Santo LS, Amarelli C, Romano G, et al.** High-risk heart grafts: effective preservation with Celsior solution. *Heart Vessels.* 2006; 21: 89-94.
219. **Giraud S, Hauet T, Eugene M, et al.** A new preservation solution (SCOT 15) Improves the islet isolation process from pancreata of non-heart-beating donors: a Murine model. *Transplant Proc.* 2009; 41: 3293-5.

220. **Hubert T, Gmyr V, Arnalsteen L, et al.** Influence of preservation solution on human islet isolation outcome. *Transplantation*. 2007; 83: 270-6.
221. **Niclauss N, Wojtuszczyz A, Morel P, et al.** Comparative impact on islet isolation and transplant outcome of the preservation solutions Institut Georges Lopez-1, University of Wisconsin, and Celsior. *Transplantation*. 2012; 93: 703-8.
222. **Hamada E, Ebi N, Miyagi-Shiohira C, et al.** Comparison Between Modified Extracellular-Type Trehalose-Containing Kyoto Solution and University of Wisconsin Solution in 18-Hour Pancreas Preservation for Islet Transplantation. *Pancreas*. 2018; 47: e46-e7.
223. **He N, Li JH, Jia JJ, et al.** Hypothermic Machine Perfusion's Protection on Porcine Kidney Graft Uncovers Greater Akt-Erk Phosphorylation. *Transplant Proc*. 2017; 49: 1923-9.
224. **Doucet C, Milin S, Favreau F, et al.** A p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor protects against renal damage in a non-heart-beating donor model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 295: F179-91.
225. **Noguchi H, Matsumoto S, Kobayashi N, et al.** Effect of JNK inhibitor during islet isolation and transplantation. *Transplant Proc*. 2008; 40: 379-81.
226. **Noguchi H, Matsumoto S, Onaca N, et al.** Ductal injection of JNK inhibitors before pancreas preservation prevents islet apoptosis and improves islet graft function. *Hum Gene Ther*. 2009; 20: 73-85.
227. **Wei J, Chen S, Xue S, et al.** Blockade of Inflammation and Apoptosis Pathways by siRNA Prolongs Cold Preservation Time and Protects Donor Hearts in a Porcine Model. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017; 9: 428-39.
228. **Charles AL, Guilbert AS, Guillot M, et al.** Muscles Susceptibility to Ischemia-Reperfusion Injuries Depends on Fiber Type Specific Antioxidant Level. *Front Physiol*. 2017; 8: 52.
229. **Murry CE, Jennings RB and Reimer KA.** Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74: 1124-36.
230. **Moses MA, Addison PD, Neligan PC, et al.** Inducing late phase of infarct protection in skeletal muscle by remote preconditioning: efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 289: R1609-17.
231. **Kitakaze M, Hori M, Takashima S, et al.** Ischemic preconditioning increases adenosine release and 5'-nucleotidase activity during myocardial ischemia and reperfusion in dogs. Implications for myocardial salvage. *Circulation*. 1993; 87: 208-15.
232. **Sharma R, Randhawa PK, Singh N, et al.** Bradykinin in ischemic conditioning-induced tissue protection: Evidences and possible mechanisms. *Eur J Pharmacol*. 2015; 768: 58-70.
233. **Bolli R, Li QH, Tang XL, et al.** The late phase of preconditioning and its natural clinical application--gene therapy. *Heart Fail Rev*. 2007; 12: 189-99.
234. **Quarrie R, Lee DS, Steinbaugh G, et al.** Ischemic preconditioning preserves mitochondrial membrane potential and limits reactive oxygen species production. *J Surg Res*. 2012; 178: 8-17.
235. **Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, et al.** Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993; 87: 893-9.
236. **Anttila V, Haapanen H, Yannopoulos F, et al.** Review of remote ischemic preconditioning: from laboratory studies to clinical trials. *Scand Cardiovasc J*. 2016; 50: 355-61.

237. **Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, et al.** Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol.* 1999; 277: H2451-7.
238. **Donato M, Buchholz B, Rodriguez M, et al.** Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Exp Physiol.* 2013; 98: 425-34.
239. **Serejo FC, Rodrigues LF, Jr., da Silva Tavares KC, et al.** Cardioprotective properties of humoral factors released from rat hearts subject to ischemic preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007; 49: 214-20.
240. **Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, et al.** Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg.* 2007; 46: 541-7; discussion 7.
241. **Mansour Z, Boutbir J, Charles AL, et al.** Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg.* 2012; 55: 497-505 e1.
242. **Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, et al.** Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol.* 1986; 251: H1306-15.
243. **Perrelli MG, Pagliaro P and Penna C.** Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J Cardiol.* 2011; 3: 186-200.
244. **Thompson JW, Narayanan SV, Koronowski KB, et al.** Signaling pathways leading to ischemic mitochondrial neuroprotection. *J Bioenerg Biomembr.* 2015; 47: 101-10.
245. **Mastropasqua F, Girolimetti G and Shoshan M.** PGC1alpha: Friend or Foe in Cancer? *Genes (Basel).* 2018; 9.
246. **Sanchez-Ramos C, Prieto I, Tierrez A, et al.** PGC-1alpha Downregulation in Steatotic Liver Enhances Ischemia-Reperfusion Injury and Impairs Ischemic Preconditioning. *Antioxid Redox Signal.* 2017; 27: 1332-46.
247. **Wenz T, Rossi SG, Rotundo RL, et al.** Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 20405-10.
248. **Heinen NM, Putz VE, Gorgens JI, et al.** Cardioprotection by remote ischemic preconditioning exhibits a signaling pattern different from local ischemic preconditioning. *Shock.* 2011; 36: 45-53.
249. **Lindholm D, Eriksson O, Makela J, et al.** PGC-1alpha: a master gene that is hard to master. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69: 2465-8.
250. **Monick MM, Powers LS, Barrett CW, et al.** Constitutive ERK MAPK activity regulates macrophage ATP production and mitochondrial integrity. *J Immunol.* 2008; 180: 7485-96.
251. **Farooqui W, Pommergaard HC and Rasmussen A.** Remote ischemic preconditioning of transplant recipients to reduce graft ischemia and reperfusion injuries: A systematic review. *Transplant Rev (Orlando).* 2018; 32: 10-5.
252. **Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, et al.** Interaction of risk factors, comorbidities, and comedication with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacol Rev.* 2014; 66: 1142-74.
253. **Gassanov N, Nia AM, Caglayan E, et al.** Remote ischemic preconditioning and renoprotection: from myth to a novel therapeutic option? *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25: 216-24.
254. **Hu S, Dong H, Zhang H, et al.** Noninvasive limb remote ischemic preconditioning contributes neuroprotective effects via activation of adenosine A1 receptor and redox status after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2012; 1459: 81-90.

255. **Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, et al.** Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285: H1435-43.
256. **Kharbanda RK, Nielsen TT and Redington AN.** Translation of remote ischaemic preconditioning into clinical practice. *Lancet.* 2009; 374: 1557-65.
257. **Hogan AR, Doni M, Molano RD, et al.** Beneficial effects of ischemic preconditioning on pancreas cold preservation. *Cell Transplant.* 2012; 21: 1349-60.
258. **Delaune V, Lacotte S, Gex Q, et al.** Effects of remote ischaemic preconditioning on intraportal islet transplantation in a rat model. *Transpl Int.* 2019; 32: 323-33.
259. **Kay L, Daneshrad Z, Saks VA, et al.** Alteration in the control of mitochondrial respiration by outer mitochondrial membrane and creatine during heart preservation. *Cardiovasc Res.* 1997; 34: 547-56.
260. **Tanioka Y, Sutherland DE, Kuroda Y, et al.** Excellence of the two-layer method (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) in pancreas preservation before islet isolation. *Surgery.* 1997; 122: 435-41; discussion 41-2.
261. **Riess JG.** Perfluorocarbon-based oxygen delivery. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2006; 34: 567-80.
262. **Caballero-Corbalan J, Eich T, Lundgren T, et al.** No beneficial effect of two-layer storage compared with UW-storage on human islet isolation and transplantation. *Transplantation.* 2007; 84: 864-9.
263. **Papas KK, Hering BJ, Guenther L, et al.** Pancreas oxygenation is limited during preservation with the two-layer method. *Transplant Proc.* 2005; 37: 3501-4.
264. **Scott WE, 3rd, O'Brien TD, Ferrer-Fabrega J, et al.** Persufflation improves pancreas preservation when compared with the two-layer method. *Transplant Proc.* 2010; 42: 2016-9.
265. **Reddy MS, Carter N, Cunningham A, et al.** Portal Venous Oxygen Persufflation of the Donation after Cardiac Death pancreas in a rat model is superior to static cold storage and hypothermic machine perfusion. *Transpl Int.* 2014; 27: 634-9.
266. **Leemkuil M, Lier G, Engelse MA, et al.** Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion of the Human Donor Pancreas. *Transplant Direct.* 2018; 4: e388.
267. **Gomez-Cambronero J.** The Oxygen Dissociation Curve of Hemoglobin: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *J Chem Educ.* 2001; 78: 757.
268. **Rifkind JM, Mohanty JG and Nagababu E.** The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Front Physiol.* 2014; 5: 500.
269. **Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, et al.** Arenicola marina extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnol J.* 2006; 1: 333-45.
270. **Thuillier R, Dutheil D, Trieu MT, et al.** Supplementation with a new therapeutic oxygen carrier reduces chronic fibrosis and organ dysfunction in kidney static preservation. *Am J Transplant.* 2011; 11: 1845-60.
271. **Le Gall T, Polard V, Rousselot M, et al.** In vivo biodistribution and oxygenation potential of a new generation of oxygen carrier. *J Biotechnol.* 2014; 187: 1-9.
272. **Le Pape F, Cosnuau-Kemmat L, Richard G, et al.** HEMOXCell, a New Oxygen Carrier Usable as an Additive for Mesenchymal Stem Cell Culture in Platelet Lysate-Supplemented Media. *Artif Organs.* 2017; 41: 359-71.
273. **Mallet V, Dutheil D, Polard V, et al.** Dose-ranging study of the performance of the natural oxygen transporter HEMO2 Life in organ preservation. *Artif Organs.* 2014; 38: 691-701.
274. **Glorion M, Polard V, Favereau F, et al.** Prevention of ischemia-reperfusion lung injury during static cold preservation by supplementation of standard preservation

- solution with HEMO2life((R)) in pig lung transplantation model. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018; 46: 1773-80.
275. **Teh ES, Zal F, Polard V, et al.** HEMO2life as a protective additive to Celsior solution for static storage of donor hearts prior to transplantation. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017; 45: 717-22.
  276. **Kaminski J, Hannaert P, Kasil A, et al.** Efficacy of the natural oxygen transporter HEMO2 life((R)) in cold preservation in a preclinical porcine model of donation after cardiac death. *Transpl Int.* 2019.
  277. **Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, et al.** Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat.* 1990; 27: 185-95.
  278. **Contractor HH, Johnson PR, Chadwick DR, et al.** The effect of UW solution and its components on the collagenase digestion of human and porcine pancreas. *Cell Transplant.* 1995; 4: 615-9.
  279. **Cuadrado A and Nebreda AR.** Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* 2010; 429: 403-17.
  280. **Yoshinari D, Takeyoshi I, Kobayashi M, et al.** Effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor as an additive to university of wisconsin solution on reperfusion injury in liver transplantation. *Transplantation.* 2001; 72: 22-7.
  281. **Hashimoto N, Takeyoshi I, Yoshinari D, et al.** Effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor as an additive to Euro-Collins solution on reperfusion injury in canine lung transplantation1. *Transplantation.* 2002; 74: 320-6.
  282. **Welsh N, Margulis B, Borg LA, et al.** Differences in the expression of heat-shock proteins and antioxidant enzymes between human and rodent pancreatic islets: implications for the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Mol Med.* 1995; 1: 806-20.
  283. **Stiegler P, Stadlbauer V, Hackl F, et al.** Prevention of oxidative stress in porcine islet isolation. *J Artif Organs.* 2010; 13: 38-47.
  284. **Abdelli S, Abderrahmani A, Hering BJ, et al.** The c-Jun N-terminal kinase JNK participates in cytokine- and isolation stress-induced rat pancreatic islet apoptosis. *Diabetologia.* 2007; 50: 1660-9.
  285. **Pileggi A, Ribeiro MM, Hogan AR, et al.** Effects of pancreas cold ischemia on islet function and quality. *Transplant Proc.* 2009; 41: 1808-9.
  286. **Omori K, Kobayashi E, Rawson J, et al.** Mechanisms of islet damage mediated by pancreas cold ischemia/rewarming. *Cryobiology.* 2016; 73: 126-34.
  287. **Berkova Z, Saudek F, Girman P, et al.** Combining Donor Characteristics with Immunohistological Data Improves the Prediction of Islet Isolation Success. *J Diabetes Res.* 2016; 2016: 4214328.
  288. **Lyon J, Manning Fox JE, Spigelman AF, et al.** Research-Focused Isolation of Human Islets From Donors With and Without Diabetes at the Alberta Diabetes Institute IsletCore. *Endocrinology.* 2016; 157: 560-9.
  289. **Hilling DE, Bouwman E, Terpstra OT, et al.** Effects of donor-, pancreas-, and isolation-related variables on human islet isolation outcome: a systematic review. *Cell Transplant.* 2014; 23: 921-8.
  290. **Kaddis JS, Danobeitia JS, Niland JC, et al.** Multicenter analysis of novel and established variables associated with successful human islet isolation outcomes. *Am J Transplant.* 2010; 10: 646-56.
  291. **Henquin JC.** Influence of organ donor attributes and preparation characteristics on the dynamics of insulin secretion in isolated human islets. *Physiol Rep.* 2018; 6.
  292. **Muthusamy AS and Vaidya A.** Expanding the donor pool in pancreas transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2011; 16: 123-7.

293. **Hu Z, Hu S, Yang S, et al.** Remote Liver Ischemic Preconditioning Protects against Sudden Cardiac Death via an ERK/GSK-3beta-Dependent Mechanism. *PLoS One*. 2016; 11: e0165123.
294. **Marais E, Genade S, Huisamen B, et al.** Activation of p38 MAPK induced by a multi-cycle ischaemic preconditioning protocol is associated with attenuated p38 MAPK activity during sustained ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2001; 33: 769-78.
295. **Singh H, Kumar M, Singh N, et al.** Late Phases of Cardioprotection During Remote Ischemic Preconditioning and Adenosine Preconditioning Involve Activation of Neurogenic Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2019; 73: 63-9.
296. **Giricz Z, Varga ZV, Baranyai T, et al.** Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles. *J Mol Cell Cardiol*. 2014; 68: 75-8.
297. **Hiraide T, Katsura K, Muramatsu H, et al.** Adenosine receptor antagonists cancelled the ischemic tolerance phenomenon in gerbil. *Brain Res*. 2001; 910: 94-8.
298. **Ferko M, Kancirova I, Jasova M, et al.** Remote ischemic preconditioning of the heart: protective responses in functional and biophysical properties of cardiac mitochondria. *Physiol Res*. 2014; 63 Suppl 4: S469-78.
299. **Zarbock A and Kellum JA.** Remote Ischemic Preconditioning and Protection of the Kidney--A Novel Therapeutic Option. *Crit Care Med*. 2016; 44: 607-16.
300. **Brandhorst D, Brandhorst H, Mullooly N, et al.** High Seeding Density Induces Local Hypoxia and Triggers a Proinflammatory Response in Isolated Human Islets. *Cell Transplant*. 2016; 25: 1539-46.
301. **Place TL, Domann FE and Case AJ.** Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radic Biol Med*. 2017; 113: 311-22.
302. **Komatsu H, Cook C, Wang CH, et al.** Oxygen environment and islet size are the primary limiting factors of isolated pancreatic islet survival. *PLoS One*. 2017; 12: e0183780.
303. **Wenger RH, Kurtcuoglu V, Scholz CC, et al.** Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia (Auckl)*. 2015; 3: 35-43.
304. **Rodriguez-Brotos A, Bietiger W, Peronet C, et al.** Comparison of Perfluorodecalin and HEMOXCell as Oxygen Carriers for Islet Oxygenation in an In Vitro Model of Encapsulation. *Tissue Eng Part A*. 2016; 22: 1327-36.
305. **Fang Y, Zhang Q, Tan J, et al.** Intermittent hypoxia-induced rat pancreatic beta-cell apoptosis and protective effects of antioxidant intervention. *Nutr Diabetes*. 2014; 4: e131.
306. **Zhang D, Liu Y, Tang Y, et al.** Increased mitochondrial fission is critical for hypoxia-induced pancreatic beta cell death. *PLoS One*. 2018; 13: e0197266.
307. **Bottino R, Balamurugan AN, Bertera S, et al.** Preservation of human islet cell functional mass by anti-oxidative action of a novel SOD mimic compound. *Diabetes*. 2002; 51: 2561-7.
308. **Pileggi A, Molano RD, Berney T, et al.** Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes*. 2001; 50: 1983-91.
309. **Papas KK, Long RC, Jr., Constantinidis I, et al.** Effects of short-term hypoxia on a transformed cell-based bioartificial pancreatic construct. *Cell Transplant*. 2000; 9: 415-22.

310. **Papas KK, Avgoustiniatos ES, Tempelman LA, et al.** High-density culture of human islets on top of silicone rubber membranes. *Transplant Proc.* 2005; 37: 3412-4.
311. **Doenst T and Taegtmeyer H.** Ischemia-stimulated glucose uptake does not require catecholamines in rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31: 435-43.
312. **Avila J, Barbaro B, Gangemi A, et al.** Intra-ductal glutamine administration reduces oxidative injury during human pancreatic islet isolation. *Am J Transplant.* 2005; 5: 2830-7.
313. **Contreras JL, Eckstein C, Smyth CA, et al.** Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats. *Diabetes.* 2003; 52: 2935-42.
314. **Floerchinger B, Oberhuber R and Tullius SG.** Effects of brain death on organ quality and transplant outcome. *Transplant Rev (Orlando).* 2012; 26: 54-9.
315. **Watts RP, Thom O and Fraser JF.** Inflammatory signalling associated with brain dead organ donation: from brain injury to brain stem death and posttransplant ischaemia reperfusion injury. *J Transplant.* 2013; 2013: 521369.

## 9. Publications

### 9.1. Publication acceptée

Lemaire F, Sigrist S, Delpy E, Peronet C, Cherfan J, Zal F, Bouzakri K, Pinget M and Maillard E. **Beneficial effects of the novel marine oxygen carrier M101 during cold preservation of rat and human pancreas.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* (2019); doi: 10.1111/jcmm.14666

### 9.2. Publications en préparation

Lemaire F, Sigrist S, Delpy E, Peronet C, Cherfan J, Zal F, Bouzakri K, Pinget M and Maillard E. **Beneficial effect of the novel marine oxygen carrier M101 during rat and human islet culture.**

Lemaire F, Sigrist S, Delpy E, Peronet C, Cherfan J, Zal F, Bouzakri K, Pinget M and Maillard E. **Effect of a non invasive remote ischemic preconditioning during pancreas cold preservation.**



## 10. Résumés publiés

“Ischemia-reperfusion preconditioning of the pancreas for better islet isolation outcomes”. 16th international Pancreas and Islet Transplantation Association 2017 congress. The review of diabetic studies. Volume 14. No.1. 2017. Page 203. Oxford – Royaume-Uni

“Effect of a novel marine oxygen carrier for preservation of the pancreas during ischemia-reperfusion process”. 16th international Pancreas and Islet Transplantation Association 2017 congress. The review of diabetic studies. Volume 14. No.1. 2017. Page 204. Oxford – Royaume-Uni

## 11. Conférences et congrès

### 11.1. Communications orales

“SCOT15<sup>®</sup> versus Custodiol<sup>®</sup> preservation solution: impact on marginal human pancreases during cold ischemia time”. F. Lemaire, C. Peronet, K.Bouzakri, S. Sigrist, M.Pinget and E. Maillard. 9<sup>th</sup> European Pancreas and Islet Transplant Association (EPITA) Symposium & 38<sup>th</sup> AIDPIT Workshop; Igls – Autriche -2019

“Effect of a novel marine oxygen carrier for preservation of the pancreas during ischemia-reperfusion process” F. Lemaire, W. Bietiger, C. Peronet, A. Langlois, K.Bouzakri, V. Polard, S. Sigrist, F. Zal, M.Pinget and E. Maillard. Communication présentée au :

- 16<sup>th</sup> international Pancreas and Islet Transplantation Association 2017 congress; Oxford – Royaume-Uni – 2017
- 23<sup>ème</sup> journée annuelle de l'Association Est Transplant ; Nancy – France – 2017

“Ischemia-reperfusion preconditioning of the pancreas for better islet isolation outcomes”; F. Lemaire, M Ferreau, W Bietiger, C Peronet, A Langlois, C Mura, N.Jeandidier, M.Pinget, S. Sigrist and E. Maillard. Communication présentée au :

- 24<sup>ème</sup> journée annuelle de l'Association Est Transplant ; Strasbourg – France - 2018
- 16<sup>th</sup> international Pancreas and Islet Transplantation Association 2017 congress; Oxford – Royaume-Uni – 2017

### 11.2. Communications affichées

“Effect of HEMO<sub>2</sub>life<sup>®</sup>, a marine oxygen carrier, for pancreas preservation during cold ischemia”; F. Lemaire, W. Bietiger, C. Peronet, A. Langlois, K.Bouzakri, V. Polard, S. Sigrist, F. Zal, M.Pinget and E. Maillard. 8<sup>th</sup> European Pancreas and Islet Transplant Association (EPITA) Symposium & 37<sup>th</sup> AIDPIT Workshop; Igls – Autriche -2018

“Protecting pancreas by ischemia-reperfusion preconditioning for improvement of islet transplantation”; F. Lemaire, M Ferreau, W Bietiger, C Peronet, A Langlois, C Mura, N.Jeandidier, M.Pinget, S. Sigrist and E. Maillard. 7<sup>th</sup> European Pancreas and Islet Transplant Association (EPITA) Symposium & 36<sup>th</sup> AIDPIT Workshop; Igls – Autriche -2017

## 12. Annexes

Lemaire F, Sigrist S, Delpy E, Peronet C, Cherfan J, Zal F, Bouzakri K, Pinget M and Maillard E. **Beneficial effects of the novel marine oxygen carrier M101 during cold preservation of rat and human pancreas.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* (2019); doi: 10.1111/jcmm.14666

## ORIGINAL ARTICLE

# Beneficial effects of the novel marine oxygen carrier M101 during cold preservation of rat and human pancreas

Florent Lemaire<sup>1</sup> | Séverine Sigrist<sup>1</sup> | Eric Delpy<sup>2</sup> | Julien Cherfan<sup>1</sup> | Claude Peronet<sup>1</sup> | Franck Zal<sup>2</sup> | Karim Bouzakri<sup>1</sup> | Michel Pinget<sup>1</sup> | Elisa Maillard<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>UMR DIATHEC, EA 7294, Centre Européen d'Etude du Diabète, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup>HEMARINA Aéroport Centre, Biotechnopôle, Morlaix, France

## Correspondence

Elisa Maillard, Centre Européen d'Etude du Diabète, Université de Strasbourg, Boulevard René Leriche, 67200 Strasbourg, France.  
Email: e.pedracini@ceed-diabete.org

## Funding information

Société française de transplantation (SFT), Grant/Award Number: Bourse de thèse de Science

## Abstract

Ischaemia impairs organ quality during preservation in a time-dependent manner, due to a lack of oxygen supply. Its impact on pancreas and islet transplantation outcome has been demonstrated by a correlation between cold ischaemia time and poor islet isolation efficiency. Our goal in the present study was to improve pancreas and islet quality using a novel natural oxygen carrier (M101, 2 g/L), which has been proven safe and efficient in other clinical applications, including kidney transplantation, and for several pre-clinical transplantation models. When M101 was added to the preservation solution of rat pancreas during ischaemia, a decrease in oxidative stress (ROS), necrosis (HMGB1), and cellular stress pathway (p38 MAPK) activity was observed. Freshly isolated islets had improved function when M101 was injected in the pancreas. Additionally, human pancreases exposed to M101 for 3 hours had an increase in complex 1 mitochondrial activity, as well as activation of AKT activity, a cell survival marker. Insulin secretion was also up-regulated for isolated islets. In summary, these results demonstrate a positive effect of the oxygen carrier M101 on rat and human pancreas during preservation, with an overall improvement in post-isolation islet quality.

## KEYWORDS

cold ischaemia, islet isolation, islet transplantation, necrosis, oxidative stress, oxygen carrier, pancreas preservation

## 1 | INTRODUCTION

Pancreatic grafts, using whole organ or islets of Langerhans transplants, can be used to reverse brittle type 1 diabetes and replace dysfunctional insulin-secreting cells of patients. In the United States, 1002 pancreases were used in whole organ transplantation in 2017, while 2558 people remained on a waiting list.<sup>1</sup> In islet transplantation, 3-4 pancreas donors are needed to reverse type 1 diabetes for one recipient.<sup>2</sup> In 2016, 25% of potentially transplantable pancreases

were rejected because of low quality,<sup>3</sup> which greatly contributed to organ shortage. Pancreas quality depends on the cause of death, age and BMI of the donor, donor medical record and duration of cold ischaemia time.<sup>4</sup> Between pancreas harvesting and transplantation or islet isolation, a period of storage at 4°C occurs, the only step at which intervention to improve pancreas quality is possible. A longer cold ischaemia time is known to have a negative impact on islet yield<sup>5</sup> and on transplantation outcome for organs with high metabolic rates.<sup>6</sup>

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

During ischaemia, a lack of oxygen and nutrients leads to a decrease in high energy phosphate production by mitochondria.<sup>7</sup> To prevent catabolism related to ischaemia, organs are stored at 4°C. However, because ATP is required for a basal level of metabolism,<sup>8</sup> the ability of an organ to maintain acceptable levels of adenine nucleotides (ATP, ADP, AMP) during preservation directly relates to its function after transplantation.<sup>9</sup> In addition to causing a decrease in energy, the degradation of ATP/ADP/AMP into inosine and hypoxanthine/xanthine generates reactive oxygen species (ROS). This oxidative stress can then trigger inflammation through the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and through necrosis.<sup>10,11</sup> Moreover, a decrease in adenine nucleotide ratios has been reported to correlate with liver dysfunction post-transplantation.<sup>12</sup> For pancreatic tissue and islets, in particular, the ADP/ATP ratio is negatively correlated with human and porcine islet cell viability, necrosis, apoptosis and function.<sup>13,14</sup> The detrimental effects of a low energy supply are intensified at the moment of organ isolation (as in reperfusion), generating a large amount of oxidative stress, which has an irreversible effect on cells.<sup>15</sup> To preserve the pool of adenine nucleotides, one strategy employed in the last decade has focused on increasing oxygen supply, thus ensuring tissue preservation, even at low temperatures.

Various methods to improve oxygenation have been tested during pancreas preservation at low temperatures. Persufflation (gaseous oxygen perfusion) is effective for oxygenating the pancreas, resulting in a decrease in inflammation and increase in human islet metabolic markers.<sup>16</sup> However, this technique requires specific organ transport materials that are space-consuming and not cost-effective. Alternatively, an equipment-free, two-layer method (TLM) method has been thoroughly studied, but clinical trials have failed to obtain promising results in clinical settings.<sup>17,18</sup> TLM uses perfluorocarbons (PFC) as an effective oxygen delivery solution, but a major limitation relates to the fact that PFCs equilibrate quickly with the surrounding atmosphere and therefore lose oxygenation capacity.

A more efficient oxygen transporter is necessary as an alternative to PFCs. Recently, an extracellular haemoglobin called M101 (produced by HEMARINA, Morlaix) isolated from the lugworm *Arenicola marina*, has been developed under the product name of HEMO<sub>2</sub> life<sup>®</sup> as an additive to preservation solutions during hypothermic storage of grafts. M101 possesses a high affinity for oxygen and can carry up to 156 oxygen molecules, compared to the four oxygen molecules carried by human haemoglobin.<sup>19</sup> Oxygen release occurs over a gradient without any allosteric effectors, and according to the p50 of the molecule.<sup>20</sup> The p50 reflects haemoglobin affinity for oxygen, and the value corresponds to the oxygen tension at which 50% of the O<sub>2</sub>-binding sites are saturated. This is a crucial advantage of M101 over other types of haemoglobin-based oxygen carriers (HBOC). The p50 of M101 is 7 mm Hg. The capacity of the molecule to store oxygen is maintained until the pO<sub>2</sub> rises above 7 mm Hg, at which point a harsh hypoxic environment causes the passive release of oxygen, thus providing the cell with a sufficient oxygen supply. When tissues consume oxygen present in the preservation solution, the pO<sub>2</sub> decreases below the p50 of M101, releasing

oxygen and freeing up a binding site for an additional oxygen molecule. This process contributes to a cycle of continuous oxygen delivery and consumption by cells.

As an extracellular haemoglobin, M101 possesses intrinsic Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) activity, which protects against potential damages caused by haem-protein-associated ROS or ROS related to ischaemia that are released in the solution. M101 is also active from 4–37°C, which is a suitable temperature for multiple types of organ preservation. M101 is derived from a marine poikilotherm invertebrate that is not able to control its body temperature and undergoes marked seasonal and external daily temperature fluctuations. Efficacy and safety of M101 in organ preservation has been shown to improve graft function for clinical studies on kidney and face transplantation, and for pre-clinical studies on the kidney, lung and heart.<sup>21–23</sup> Additionally, its ease of use (the molecule can simply be added to the preservation solution) makes it of interest for cold organ preservation, either under static storage or with machine perfusion.<sup>24,25</sup>

The goal of the present study was to identify the impact of cold ischaemia on pancreatic islets through examination of the efficacy of M101 on pancreas cold preservation, using both rat and human models.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Antibodies

Primary antibodies against p-AKT, AKT, p-ERK1/2, ERK1/2, p-p38, p38 (anti-rabbit, 1:1000, Cell Signaling, Ozyme),  $\beta$ -actin (anti-rabbit, 1:10,000, Abcam) and HIF1- $\alpha$  (antimouse, 1:100, Novus Biologicals) were used. Anti-rabbit and antimouse HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from Sigma-Aldrich (A0545 and A9044).

### 2.2 | Human pancreas and islets

The use of human tissues in the study was approved by the French regulation body (Biomedicine agency, Authorisation number PFS12-013). For experiments on pancreatic tissue, pancreases were preserved with M101 for the last 3 hours of cold ischaemia (CI) (CI = 9  $\pm$  0 hour; age = 53  $\pm$  7.5 years; BMI = 29.7  $\pm$  7) or without M101 (CI = 9.048  $\pm$  0.29 hours; age = 71  $\pm$  4 years; BMI = 26  $\pm$  1.2). Similarly, for experiments on islets, pancreases were preserved with M101 for last the 3 hours of CI (CI = 9  $\pm$  0 hours; age = 53  $\pm$  7.5 years; BMI = 29.7  $\pm$  7) or without M101 (CI = 8.8  $\pm$  1.34 hours; age = 59.7  $\pm$  12 years; BMI = 29  $\pm$  4.1).

### 2.3 | Animals

Wistar rats (male; 250 g; 8-week-old) were purchased from Janvier. Animals were housed in standard collective cages under pathogen-free conditions, in a temperature-controlled room. They were given the SAFE-A04 diet, and food and water were available ad libitum. All experiments were performed according to the National

Institutes of Health and local ethical committee (CREMEAS) guidelines (Authorisation number: C67-482-28).

## 2.4 | Experimental design

Rats were anesthetized by intra-peritoneal injection of IMALGENE® 1000 (Sanofi), a ketamine-based product, and ROMPUN™ (Sanofi), a muscle relaxant. After laparotomy, 2 mL of preservation solution (CTL: Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) solution supplemented with 2.3 mmol/L chloride calcium, 25 mmol/L GIBCO® HEPES, 4.2 mmol/L sodium bicarbonate; Sigma-Aldrich) was injected into the pancreas via the pancreatic duct. HBSS was chosen as preservation solution since UW solution impaired the islet isolation yielding in our conditions. The pancreas was removed and placed in the preservation solution at 4°C, and cold ischaemia kinetics were then determined (samples were taken at 0, 2, 4, 6, 8, 12 or 18 hours; [n = 4-6]). The condition we call M101 corresponds to preservation solutions containing M101 (HEMO<sub>2</sub>life®, Hemarina) at 2 g/L. Metabolite extraction was performed on fresh tissue, while protein extraction and OCT slide analysis were performed on snap-frozen tissue at each time-point. Islet isolation was performed after cold ischaemia (30 minutes, 4, 6, 8, 12 or 18 hours). For the experiments with M101 perfusion, 2 mL of preservation solution with or without M101 at 2 g/L was injected into the pancreas via the pancreatic duct. Pancreases were preserved for 6 hours at 4°C in the presence of M101, before islet isolation process.

Human pancreases (n = 3) underwent 6 hours of cold ischaemia between removal from donors and arrival in our laboratory. M101 (2 g/L) was added to Belzer® solution (UW solution, Bridge to Life) and then injected into the pancreas for 3 hours. Protein extraction was performed on snap-frozen pancreatic tissue after 1 or 3 hours of M101 exposure at 4°C. Islets were isolated after 9 hours of cold ischaemia and counted after 12 hours culture post-isolation in CMRL medium (Sigma-Aldrich) at 37°C. Functionality of islets was assessed by a glucose-stimulated insulin secretion test.

## 2.5 | Preservation solution analysis

Proteins, belonging to the high-mobility group box 1 (HMGB1) family, are DNA-binding proteins that regulate transcription. A signal of necrosis<sup>26</sup> occurs when these proteins are released into the extracellular compartment as danger-associated molecular pattern molecules (DAMPs).<sup>27</sup> Levels of HMGB1 (ng/mL) and glucose (mmol/L) were quantified in preservation solution after 6 hours of pancreas cold preservation by a HMGB1 ELISA kit (ST51011, IBL International) and glucose RTU assay (BioMérieux), following the manufacturer instructions.

## 2.6 | Protein extraction

The total protein content of the frozen pancreatic tissue was extracted using lysis buffer (20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 150 mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100; Sigma-Aldrich) with

HALT™ protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific) and preserved at -80°C. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay (BCA; Thermo Fisher Scientific).

## 2.7 | Protein analysis

Protein extracts were analysed with the following kits according to manufacturer instructions: mitochondrial complex 1, p38α activity (pT180/Y182) and AKT activity (AKT1/2/3 (pS473) + AKT1 total) were quantified with ELISA kits (Abcam). For mitochondrial complex 1, results were expressed in OD (optical density)/min; for p38α activity (pT180/Y182), results were expressed as the ratio of phosphorylated p38α over total p38α for pancreatic tissue; for AKT activity, results were expressed as the ratio of phosphorylated AKT1/2/3 over total AKT1, and as fold-increase or fold-decrease in relation to the control. Active caspase-3 was quantified by human active caspase-3 ELISA (R&D Systems), and results were expressed as fold-increase or fold-decrease in relation to the control. HIF1-α expression was measured by human HIF1-α ELISA (Active Motif), and results were expressed as fold-decrease in relation to the control.

## 2.8 | Western blot

Equal protein amounts from each sample were mixed with sample buffer (Bio-Rad) and β-mercaptoethanol (1:100 dilution, Sigma-Aldrich). Samples were heated at 95°C for 5 minutes, and loaded and separated by electrophoresis on polyacrylamide gel (Criterion XT 4%-12% Bis-Tris, Bio-Rad). Semi-dry transfer was used for protein transfer on nitrocellulose membranes (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad). Membranes were blocked for 1 hour at 37°C in TBS-T 5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and were probed with primary antibodies overnight at 4°C. Blots were revealed by SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) and recorded with a Chemidoc® instrument (Bio-Rad). Densitometry analysis was performed with Bio-Rad software, and results were expressed relative to β-actin.

## 2.9 | Metabolite extraction

The total metabolite content of fresh pancreatic tissue was extracted using perchloric acid (PCA 2 mol/L; Thermo Fisher Scientific) and potassium hydroxide (2 mol/L KOH) according to manufacturer protocol and was preserved at -80°C. The metabolite content was normalized according to the weight (mg) of pancreatic tissue used in the extraction (metabolites/μg protein).

ATP, X/H and lactate amount were quantified by ATP assay kit (ab83355, Abcam), xanthine/hypoxanthine assay kit (ab155900, Abcam) and L-lactate assay kit (ab65331, Abcam), respectively, using the metabolite extract, and following manufacturer instructions. Results were expressed in metabolites/μg proteins or rationalized with the t0h values corresponding to the time point 0h.

## 2.10 | Histological studies

Pancreases were either fixed and frozen in OCT, or fixed in paraformaldehyde. Sections were immunostained with antibodies against HIF1- $\alpha$ , and slides were then mounted with a media containing 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of 2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamide (DAPI; FluorSave Reagent, Merck Millipore) and observed using a Nikon Eclipse 50i microscope and Nis-Elements-BR software. HIF staining was quantified on five sections of each pancreas using Nis-Elements-Br software. Results are expressed as intensity of staining relative to the total surface area.

For ROS staining, pancreases were sectioned using a cryostat, distributed onto glass slides and preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Total ROS level was assessed by dihydroethidium (DHE) staining for 30 minutes. Fluorescence was quantified using Nis-Elements-Br software, and results were expressed as a ratio with respect to the control.

## 2.11 | Islet isolation, functionality, counting and viability

Pancreatic islets were isolated using standard collagenase (Sigma-Aldrich) digestion and Ficoll (Eurobio, Les Ulis, France) purification. Rat islets were cultured in Medium 199 (Thermo Fisher Scientific), while human islets were cultured in CMRL media (Sigma-Aldrich). Both media were supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (Sigma-Aldrich) and 1% Amphotericin B/ Penicillin/ Streptomycin (Gibco, Life Technologies). A subset of freshly isolated islets from each experimental condition were washed extensively and incubated in 10% BSF-complemented Krebs-Ringer bicarbonate medium for 1 hour at  $37^{\circ}\text{C}$  with 2.8 mmol/L glucose under basal conditions and 16.7 mmol/L glucose under stimulatory conditions. Supernatants were frozen, and insulin measurements were performed using a rat or human insulin ELISA kit (Merckodia). Supernatant insulin content was expressed in  $\mu\text{g}/\text{L}$  per 10 islets, and the stimulation index (SI) was defined as the ratio of insulin secreted under stimulated conditions over the mean that secreted under basal conditions. Islets were counted using islet equivalent measurements

(IEQ), using the consensus reported by Ricordi<sup>28</sup> that one IEQ is equal to a pancreatic islet with a diameter of 150  $\mu\text{m}$ .

## 2.12 | Statistical analysis

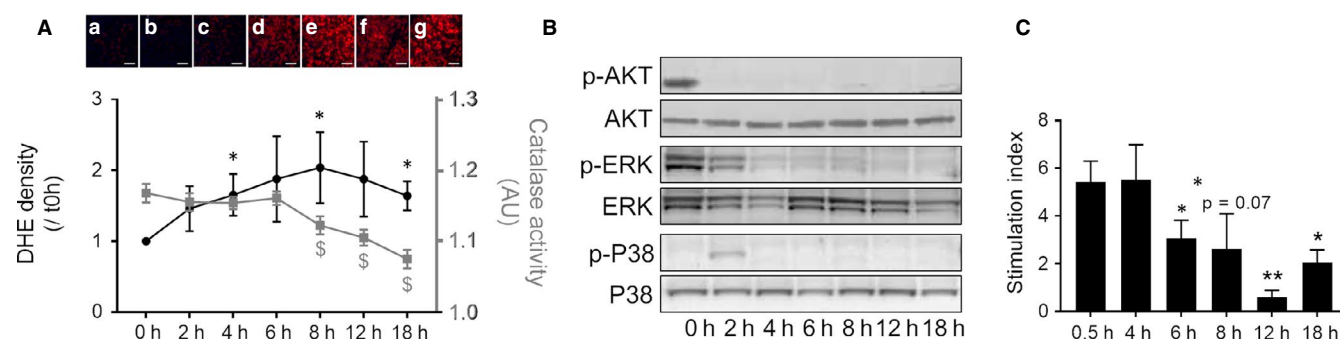
Statistical analyses were performed using Statistica software (StatSoft, Maisons-Alfort). Results were analysed by a Kruskal-Wallis and Wilcoxon/Mann-Whitney test. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, or as scattered plots showing the median.

## 3 | RESULTS

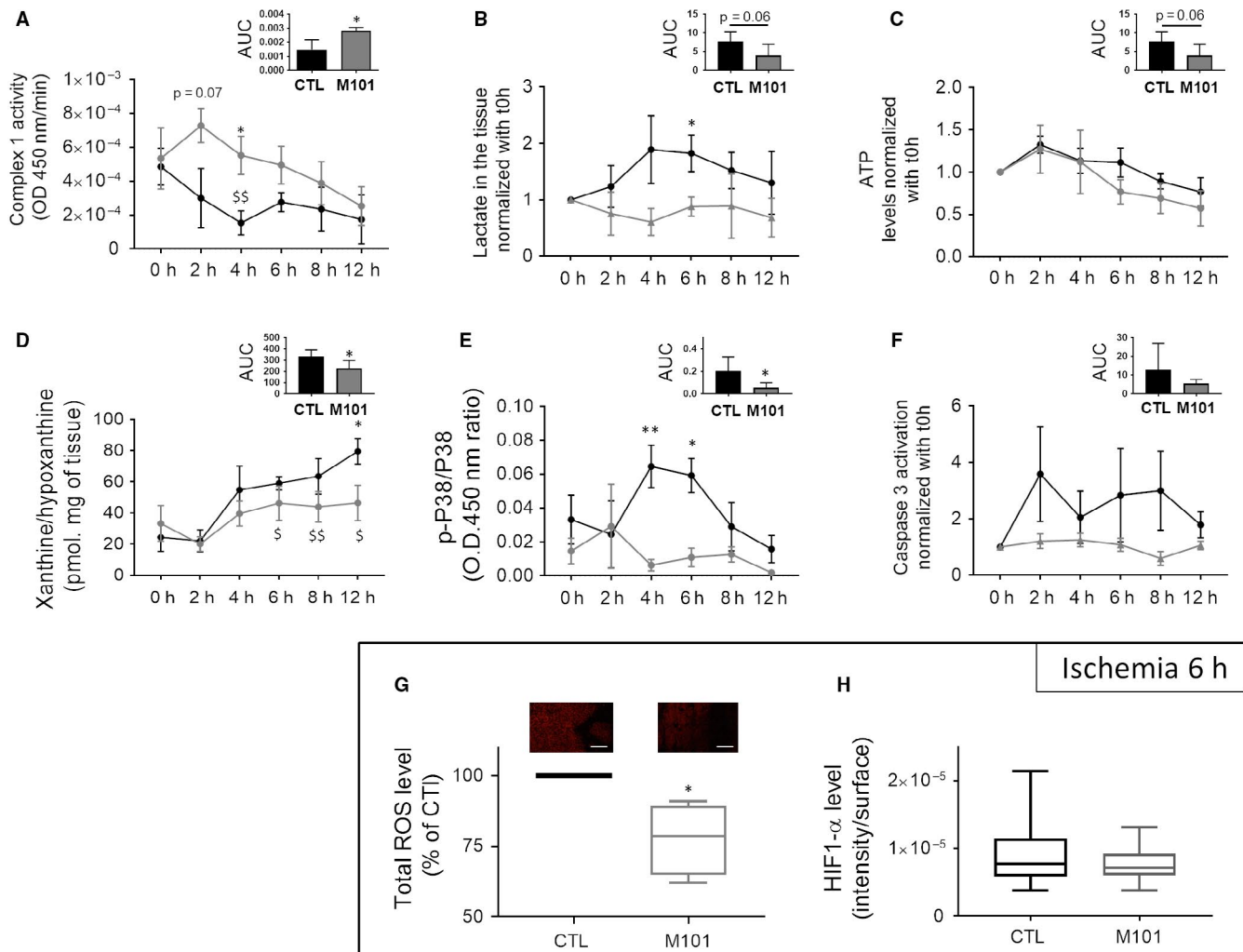
### 3.1 | Cold ischaemia kinetics in pancreatic tissue

#### 3.1.1 | Rat pancreatic tissue

Various markers of pancreas metabolism related to respiration, stress or defence were studied. The modulation of each marker was time-dependent, highlighting the phases of ischaemic effects on tissue. The level of total ROS increased with time of cold ischaemia ( $P = .0286$ ), while catalase activity was maintained at constant levels until after 6 hours of ischaemia, before a decrease in activity from 8 hours ( $P = .041$ ) to 18 hours ( $P = .002$ ; Figure 1A). Ischaemia induced a rapid inhibition of AKT phosphorylation after 2 hours (Figure 1B). Similarly, ERK phosphorylation was decreased with time of ischaemia (Figure 1B). A transient increase in p38 phosphorylation (Figure 1B and Figure 2E) was observed after 2-4 hours of ischaemia, before a loss of phosphorylation at the longer time-points (8 hours Figure 2E). Mitochondrial complex 1 activity was decreased after 2 hours of ischaemia (Figure 2A,  $P = .029$ ). Levels of lactate in the pancreas increased for the first 4 hours and then decreased slowly at longer times of ischaemia (Figure 2B). Preservation of the pancreas at  $4^{\circ}\text{C}$  resulted in stabilization of ATP concentrations during short ischaemia (0-6 hours) and a decrease for longer ischaemia (Figure 2C,  $P = .041$ ). The level of xanthine/hypoxanthine, a degradation product of ATP, was increased during long ischaemia times (8 hours ( $P = .0152$ ), 12 hours ( $P = .004$ ) or 18 hours ( $P = .002$ )) in



**FIGURE 1** Impact of cold ischaemia kinetics on Rat pancreatic tissues. A, reactive oxygen species (ROS) staining of 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  sections and representative images. Red staining represents ROS levels in rat pancreatic tissue ( $n = 5$ ). Catalase activity was measured by ELISA, and results are expressed as arbitrary units ( $n = 6$ ). B, AKT, ERK and p38 activation (phosphorylated protein and total protein) were analysed by Western blot. Blots are representative of three independent experiments. C, Stimulation index of rat islets was assessed after different cold ischaemia times (30 min, 4, 6, 8, 12 or 18 h). \*\*\*  $P < .001$ ; \*\*  $P < .01$ ; \*  $P < .05$ . Results are expressed as mean  $\pm$  SEM



**FIGURE 2** Ischaemia markers in Rat pancreases modulated by the presence of M101 in the preservation solution (2 g/L). A, Mitochondrial complex 1 activity was assessed in pancreatic tissue (n = 4). B, Lactate level (normalized with t0h) (n = 4), (C) ATP and (D) xanthine/hypoxanthine (X/H) level (pmol.mg of tissue) were measured (n = 6). E, p38 activation (phosphorylated protein/total protein) was analysed by ELISA (n = 4). F, Cleaved caspase-3 levels (normalized with t0h) were assessed in pancreatic tissue (n = 6). G, reactive oxygen species (ROS) staining of 5 μmol/L sections and representative images. Red staining represents ROS levels in rat pancreatic tissue (n = 4). H, HIF1-α level (fluorescence intensity/surface ratio) was assessed by immunostaining of frozen slides of pancreatic tissue (n = 4). Significant differences are represented with \* for comparisons of CTL and M101, and with \$ for comparison between t0h and other time-points for the CTL condition. \*\*  $P < .01$ ; \*  $P < .05$ . Results are expressed as mean ± SEM

pancreatic tissue (Figure 2D). Caspase-3 activation was not modified during ischaemia (Figure 2F).

### 3.1.2 | Rat pancreatic islets

The endocrine portion of the pancreas is the most sensitive to ischaemia, and islet quality can serve as a barometer to measure irreversible impacts of ischaemia. About 4 hours of ischaemia had no impact on islet yield, but longer times (8 hours ( $P = .045$ ), 12 hours ( $P = .001$ ) or 18 hours ( $P = .0009$ ) drastically decreased the islet yield per pancreas (Figure S1). When staining with FDA/PI was performed (Figure S1), we observed a decrease in islet viability after 18 hours of ischaemia ( $P = .019$ ). (Figure 1C). A glucose-stimulated insulin secretion test (Figure 1C) demonstrated a decrease in islet functionality

(with Stimulation index representing islet response to glucose stimulation) after 6 hours of ischaemia ( $P < .05$ ) and at longer CIT ( $P = .013$  and  $P = .018$ , at 12 and 18 hours, respectively).

### 3.2 | Biomarker evolution over 12 hours of rat pancreas preservation in the presence of M101

The presence of M101 triggered the maintenance of mitochondrial complex 1 pancreas activity throughout ischaemia kinetics (Figure 2A), as compared to the control (AUC,  $P = .027$ ). Lactate levels in the presence of M101 were maintained at a lower level than the control (Figure 2B). No differences in ATP levels were observed with M101 (Figure 2C), while global levels of X/H throughout the experiment were lower in the presence of M101 (AUC,  $P = .0152$ ;



Figure 2D). M101 suppresses transient phosphorylation of p38, which is observed in the control, after 4 hours ( $P = .002$ ) and 6 hours ( $P = .008$ ) of ischaemia (Figure 2E). M101 also reduced variability of active caspase-3 levels compared to that in the control (Figure 2F).

Dihydroethidium staining showed a 25% decrease in total ROS levels in the presence of M101, as compared to a control, after 6 hours of ischaemia ( $P = .027$ ) (Figure 2G). Immunostaining revealed no differences in HIF1- $\alpha$  levels in tissue after 6 hours of ischaemia (Figure 2H).

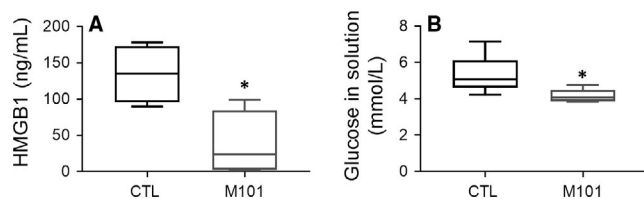
A decrease in HMGB1, a marker of necrosis/inflammation, released by pancreatic cells, was observed with M101 treatment as compared to the control after 6 hours of ischaemia (Figure 3A;  $P < .05$ ). Glucose levels within the preservation solution, reflecting glucose consumption and therefore cellular metabolism, were decreased after 6 hours compared to the control ( $P = .0159$ ; Figure 3B).

### 3.3 | M101 protects rat islets from ischaemia through pancreas preservation

Islet quality was assessed immediately after isolation, and after 6 hours of cold ischaemia in the presence of M101, combined with M101 injection via the duct. Insulin secretion in response to glucose tended to be higher as compared to control conditions ( $P = .08$ ; Figure 4F). M101 injection also reduced p38 activity in islets ( $P = .0648$ ; Figure 4E), and no impact of M101 injection was observed on stimulation index nor islet yield (Figure 4D). When M101 was present in the preservation solution only, no influence of the molecule was observed on the parameters tested (islet yielding (Figure 4A), p38 activation (Figure 4B) or insulin secretion (Figure 4C)).

### 3.4 | M101 protection of human pancreases and islets

M101 contributed to a decrease in HIF1- $\alpha$  expression in pancreas after 1 hours of exposure, but this effect was not present after 3 hours (Figure 5A). AKT phosphorylation in tissue increased after 3 hours of exposure to M101 ( $P = .08$ ; Figure 5A). Two out of three pancreases had increased complex 1 activity, and all the three had less cleaved caspase-3 in tissue, but this difference was not significant (Figure 5A). A Spearman's correlation was performed to check



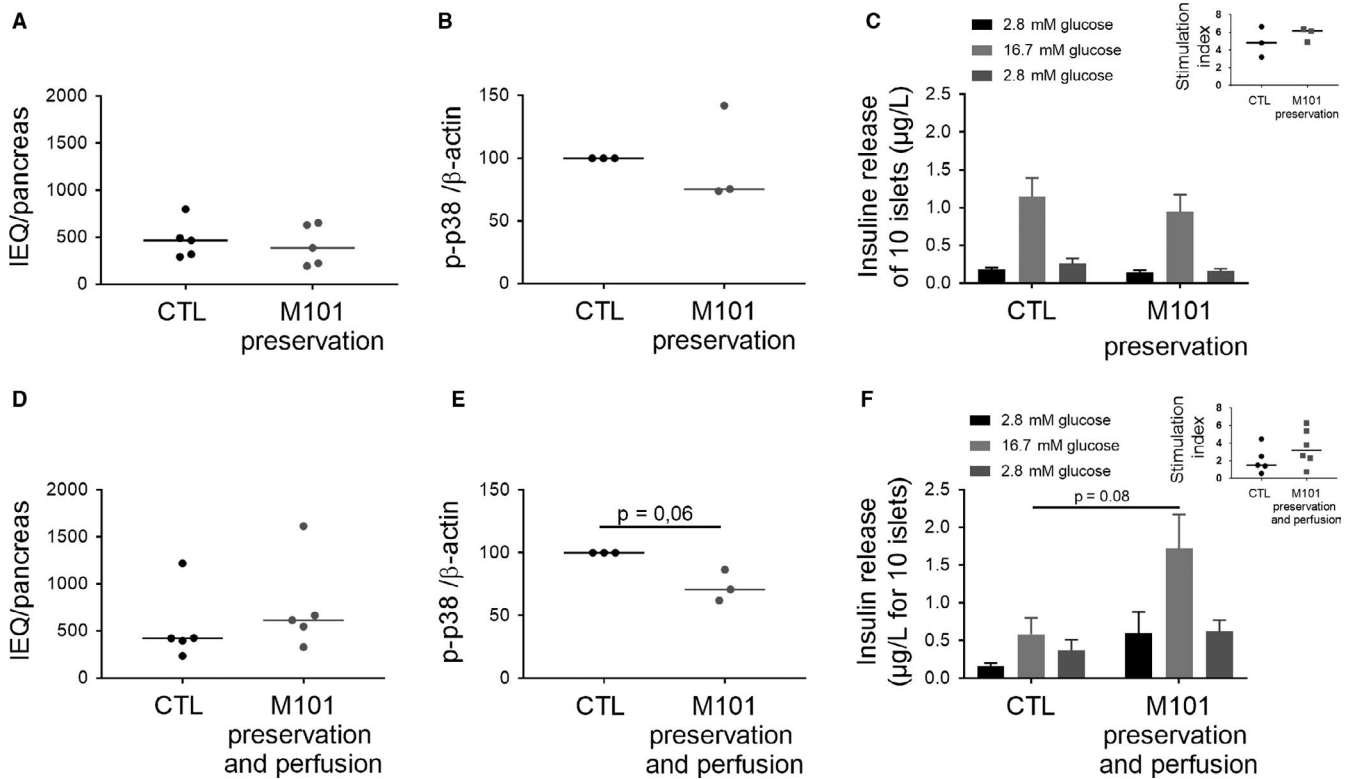
**FIGURE 3** A decrease in necrosis and increase in glucose consumption was observed in Rat pancreatic tissue preserved with 2 g/L of M101. A, HMGB1 quantity (ng/mL) released by the pancreas was measured in the preservation solution by ELISA after 6 h of CI. B, Glucose quantity (mmol/L) was assessed in the preservation solution after 6 h of CI. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of four independent experiments

the influence of age on IEQ or insulin secretion. Despite the low number of islet isolations, we observed that islet yield (Figure 5B) and function of M101-treated pancreases improved relative to the control. Islets seem to be able to secrete higher amounts of insulin both in basal and in stimulated conditions and a possible decrease in stimulation index (Figure 5D). Islets from M101-preserved pancreases also showed an overall increase in insulin content (Figure 5C).

## 4 | DISCUSSION

The goal of this study was to evaluate the impact of the oxygen carrier M101 during preservation of rat and human pancreatic tissues exposed to cold ischaemia. The use of M101 resulted in a delay in ischaemia impact on rat pancreatic tissues, maintenance of oxidative phosphorylation (marked by a decrease in lactate production and maintenance of mitochondrial activity), and a reduction in oxidative stress and necrosis during cold ischaemia. M101 also improved islet glucose-stimulated insulin secretion and had beneficial effects on human pancreatic tissues and islets.

Time spent in cold ischaemia is known to have a greater impact on both exocrine and endocrine pancreatic tissue than the process of cold ischaemia itself.<sup>29</sup> Cold ischaemia time is negatively correlated with islet yield, islet function in vitro<sup>5</sup> or post-transplantation,<sup>30</sup> revealing that preservation at 4°C is not sufficient for optimal preservation. Despite the fact that a preservation solution could not be used in our conditions, we confirmed those observations using HBSS in the present study. Although cellular ATP dependence is reduced by the cold temperature (a metabolism/catabolism reduction), cells still need a certain amount of ATP to maintain basal metabolism levels. The production of ATP is dependent primarily on oxygen availability. When an organ is disconnected from the blood supply, oxygen access is limited to diffusion against a gradient. By consuming oxygen in the preservation solution, cells decrease the oxygen concentration in the medium, which is in direct contact with tissue. This local decrease in oxygen is then counterbalanced by oxygen diffusion through the solution,<sup>31</sup> which is dependent on the amount of dissolved oxygen in the solution, as well as cellular consumption.<sup>32</sup> The oxygen concentration decreases from 20% at the air/solution interface to nearly 0% at regions close to the tissue (data not shown) with a continuous gradient created by cell consumption. Furthermore, this gradient is important for oxygen penetration in tissues, which occurs to a depth of only 5 mm, as a greater amount of oxygen in the solution allows for deeper tissue penetration. In a typical situation, almost no oxygen is in direct contact with the tissue, triggering a reduced respiration rate and glycolysis in the presence of glucose.<sup>33,34</sup> To survive, cells switch to anaerobic metabolism to produce a small amount of ATP by glycolysis, which leads to poor yields, with only two ATP molecules per glucose vs 36 ATP produced under aerobic condition.<sup>7</sup> In this study, this phenomenon was demonstrated by a mitochondrial complex 1 activity decrease, leading to low ATP levels in the pancreatic tissue. Lactate accumulation in the tissue after 4 hours of cold ischaemia shows that



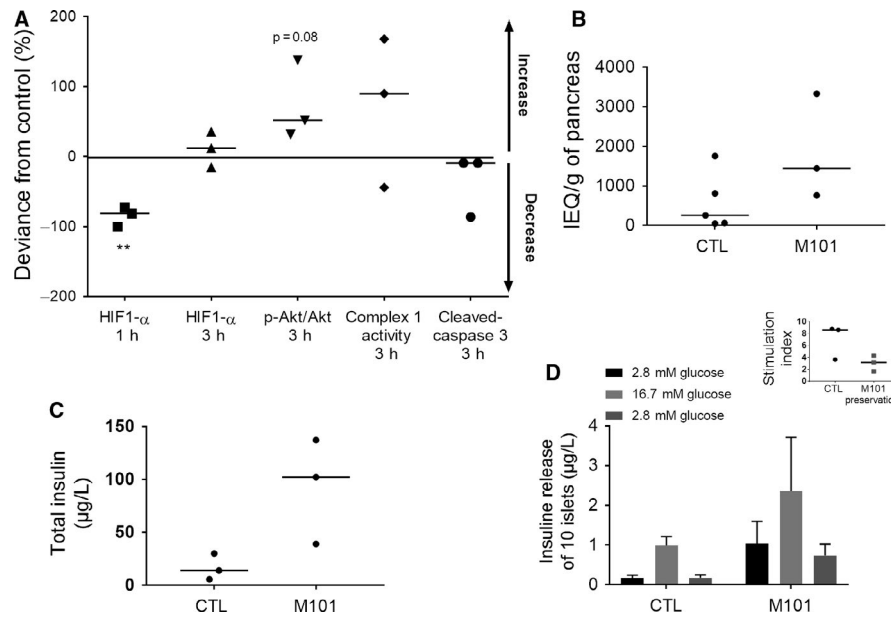
**FIGURE 4** Rat islet quality was improved with M101 use for pancreas preservation when injected in the organ. M101 was added in the preservation solution (A, B, C, D, E, F) and injected in the pancreas (D, E, F). A, D, Islets were counted using Islets Equivalents (IEQ) just after isolation (n = 5). B, E, p38 activation (phosphorylated protein/ $\beta$ -actin ratio) was analysed by Western blot in islets (n = 3). C, F, Amount of insulin secreted by islets under glucose stimulation was quantified by ELISA (n = 5). \*\*  $P < .01$ ; \*  $P < .05$ . Results are expressed as mean  $\pm$  SEM or median

glycolysis was triggered in order for the tissue to survive cold ischaemia. At 4 hours post-retrieval, oxidative stress concomitant to the activation of MAPK p38 is initiated, marking the beginning of cell stress. p38 is known to be involved in responding to cellular stressors such as hypoxia, which can trigger inflammation and eventually cell death.<sup>35</sup> Furthermore, the central role of p38 during ischaemia was shown by reduction in infarct size when p38 was specifically inhibited.<sup>36</sup> After 6 hours, a further decrease in ATP concomitant with a xanthine/hypoxanthine increase revealed that cells are unable to cope with a longer ischaemia time.<sup>37</sup> Additionally, it is known that ROS production induced by mitochondrial dysfunction leads to structural and functional cell damages.<sup>38</sup> Two distinct phases of cold ischaemia were observed up until 6 hours in this study, and our results confirm observations in several other organs, such as the liver and kidney.<sup>39-41</sup> We confirmed that beyond 6 hours, islets started to lose function. However, we cannot exclude that this effect might be due to the use of HBSS and further studies using preservation solution would strengthen the study. Nevertheless, this observation is supported by different studies performed on human islets from pancreases and preserved mainly in UW stating that it exists a correlation between the cold ischaemia time and the decrease in islet function.<sup>42-45</sup>

Addressing oxygenation and oxidative stress is the best means to improve organ quality, as has already been demonstrated in various

tissues.<sup>46-48</sup> M101 helps to maintain oxidative phosphorylation in the tissue during the first few hours of cold ischaemia, as shown by the maintenance of mitochondrial complex 1 activity. This result demonstrates the ability of cells to use M101-released oxygen present in the medium, in a gradient-dependent manner. The oxygen supply of the preservation solution is important, and maintenance of the gradient is related to oxygen release by M101. Interestingly, the maintenance of cell respiration in the presence of M101 was not correlated with an increase in ATP, despite increased glucose uptake, which has not been previously shown in the literature.<sup>49-51</sup> However, a decrease in xanthine/hypoxanthine production (a degradation product of ATP) shows that the ATP pool was less degraded<sup>37</sup> as compared to the control. Further experiments are necessary to completely understand this effect.

After 6 hours of cold ischaemia in the presence of M101, a 25% decrease in ROS production in the pancreas was found when compared to the control, which could be due to the intrinsic SOD-like activity of M101. Radical production leads to an exponential chain reaction and damages related to oxidative stress can lead to necrosis, which can be observed with specific markers such as HMGB1. HMGB1 is known to be released by oxidative stress-induced necrotic cells.<sup>27,52,53</sup> To break this chain reaction and prevent spreading of oxidative stress, ROS must be converted to harmless molecules by antioxidant enzymes or scavenger receptors. We observed this



**FIGURE 5** Human pancreas and human islet preservation are improved by the use of M101 for pancreas preservation. M101 was injected into the pancreas and in the preservation solution for 3 h. The impact of the molecule was observed both on the pancreatic tissue and islets after isolation. A, HIF1- $\alpha$  level was assessed by ELISA in pancreatic tissue after 1 h and 3 h of cold ischaemia. AKT activation (phosphorylated protein/total protein ratio), mitochondrial complex 1 activity, and cleaved caspase-3 levels were assessed in pancreatic tissue by ELISA after 3 h of cold ischaemia. B, Islet isolation was performed, and islets were counted using Islets Equivalents (IEQ) after one night of culture at 37°C. C, The total amount of insulin in islets and (D) insulin secretion of islets under glucose stimulation was quantified by ELISA. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM or median. (M101 treatment  $n = 3$ ; CTL  $n = 5$ )

effect in the presence of M101, where intrinsic SOD-like activity led to a decrease in ROS production and a subsequent decrease in necrosis (HMGB1). Thus, a cycle was initiated by M101, in which a decrease in hypoxia first occurred, followed by decrease in oxidative stress by SOD through the harvesting and recycling of ROS, resulting in an overall decrease in tissue inflammation and necrosis.

M101, when present in both the preservation and perfusion solutions, also improved islet function and led to an increase in insulin secretion in response to glucose stimulation (data not shown for an increase in GLUT2 expression) concomitantly with a decrease in p38-MAPK pathway activity. When M101 was not injected and only present in the preservation solution, no impact was observed on islet quality. Islets were not exposed directly to the molecule and thus did not benefit from oxygenation and antioxidant activity. Injection via the duct potentiated the beneficial effect of M101 and was further improved by direct administration via the vein so that the molecule was delivered into the core of the islets. This mode of administration would also be greatly beneficial for endothelial cells, which are very sensitive to the deleterious events of ischaemia.<sup>54,55</sup>

Our rat model results were confirmed on human pancreas, even though differences between rat and human tissue thickness and the difference in preservation solutions could have influenced the effect of M101.<sup>56</sup> For logistical reasons, addition of M101 to human pancreas preservation solution was performed only after 6 hours of cold ischaemia. Despite the absence of M101 during this first period of ischaemia, positive effects for M101 were observed. After 1 hours of exposure, HIF1- $\alpha$  expression in

pancreases decreased, and after 3 hours, M101 improved cell survival, leading to an increase in AKT activation and decrease in cleaved caspase-3. These results confirm the positive impact that we observed in rat tissue. Despite the transient efficacy of M101 on oxygenation in pancreatic tissue, the antioxidant effect protected tissues, resulting in an islet yield increase when compared to non-treated pancreases. Islets also had a higher insulin content, which was correlated with a greater secretion of insulin by islets under both basal and stimulated conditions. This result is of interest in cases of islet transplantations.

In summary, we observed beneficial effects of M101 on rat tissue and confirmed these results in a sample of human pancreases, thus showing that the use of M101 both in the preservation and perfusion solutions offers protection during cold ischaemia and will improve transplantation outcome.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the entire CEED team for technical help and advice. The authors are indebted to Prof. Wolf and Prof. Bachelier, the local coordination and retrieval team, and the French organ procurement agency (Agence de Biomédecine) for human pancreas procurement. The authors disclose the receipt of the following financial support for the research, authorship and/or publication of this article: this work was funded by CEED and a grant for PhD student from Société Francophone de Transplantation.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that F. Z. is the founder of HEMARINA SA and holds stock in the company, which produces the substance under investigation. E. D. is an employee of HEMARINA SA and does not hold stock.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

FL and EM designed and performed the research and wrote the paper. SS, FZ, ED, KB and MP gave critical advice on the paper writing. FL, JC and CP performed technical experiments.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Elisa Maillard  <https://orcid.org/0000-0001-7134-7499>

## REFERENCES

- Kandaswamy R, Stock PG, Gustafson SK, et al. OPTN/SRTR 2017 annual data report: pancreas. *Am J Transplant.* 2019;19(suppl 2):124-183.
- Shapiro AM. Strategies toward single-donor islets of langerhans transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2011;16:627-631.
- Kandaswamy R, Stock PG, Gustafson SK, et al. OPTN/SRTR 2016 annual data report: pancreas. *Am J Transplant.* 2018;18(suppl 1):114-171.
- Fridell JA, Rogers J, Stratta RJ. The pancreas allograft donor: current status, controversies, and challenges for the future. *Clin Transplant.* 2010;24:433-449.
- Pileggi A, Ribeiro MM, Hogan AR, et al. Effects of pancreas cold ischemia on islet function and quality. *Transplant Proc.* 2009;41:1808-1809.
- Rudolph EN, Dunn TB, Sutherland D, et al. Optimizing outcomes in pancreas transplantation: Impact of organ preservation time. *Clin Transplant.* 2017;31.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:229-317.
- Schulte PM. The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *J Exp Biol.* 2015;218:1856-1866.
- Kamiike W, Burdelski M, Steinhoff G, et al. Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation. *Transplantation.* 1988;45:138-143.
- Granger DN, Kviety PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015;6:524-551.
- Salzano S, Checconi P, Hanschmann EM, et al. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:12157-12162.
- Bruinsma BG, Avruch JH, Sridharan GV, et al. Peritransplant energy changes and their correlation to outcome after human liver transplantation. *Transplantation.* 2017;101:1637-1644.
- Sweet IR, Cook DL, DeJulio E, et al. Regulation of ATP/ADP in pancreatic islets. *Diabetes.* 2004;53:401-409.
- Goto M, Holgersson J, Kumagai-Braesch M, et al. The ADP/ATP ratio: a novel predictive assay for quality assessment of isolated pancreatic islets. *Am J Transplant.* 2006;6:2483-2487.
- Bottino R, Balamurugan AN, Tse H, et al. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes.* 2004;53:2559-2568.
- Kelly AC, Smith KE, Purvis WG, et al. Oxygen perfusion (Persufflation) of human pancreata enhances insulin secretion and attenuates islet proinflammatory signaling. *Transplantation.* 2019;103:160-167.
- Kin T, Mirbolooki M, Salehi P, et al. Islet isolation and transplantation outcomes of pancreas preserved with University of Wisconsin solution versus two-layer method using preoxygenated perfluorocarbon. *Transplantation.* 2006;82:1286-1290.
- Caballero-Corbalan J, Eich T, Lundgren T, et al. No beneficial effect of two-layer storage compared with UW-storage on human islet isolation and transplantation. *Transplantation.* 2007;84:864-869.
- Le Gall T, Polard V, Rousselot M, et al. In vivo biodistribution and oxygenation potential of a new generation of oxygen carrier. *J Biotechnol.* 2014;187:1-9.
- Mallet V, Dutheil D, Polard V, et al. Dose-ranging study of the performance of the natural oxygen transporter HEMO2 Life in organ preservation. *Artif Organs.* 2014;38:691-701.
- Thuillier R, Dutheil D, Trieu MT, et al. Supplementation with a new therapeutic oxygen carrier reduces chronic fibrosis and organ dysfunction in kidney static preservation. *Am J Transplant.* 2011;11:1845-1860.
- Teh ES, Zal F, Polard V, Menasché P, Chambers DJ. HEMO2life as a protective additive to Celsior solution for static storage of donor hearts prior to transplantation. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017;45:717-722.
- Glorion M, Polard V, Favereau F, et al. Prevention of ischemia-reperfusion lung injury during static cold preservation by supplementation of standard preservation solution with HEMO2life((R)) in pig lung transplantation model. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46:1773-1780.
- Kaminski J, Hannaert P, Kasil A, et al. Efficacy of the natural oxygen transporter HEMO2 life((R)) in cold preservation in a pre-clinical porcine model of donation after cardiac death. *Transpl Int.* 2019;32:985-996.
- Kasil A, Giraud S, Couturier P, et al. Individual and combined impact of oxygen and oxygen transporter supplementation during kidney machine preservation in a porcine preclinical kidney transplantation model. *Int J Mol Sci.* 2019;20.
- Raucci A, Palumbo R, Bianchi ME. HMGB1: a signal of necrosis. *Autoimmunity.* 2007;40:285-289.
- Tsung A, Klune JR, Zhang X, et al. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *J Exp Med.* 2007;204:2913-2923.
- Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, et al. Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat.* 1990;27:185-195.
- Elgandy H, Okitsu T, Kimura Y, et al. Augmented damage of islets by impaired exocrine acinar cells undergoing apoptosis that is possibly converted to necrosis during isolation. *Islets.* 2011;3:102-110.
- Kuhreibe WM, Ho LT, Kamireddy A, et al. Islet isolation from human pancreas with extended cold ischemia time. *Transplant Proc.* 2010;42:2027-2031.
- Buchwald P. FEM-based oxygen consumption and cell viability models for avascular pancreatic islets. *Theor Biol Med Model.* 2009;6:5.
- Place TL, Domann FE, Case AJ. Limitations of oxygen delivery to cells in culture: an underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radic Biol Med.* 2017;113:311-322.
- Chan TS, Cassim S, Raymond VA, et al. Upregulation of Krebs cycle and anaerobic glycolysis activity early after onset of liver ischemia. *PLoS ONE.* 2018;13:e0199177.

34. Nowak G, Ungerstedt J, Wernerman J, et al. Metabolic changes in the liver graft monitored continuously with microdialysis during liver transplantation in a pig model. *Liver Transpl.* 2002;8:424-432.
35. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773:1358-1375.
36. Barajas-Espinosa A, Basye A, Angelos MG, et al. Modulation of p38 kinase by DUSP4 is important in regulating cardiovascular function under oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2015;89:170-181.
37. Farthing DE, Farthing CA, Xi L. Inosine and hypoxanthine as novel biomarkers for cardiac ischemia: from bench to point-of-care. *Exp Biol Med.* 2015;240:821-831.
38. Van Erp AC, Hoeksma D, Rebolledo RA, et al. The crosstalk between ROS and autophagy in the field of transplantation medicine. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:7120962.
39. Datta N, Devaney SG, Busuttil RW, et al. Prolonged cold ischemia time results in local and remote organ dysfunction in a murine model of vascularized composite transplantation. *Am J Transplant.* 2017;17:2572-2579.
40. Ponticelli CE. The impact of cold ischemia time on renal transplant outcome. *Kidney Int.* 2015;87:272-275.
41. Liu A, Jin H, Dirsch O, et al. Release of danger signals during ischemic storage of the liver: a potential marker of organ damage? *Mediators Inflamm.* 2010;2010:436145.
42. Hilling DE, Bouwman E, Terpstra OT, et al. Effects of donor-, pancreas-, and isolation-related variables on human islet isolation outcome: a systematic review. *Cell Transplant.* 2014;23:921-928.
43. Linn T, Schmitz J, Hauck-Schmalenberger I, et al. Ischaemia is linked to inflammation and induction of angiogenesis in pancreatic islets. *Clin Exp Immunol.* 2006;144:179-187.
44. Khambalia HA, Alexander MY, Nirmalan M, et al. Links between a biomarker profile, cold ischaemic time and clinical outcome following simultaneous pancreas and kidney transplantation. *Cytokine.* 2018;105:8-16.
45. Friberg AS, Lundgren T, Malm H, et al. Transplanted functional islet mass: donor, islet preparation, and recipient factors influence early graft function in islet-after-kidney patients. *Transplantation.* 2012;93:632-638.
46. Gilbo N, Monbaliu D. Temperature and oxygenation during organ preservation: friends or foes? *Curr Opin Organ Transplant.* 2017;22:290-299.
47. Hosgood SA, Nicholson HF, Nicholson ML. Oxygenated kidney preservation techniques. *Transplantation.* 2012;93:455-459.
48. Suszynski TM, Rizzari MD, Scott WE, et al. Persufflation (gaseous oxygen perfusion) as a method of heart preservation. *J Cardiothorac Surg.* 2013;8:105.
49. Ravaioli M, Baldassare M, Vasuri F, et al. Strategies to restore adenosine triphosphate (ATP) level after more than 20 hours of cold ischemia time in human marginal kidney grafts. *Ann Transplant.* 2018;23:34-44.
50. Treckmann J, Minor T, Saad S, et al. Retrograde oxygen persufflation preservation of human livers: a pilot study. *Liver Transpl.* 2008;14:358-364.
51. Scott WE 3rd, Weegman BP, Ferrer-Fabrega J, et al. Pancreas oxygen persufflation increases ATP levels as shown by nuclear magnetic resonance. *Transplant Proc.* 2010;42:2011-2015.
52. Petrovic A, Bogojevic D, Korac A, et al. Oxidative stress-dependent contribution of HMGB1 to the interplay between apoptosis and autophagy in diabetic rat liver. *J Physiol Biochem.* 2017;73:511-521.
53. Yu Y, Tang D, Kang R. Oxidative stress-mediated HMGB1 biology. *Front Physiol.* 2015;6:93.
54. Hidalgo MA, Shah KA, Fuller BJ, et al. Cold ischemia-induced damage to vascular endothelium results in permeability alterations in transplanted lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996;112:1027-1035.
55. Huet PM, Nagaoka MR, Desbiens G, et al. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology.* 2004;39:1110-1119.
56. Avgoustiniatos ES, Hering BJ, Papas KK. The rat pancreas is not an appropriate model for testing the preservation of the human pancreas with the two-layer method. *Transplantation.* 2006;81(10):1471-1472.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**How to cite this article:** Lemaire F, Sigrist S, Delpy E, et al. Beneficial effects of the novel marine oxygen carrier M101 during cold preservation of rat and human pancreas. *J Cell Mol Med.* 2019;00:1-10. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14666>

# Amélioration de la préservation du pancréas lors de l'ischémie froide pour l'optimisation de la transplantation d'îlots pancréatiques

## Résumé

---

L'ischémie est une des problématiques majeurs de la transplantation, elle intervient au moment de la déconnexion d'un organe du système vasculaire et dure jusqu'à sa reconnexion chez le receveur. Elle provoque une diminution de la qualité des greffons et seulement un-tiers des pancréas éligibles aboutissent à une transplantation. Ce travail de thèse avait pour objectif d'améliorer la qualité des greffons en préparant les pancréas à subir l'ischémie par le préconditionnement et à améliorer leur préservation après avoir identifié les voies impliquées dans l'ischémie. Des changements métaboliques majeurs au niveau de l'organe ont été mis en évidence dépendant du temps d'ischémie, impliquant des dommages sur la partie endocrine du pancréas, les îlots. Ceci a été empêché par le préconditionnement du pancréas à l'ischémie activant les défenses antioxydantes et par l'utilisation de l'hémoglobine M101 issue de ver marin apportant de l'oxygène au cours de la préservation des pancréas de rat et humains. Ainsi, il est possible d'améliorer la qualité des greffons en agissant en amont du prélèvement et au cours de la préservation, ceci permettant une meilleure fonction.

## Summary

---

Ischemia is one of the major problems of transplantation, it occurs at the time of disconnection of an organ of the vascular system and lasts until its reconnection in the recipient. It causes a decrease in graft quality and only one-third of the eligible pancreases results in a transplant. This work aimed to improve the quality of the grafts in preparing the pancreas to undergo ischemia preconditioning and improve their preservation after identifying the pathways involved in ischemia. Major metabolic changes in the organ have been demonstrated that appeared to ischemia time dependent enhancing damages to the endocrine part of the pancreas, the islets. This was prevented by the preconditioning of the pancreas to ischemia activating the antioxidant defenses and by the use of the marine worm M101 hemoglobin providing oxygen during the preservation of rat pancreas and humans. Thus, it is possible to improve the quality of the grafts by acting upstream of the sample and during the preservation, this allowing a better function.