THESE

pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté de Médecine et Pharmacie)

(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : BioSanté N°524

Champ disciplinaire : Biologie, Médecine, Santé

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie.

Présentée par :

Sébastien GIRAUD

****

STRATEGIES DE PRESERVATION ET D'IMMUNOPROTECTION DU GREFFON DANS UN MODELE DE TRANSPLANTATION D'ÎLOTS PANCREATIQUES

****

Directeurs de Thèse : Professeur Thierry HAUET et Professeur Benoît BARROU

****

Soutenue le 10 Juin 2013

devant la Commission d'Examen

JURY

Pr. Thierry BERNEY	**Rapporteur**
Pr. Matthias BUCHLER	**Rapporteur**
Pr. Michel EUGENE	**Examinateur**
Pr. Lionel BADET	**Examinateur**
Pr. Thierry HAUET	**Directeur de Thèse**
Pr. Benoit BARROU	**Directeur de Thèse**

REMERCIEMENTS

Ce travail a débuté sous la direction du Professeur Benoit Barrou au sein du laboratoire Inserm U543 d'Immunologie Cellulaire et Tissulaire dirigé par Monsieur le Professeur Patrice Debré, puis a continué au sein du Laboratoire Inserm U1082 (ancien U927) Ischémie Reperfusion en Transplantation d'Organes, dirigé successivement par les Professeurs Gérard Mauco puis Thierry Hauet.

Je remercie ainsi très sincèrement messieurs les Professeurs Patrice Debré, Gérard Mauco et Thierry Hauet qui m'ont accueilli au sein de leur laboratoire. Je n'aurais pu arriver au terme de ce parcours sans qu'ils m'aient ouvert les portes de leur unité.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur Thierry Berney, et Monsieur le Professeur Matthias Buchler d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également très sincèrement Messieurs les Professeurs Lionel Badet et Michel Eugène d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier le Professeur Benoît Barrou pour m'avoir offert la possibilité de conduire mes études au sein de son équipe, pour la confiance et la générosité dont il a fait preuve envers moi. MERCI Benoît ! Notre rencontre m'a permis d'évoluer, d'apprendre de mes erreurs, et d'avoir un autre regard sur la face clinique de notre métier.

Je tiens également particulièrement à remercier le Professeur Thierry Hauet, pour m'avoir rapatrié en province et pour m'avoir ouvert les portes de son labo. MERCI Thierry de la confiance que tu m'as accordée, de l'opportunité que tu m'as offerte et de la place que tu me réserve au sein de ton labo.

Je remercie très sincèrement le Professeur Michel Eugène, pour sa source intarissable de connaissance ayant permis de répondre à mes nombreuses interrogations, pour tous ces conseils et pour son soutien.

Un grand merci au Docteur Véronique Thomas-Vaslin pour cette très agréable et fructueuse collaboration ainsi que pour ses précieux immuno-conseils tout au long de cette aventure.

Je joins mes chaleureux remerciements à Isabelle Rodde-Astier pour cette belle SCOTaventure.

J'exprime toute mon amitié à mes inoubliables compagnons du devoir : Elo, les inoubliables parisiens : Yaya, Nono, Mat, Thibault, Blandine, Caroline, Séverine, Antoine, Lorraine et Yann, et les fabuleux poitevins : Virginie, Nicolas, Delphine, Raphael, Solenne, Nathalie, Maxime, Christelle, Maité, Sonia, Patrick, Sandrine, Fréderic, Edouard, Vanessa, Sylvain, Nadège, William, Pierre (désolé pour les oublis…). Merci d'avoir été très présent durant ces journées de laboratoire, que vous avez su rendre très agréables.

RESUME

STRATEGIES DE PRÉSERVATION ET D'IMMUNOPROTECTION DU GREFFON DANS UN MODELE DE TRANSPLANTATION D'ÎLOTS PANCREATIQUES

Actuellement les transplanteurs sont confrontés à une pénurie de greffons, conduisant à l'élargissement des critères de choix des donneurs. Cette démographie fait place à des greffons plus sensibles aux lésions d'ischémie-reperfusion (I/R). Ces lésions conduisent à des dysfonctions de reprises de fonction des greffons, et participent à l'augmentation de l'immunogénicité du greffon et à l'emergence de rejets aigus et chroniques. Il est donc nécessaire de limiter les lésions d'I/R pour : dans un premier temps conserver l'intégrité du greffon, dans un deuxième temps, réduire l'immunogénicité du greffon et enfin contrôler le rejet de greffe tout en maintenant le receveur immunocompétent. Afin de limiter les lésions d'I/R nous avons évalué la solution de préservation SCOT de type extracellulaire contenant 30g/L de PEG 20kDa, dans un modèle murin d'isolement et de transplantation d'îlots pancréatiques. L'amélioration des conditions de conservation a permit de préserver l'intégrité des îlots et de réduire l'immunogénicité du greffon, et ce due aux propriétés immunoprotectrices des PEG 20kDa (effets obtenus pour 10 à 30g/L). Dans ce même modèle notre second objectif était d'établir un état de tolérance périphérique par déplétion transitoire des lymphocytes T en division. La déplétion des lymphocytes T alloréactifs en division a été induite au moment de l'allotransplantation des îlots, par administration transitoire d'un analogue nucleosidique inductible. Cette déplétion transitoire a permit d'aboutir à une immunotolérance dominante et persistante maintenue par la perturbation de la balance homéostasique. Cette perturbation a aboutit à l'émergence d'une population de lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+FoxP3^+$. La mise en place d'un environement immunorégulateur suite à la pertubation de la balance homéostasique ouvre de nouvelles perspectives dans l'inhibition des rejets d'allogreffes.

Mots clés : Ischémie/reperfusion, Conservation du greffon, Transplantation d'îlots pancréatiques, Polyethyleneglycol, Tolérance immunitaire.

ABSTRACT

STRATEGIES FOR GRFAT PRESERVATION AND IMMUNOPROTECTION IN A MODEL OF PANCREATIC ISLETS TRANSPLANTATION

Organ and tissue transplantation is affected by a shortage of grafts, leading to enlargement of donor criteria. Consequently, these new marginal organs are more susceptible to ischemia-reperfusion injury (IRI). IRI increases primary graft dysfunctions and contributes to increase graft immunogenicity and consequently the occurence of acute and chronic rejection. Our objectives to limit I/R damages were: firstly, the preservation of the graft integrity, secondly, the reduction of the graft immunogenicity and the control the graft rejection while maintaining an immunocompetent recipient. To limit IRI we evaluated the new SCOT preservation extracellular type solution containing PEG 20kDa 30g/L in a murine model of pancreatic islets isolation and transplantation. The improvement of conservation with SCOT permitted to maintain the islets integrity and to reduce graft immunogenicity, due to the immunoprotective properties of PEG 20kDa (effects obtained with PEG 20kDa at 10 to 30g /L). In this same model our second objective was to establish a peripheral immunological tolerance of the graft by transient depletion of dividing T cells. This depletion of alloreactive dividing T cells was induced at the time of islet allotransplantation by an administration of an inducible nucleosidic analogue during 14 days. Transient alloreactive T cells depletion induced a dominant immunotolerance marked by the emergence of a persistent regulatory T cells $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ population. Thus, regulation of homeostatic balance between effector and regulatory T cells could open an interesting way to control the immune reaction against allograft.

Keywords: Ischemia/Reperfusion, Graft conservation, Pancreatic Islets Transplantation, Polyethyleneglycol, Immune Tolerance.

ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

AIRE : autoimmune regulator

ATP: acide triphosphate

BSA : Bovine Serum Albumin

BTC-mPEG: benzotriazole carbonate methoxyPEG

CCL: Chemokine (C-C motif) ligand

CEC : circulation extracorporelle

CD : Cluster de différenciation (ex : CD4, CD8, CD62L…)

CITR: The Collaborative Islet Transplant Registry

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CO_2 : Dioxyde de carbone

CRN : circulation régionale normothermique

CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand

DAMPs : Damages Associated Molecular Patterns

DDAC : donneur décédé après arrêt cardiaque

DDS: Deceased Donor Score

DGF: Delayed graft function

DID: Diabète Insulino-dépendant

DNID: Diabète Non Insulino-dépendant

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting

FITC: Fluorescéine Isothiocyanate

FoxP3 : Forkhead Box P3

GAD: acide glutamique-décarboxylase

GCV : Ganciclovir

Glut-2 : transporteur de Glucose

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GPAGR : greffe pancréatique après greffe rénale

GPI : greffe pancréatique isolée

GSPR : greffe simultanée pancréas-rein

H2O2 : peroxyde d'hydrogène

HA: Hémagglutinine

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

HCL: Acide Cloridrique

HES: Hydroxyethyl Starch

HGPP : Hyperglycémie provoquée par voie intra-péritonéale

HMGB1: high mobility group box 1

HLA: Human Leucocytes Antigen

$HO^{\cdot}$: radical hydroxyle

HRP: Horseradish Peroxydase

HSP: heat shock proteins

IAK: Islet after kidney transplantation

IBMIR: Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1

IFN-γ: Interféron-γ

IGL-1 : Institut Georges Lopez-1

IL: Interleukine (ex : IL-2, IL-4….)

iNOS : inductible Nitric Oxide Synthase

IP : Intra-péritonéale

I/R : ischémie/reperfusion

ITA : Islet transplantation alone

IV: Intra-veineuse

IP3: Inositol-Triphosphate

kDa: kilo Dalton

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MCP-1: monocyte chemotactic protein-1 (ou CCL2)

MDSC: Myeloid-derived Suppressor Cells

MIP-2a: macrophage inflammatory protein-2 alpha (ou CXCL2)

MLIC: Mixed Islet Lymphocyte Coculture

MnSOD: manganèse superoxide dismutase

MTOR: mammalian target of rapamycine

MTT: 3,(4,5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium bromide

NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide

NF-AT: nuclear factor of activated T cell

NF-κB: nuclear factor-kappa B

NFP : Non Fonction Primaire

NK: Natural killer

NO : Nitric oxyde ou monoxyde d'azote

ONOOH : peroxinitrites

PBS : Phosphate Buffer Solution

PE : Phycoérythrine

PEG : Polyéthylèneglycol

PFC : perfluorocarbones

PIP2: phosphatidyl-inositol-diphosphate

PP: polypeptides pancréatiques

PRR: Pattern Recognition Receptors

Rad: absorbed radiation dose (1 rad = 0.01 Gy)

RAFT1: rapamycine FKBP target

RANKL: TNF-related activation-induced cytokine

RLO : radicaux libres oxygénés

ROS : espèces oxygénées réactives

RRF : Retard de reprise de fonction

SCOT : solution de conservation des organes et des tissus

SIK: greffe simultanée rein ilots (simultaneous islet-kidney transplantations)

SPA-mPEG: N-hydroxysuccinimidyl ester of mPEG propionic acid

STZ : Streptozotocine

SUIT index : Secretory Unit of Islet in transplantation

SVF: Sérum de Veau Fœtal

TCR: T Cell Receptor

TGF-β: Transforming Growth Factor-β

TLR: Toll Like receptor

TNF-α: Tumor Necrosis Factor-α

TNF-β: Tumor Necrosis Factor-β

UW: University of Wisconsin

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule -1

VIP: vasoactive intestinal polypeptide

FIGURES

Figure 1 : Les différentes étapes du processus de transplantation. 23
Figure 2 : Survie du greffon rénal selon l'âge du donneur entre 1993 et 2010 (Rapport 2011 de l'Agence de Biomédecine) [Agence-de-Biomedecine.2011]. 28
Figure 3 : Pompes membranaire et homéostasie potassique et sodique. 34
Figure 4 : Physiopathologie des lésions d'I/R. Figure issue de [Kalogeris T.2012] 37
Figure 5 : Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction (IBMIR), selon le modèle développé par [Nilsson B.2011] 39
Figure 6 : Schéma représentant les mécanismes moléculaires déclenchés au moment de la... 47
Figure 7 : Présentation directe par les leucocytes passagers. 51
Figure 8 : Voies de reconnaissance des alloantigènes par les lymphocytes T [Golshayan D.2007]. 52
Figure 9 : Schéma récapitulatif de l'immunopathologie du rejet de greffe, exemple de la greffe rénale. Figure issue de [Chapel H.2004]. 54
Figure 10 : Rôle du TGF-β dans le développement de la fibrose au sein du greffon rénal. 56
Figure 11 : anatomie du pancréas humain, figure modifié de [http://www.olivelab.org/the-pancreas-overview.html] 60
Figure 12 : Protocole de transplantation d'îlots pancréatiques chez l'homme. 71
Figure 13 : Micro-anatomie des îlots de Langerhans [Narang AS.2006]. 77
Figure 14 : Démonstration expérimentale de la vascularisation intra-îlots par administration intra-veineuse de dextran-FITC, analyse par imagerie à fluorescence *in vivo* [Narang AS.2006]. 78
Figure 15 : Marquage des molécules du CMH de classe I et II par Immunogold-sliver, sur des îlots isolés de pancréas de rat [Von Gaudecker B.1989]. 80
Figure 16 : Réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de l'allogreffe d'îlots [Narang AS.2006]. 81
Figure 17 : Principe du système HSV1-TK/GCV (Modèle de destruction conditionnelle et spécifique des Lymphocytes T en division). 105
Figure 18 : Injection de libérase via le canal cholédoque, à l'aide d'un butterfly 114
Figure 19 : Pancréas prélevé 114
Figure 20 : Séparation des îlots de Langerhans sur gradient de Ficoll à 4 couches 115
Figure 21 : Ilots de Langerhans purifiés après Hand-Picking (grossissement x40) 116

Figure 22: Greffon d'îlots placé dans un tube siliconé, puis introduit sous la capsule rénale de l'animal receveur. 117
Figure 23 : Modèle expérimental de greffe d'îlots pancréatiques allogéniques chez une souris receveuse diabétique 119
Figure 24 : Transfert de tolérance à une allogreffe d'îlots pancréatiques illustré dans la combinaison C57BL/6 / FVB L40. 122
Figure 25 : Culture prolongée des îlots durant 12 jours (Grossissement X100). 128
Figure 26 : Evaluation des conditions de préservation de la fonction insulinosécrétrice des îlots après 1 jour ou 12 jours de culture. 129
Figure 27 : With or without warm ischemia, islet yield (IEQ/pancreas) obtained 1h after isolation with the different preservation solutions. 137
Figure 28 : With or without warm ischemia, mitochondrial activity (relative to cell viability) of islet isolated with different preservation solution and cultured 1h or 20h. 138
Figure 29 : With or without warm ischemia, transcriptional analyses of islets 1h after isolation. 139
Figure 30 : Transfert de tolérance par l'intermédiaire des cellules spléniques $CD25^-$. 144
Figure 31 : "Processing" et présentation des antigènes exogènes et endogènes [Bidmon B.2011]. 158
Figure 32 : Effet des PEG à la surface des îlots sur la réaction IBMIR [Hwang JW.2011] [Lee DG.2011]. 160
Figure 33 : Méthodes d'immuno-isolation des îlots, figure issue de [Wilson JT.2008]. 170
Figure 34 : Emergence et rôle des DC tolérogènes. D'après [Mahnke K.2007]..... 178
Figure 35 : Induction de tolérance périphérique dominante par dépletion transitoire des lymphocytes T $CD4^+$ en division, (modèle TK^+/GCV^+ ou HU). 180
Figure 36 : Signalisation du TGF-β et émergence des cellules Th17 ou Treg [Korn T.2009]. 183

TABLEAUX

Tableau 1 : Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en greffe rénale et pancréatiques (données extraites du Rapport 2011 de l'Agence de biomédecine) [Agence-de-Biomedecine.2011]. 20
Tableau 2 : Classification de Maastricht. 23
Tableau 3 : Evolution des causes de non greffe des greffons rénaux prélevés sur donneurs décédés après arrêt cardiaque [Agence-de-Biomedecine.2011]. 25
Tableau 4 : Evolution du nombre de donneurs présentant des facteurs de risques d'échec de la greffe (Rapport 2011 de l'Agence de Biomédecine) [Agence-de-Biomedecine.2011]. 27
Tableau 5 : Facteurs donneurs influencants le rejet d'allogreffe à court ou long terme 30
Tableau 6 : Evolution du nombre de donneurs décédés de mort encéphalique prélevés d'un pancréas en vue d'une transplantation de pancréas ou d'îlots pancréatiques (Rapport 2011 Agence de Biomédecine) [Agence-de-Biomedecine.2011]. 69
Tableau 7 : Evolution des causes de non greffe des pancréas prélevés pour îlots en France [Agence-de-Biomedecine.2011]. 72
Tableau 8 : Evolution, à l'échelle internationale, des temps d'ischémie froide des pancréas avant isolement des îlots et durée de culture des îlots avant greffe (CITR report 2010, http://www.citregistry.org) [CITR.2010]. 73
Tableau 9 : Nombre de patients receveurs d'îlots, nombre d'injections d'îlots et nombre de donneurs d'îlots, entre 1999 et 2009, données du CITR [CITR.2010]. 73
Tableau 10 : Evolution, à l'échelle internationale, des processus d'obtention des îlots (CITR, Report 2010, http://www.citregistry.org) [CITR.2010]. 74
Tableau 11 : Evolution, à l'échelle internationale, des caractéristiques des îlots obtenus en fonction des méthodes de préservation des pancréas (CITR report 2010, http://www.citregistry.org) [CITR.2010] 75
Tableau 12 : Compositions des solutions de conservation couramment utilisées transplantation et comparées à la composition du sang. 94
Tableau 13 : combinaisons donneur/receveur utilisées au cours de ce travail. 113
Tableau 14 : Table permettant la conversion de la masse d'îlots en IEQ [Ricordi C.1990].. 116
Tableau 15 : Tableau récapitulatif du taux de NFP obtenus pour les isogreffes d'îlots préparés avec HBSS + 0,5% BSA ou avec SCOT 130

SOMMAIRE

INTRODUCTION 18
1 La transplantation comme moyen de traitement 19
1.1 Situation en transplantation 19
1.2 Les donneurs 21
1.3 Impact du donneur sur les lésions d'ischémie/reperfusion 29
2 Séquence d'ischémie/reperfusion (I/R), principaux mécanismes physiopathologiques en transplantation 30
2.1 Lésions de conservation 32
2.2 Lésions à la transplantation 35
2.2.1 Aspect de la greffe vascularisée 35
2.2.2 Aspect de la greffe non vascularisée 37
3 Particularités des lésions immédiates de la greffe non vascularisée d'îlots pancréatiques 38
4 Lésions d'I/R et aspects immunologiques 42
4.1 Impact des lésions d'I/R sur la réaction inflammatoire 42
4.2 Rejet d'allogreffe 47
4.2.1 Rejet aigu 47
4.2.2 Rejet chronique 55
4.3 Impact des lésions d'I/R sur l'autoréactivité 56
ETUDES DANS LA GREFFE D'ILOTS PANCREATIQUES 57
1 Choix du modèle 58
2 La transplantation d'îlots pancréatiques comme thérapie du diabète 58
4.1 Morphologie du pancréas 59
4.2 Pathogénèse du diabète du type I 61
4.2.1 Etiologie 61
4.2.2 Conséquences de la pathologie 63
4.3 Traitements du diabète de type I 64
4.3.1 Insulinothérapie 65
4.3.2 Transplantation de pancréas entier 65
4.3.3 La greffe d'îlots de Langerhans 66
4.3.3.1 Aspects Cliniques 66
4.3.3.2 Limites de la greffe d'ilots 71

5 Intérêts expérimentaux du modèle d'isolement et de transplantation d'îlots 76
5.1 Un outil d'évaluation de la conservation d'organe (phase d'ischémie) 76
5.2 Un outil d'évaluation de l'immunoprotection du greffon 79
SOLUTIONS AUX PROBLEMATIQUES CENTRALES EN TRANSPLANTATION 83
5.3 La conservation du greffon ex vivo : ischémie 84
5.3.1 Composition de la solution de conservation 85
5.3.2 Historique des solutions de conservations 88
5.3.2.1 Les solutions de quatrième génération 90
5.3.2.2 Le Polyéthylène glycol (PEG) 95
5.4 PEG et immunoprotection 96
5.5 La notion de Tolérance 98
5.5.1 Retard du rejet d'allogreffe : La tolérance immunitaire 99
5.5.2 Tolérance centrale 100
5.5.3 Tolérance périphérique 102
5.5.4 Modèle de déplétion clonale : système gène suicide HSV1-TK/GCV 104
OBJECTIFS DU TRAVAIL 110
METHODES 111
PARTIE I: 126
I. Préservation du greffon et Immunoprotection du greffon 127
1 Article 1: 127
Giraud S, Claire B, Eugene M, Debre P, Richard F, Barrou B. A new preservation solution increases islet yield and reduces graft immunogenicity in pancreatic islet transplantation. Transplantation. May 27; 83(10):1397-400.2007. 127
1.1 Rappel des objectifs et hypothèses 127
1.2 Données non publiées 128
1.3 Publication 130
1.4 Synthèse 132
II. Variation des longueurs de chaines et des concentrations des PEG 134
2 Article 2 : 134
Giraud S, Bon D, Neuzillet Y, Thuillier R, Eugene M, Hauet T, Barrou B. Concentration and chain length of Polyethylene Glycol in islet isolation solution, evaluation in a pancreatic islet transplantation model. Cell Transplant. 2012;21(9):2079-88. 134
2.1 Rappel des objectifs et hypothèses 134
2.2 Publication 134

2.3 Synthèse:.... 135
III. Préservation des greffons ayant subi une ischémie chaude.... 136
3 Article 3 :.... 136
Giraud S, Hauet T, Eugene M, Mauco G, Barrou B. "A New Preservation Solution (SCOT 15) Improves the islet Isolation process from pancreata of Non-Heart-Beating Donors: A Murine Model." Transplant. Proc. 41(8): 3293-3295. 2009 136
3.1 Rappel des objectifs et hypothèses 136
3.2 Publication.... 136
3.3 Données supplémentaires non publiées.... 137
3.4 Synthèse:.... 140
PARTIE II: 142
I. Induction de tolérance immunitaire à une allogreffe d'îlots 143
4 Article 4 :.... 143
Giraud S, Barrou B, Sebillaud S, Debré P, Klatzmann D, Thomas-Vaslin V. Transient depletion of dividing T lymphocytes in mice induces the emergence of regulatory T cells and dominant tolerance to islet allografts. Am J Transplant. 2008 May;8(5):942-53. 143
4.1 Rappel des objectifs et hypothèses 143
4.2 Publication.... 143
4.3 Données supplémentaires non publiées.... 144
4.4 Synthèse:.... 146
DISCUSSION 147
1 Préservation de l'intégrité du greffon (Partie I) 149
1.1 Interet de la solution SCOT et des PEG en conservation.... 149
1.2 Interet de la solution SCOT dans notre modèle d'îlots 150
1.3 Autres solutions contenant des PEG.... 151
1.3.1 IGL-1 151
1.3.2 Polysol.... 152
1.4 PEG et préservation de l'intégrité du greffon.... 152
2 Effets immunoprotecteurs de la solution SCOT 154
2.1 PEG et immunoprotection 155
2.2 PEG et immunoprotection dans notre modèle d'îlots.... 155
2.3 Preservation de l'integrité cellulaire et immunogenicité.... 156
2.4 Immunomodulation par les PEG 158
2.4.1 PEG et inhibition du phénomène IBMIR.... 159

2.4.2 PEG et prévention de l'immunogenicité 160
3 Choix des PEG 162
3.1 Variation de longeur et de concentration de PEG dans notre modèle d'îlots 162
3.2 Rôle de la masse et de la nature de PEG sur les effets immunoprotecteurs 163
3.2.1 Encombrement stérique des PEG 164
3.2.2 Adsorption des PEG à la membrane cellulaire 164
3.2.3 Nature des PEG 165
3.2.3.1 PEG réactifs 165
3.2.3.2 Problèmes lié à l'utilisation de PEG réactifs 167
4 Utilisation de la solution en clinique 167
4.1 Interet de la solution SCOT et DDAC 168
4.2 Solution SCOT et isolement des îlots pancréatiques en clinique 168
4.3 Autres méthodes d'immuno-isolation des îlots pour prolonger la durée de survie des greffons 170
5 Contrôle du rejet d'allogreffe (Partie II) 171
5.1 Induction de tolérance périphérique par depletion des lymphocytes T alloréactifs dans notre modèle d'îlots 171
5.1.1 Caractère de la tolérance 172
5.1.2 Tolérance et balance de cellules effectrices / regulatrices 173
5.1.3 Tolérance infectieuse 174
5.1.4 Role de la population Treg dans le contrôle de la tolérance 175
5.1.5 Induction de mécanismes multiples de tolérance periphérique 176
5.2 Interêt de la tolérance periphérique dans le contrôle de la recurrence du diabète autoimmun 176
5.3 Pouvoir immunosuppresseur des cellules apoptotiques 177
5.4 Induction de tolérance et environment immunoregulateur 178
5.4.1 Potentiel rôle des cellules dendritiques tolérogènes et cytokines immunoregulatrices 181
5.4.2 Le paradoxe TGF-β 181
5.5 Translation en clinique 183
5.6 Conclusion 185
PERSPECTIVES 186
BIBLIOGRAPHIE 188

AVANT PROPOS

La transplantation est devenue une solution incontournable afin de suppléer à la défaillance terminale d'organe ou de tissu. Les progrès de la médecine permettent aujourd'hui de remplacer la plupart des organes et tissus constituant le corps humain. En parallèle les avancées scientifiques ont permis de mieux caractériser et maitriser les éléments régissant les rejets de greffes. De nouvelles thérapies participent à améliorer la durée de vie des greffons et la qualité de vie des patients. Cependant les transplanteurs font face à une véritable pénurie de greffons. Le choix des donneurs devient donc nécessairement de moins en moins restrictif. Cet élargissement des critères de choix des donneurs, vers des donneurs à critères étendus a pour conséquence d'augmenter le pool de greffon mais *a contrario* s'avère aussi délétère. En effet les donneurs à critères étendus présentent des facteurs de comorbidités non négligeables tels que l'âge avancé et les troubles cardio-vasculaires. Ces nouveaux greffons, fragiles, sont donc très sensibles aux lésions d'ischémie/reperfusion (I/R). Cette fragilité fait le lit de complications post-transplantation. Cette séquence d'I/R est inévitable dans le processus de transplantation et est la source de lésions plus ou moins irréversibles. En effet cette période perturbe complètement la physiologie de l'organe, elle débute par l'ischémie (cessation du flux sanguin et donc arrêt de l'oxygénation des tissus), puis est ensuite souvent couplée à l'hypothermie durant la conservation extra-corporelle, puis se termine chez le receveur par la reperfusion durant laquelle l'organe est réoxygéné par le flux sanguin et réchauffé à température corporelle. La conservation des organes *ex vivo*, depuis l'explantation chez le donneur jusqu'à la transplantation chez le receveur, est la pierre angulaire du processus de transplantation. La qualité de préservation du greffon impacte irrémédiablement sur la reprise de fonction et la survie du transplant, notamment de par son rôle dans l'activation du système immunitaire inné puis adaptatif, contribuant au rejet aigu ou chronique. La recherche doit donc, en priorité, contribuer à la prévention des lésions d'I/R et notamment du rejet de greffe. Nos travaux, dans un modèle murin de transplantation d'îlots de Langerhans, ont eu pour objectifs : (i) d'évaluer une solution de conservation contenant des PEG (polyethyleneglycol) permettant une meilleure préservation de l'intégrité des îlots de Langerhans et un retard du rejet d'allogreffe, et (ii) de tenter d'établir une tolérance immunitaire vis-à-vis de l'allogreffe d'îlots pancréatiques, à l'aide d'un système de déplétion transitoire des lymphocytes T alloréactifs du receveur.

INTRODUCTION

1 La transplantation comme moyen de traitement

Afin de pallier au nombre croissant de défaillances terminales d'organes ou de tissus, la transplantation est devenue depuis quelques années une solution incontournable. A titre d'exemple, la transplantation de rein constitue le meilleur traitement de l'insuffisance rénale terminale. Quant à la thérapie du diabète de type I, elle s'adapte au degré de la maladie, chez les malades qui ne peuvent plus contrôler leur équilibre glycémique par l'injection d'insuline, l'ultime recours est la transplantation de pancréas entier ou d'îlots pancréatiques seuls. L'évolution de la transplantation d'îlots comme thérapie pouvant s'étendre à l'ensemble des degrés de la maladie.

Le processus de transplantation est défini par la séquence d'événements suivants:

- Le prélèvement d'organe chez le donneur, qui implique un arrêt de la perfusion sanguine dans l'organe à température corporelle, arrêt plus ou moins long selon le type de donneur : c'est la période d'ischémie chaude.
- La conservation extracorporelle de l'organe dont la durée est variable. Dans la majorité des cas l'organe est placé en hypothermie : c'est la période d'ischémie froide.
- La "transformation" de l'organe, qui est une étape qui ne concerne que peu de greffe. Elle peut consister en une étape d'extraction d'un tissu ou d'un type cellulaire à partir de l'organe prélevé.
- La transplantation chez le receveur. C'est la période de reperfusion pour un organe ou un tissu vascularisé necessitant le retour de la circualtion sanguine.

Ce processus d'ischémie/reperfusion (I/R) est à l'origine de lésions qui vont conditionner l'integrité et le devenir du greffon.

1.1 Situation en transplantation

La transplantation constitue, d'après l'Agence de la Biomédecine, un programme prioritaire. En effet ce traitement souffre d'une carence de greffons. Aujourd'hui en France seulement 1/4 à 1/3 des patients sur liste d'attente sont greffés chaque année. L'agence de Biomédecine a recensé pour l'année 2011, 2976 greffés rénaux pour 11920 patients en attente

de greffe (Tableau 1). Cette même année le nombre de patients en attente de greffe de pancréas était de 240, et seulement 73 patients ont été greffés [Agence-de-Biomedecine.2011] (Tableau 1). En France, au 1er janvier 2011, 29 malades étaient en attente d'une greffe d'îlots, et 16 malades ont été inscrits pendant l'année. Au cours de l'année 2011, 12 malades ont bénéficié d'au moins une injection d'îlots de Langerhans. Parmi ceux-ci, 1 a reçu sa première injection, 3 leur deuxième injection, 8 leur troisième injection [Agence-de-Biomedecine.2011].

Tableau 1 : Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en greffe rénale et pancréatiques (données extraites du Rapport 2011 de l'Agence de biomédecine) [Agence-de-Biomedecine.2011].

	2006	**2007**	**2008**	**2009**	**2010**	**2011**
Rein						
Malades restant en attente au 1er janvier de chaque année	5942	6157	6481	6869	7585	8436
Nouveaux inscrits dans l'année	3299	3546	3726	3898	4132	3884
Greffes de reins	2731	2912	2937	2826	2892	2976
Pancréas						
Malades restant en attente au 1er janvier de chaque année	170	171	150	154	159	148
Nouveaux inscrits dans l'année	124	105	116	125	119	92
Greffes de pancréas	90	99	84	89	96	73

Pour le rein, en 2011 en France, 3884 nouveaux malades ont été inscrits sur la liste nationale d'attente pour une greffe rénale, soit une diminution de 6% par rapport à l'année 2010. Pour la première fois un arrêt de progression et, plus encore, une diminution des nouvelles inscriptions sont observés [Agence-de-Biomedecine.2011]. Pour le pancréas, l'année 2011 est marquée par une baisse de l'activité de greffe pancréatique après 5 années d'activité relativement stable. Nous constatons une diminution du nombre des nouveaux patients inscrits en attente (-23%), des malades restant en attente au début de l'année (-14%) et du nombre de greffes avec seulement 73 réalisées soit une chute de 24% par rapport à 2010 [Agence-de-Biomedecine.2011].

L'écart entre l'offre et la demande est problématique au vu des conditions de vie des patients en attente de transplantation. En effet un patient sous dialyse, en attente d'une greffe rénale, a une espérance de vie réduite, inférieure à celle d'un patient greffé. De plus les personnes en attente de recevoir un greffon sont soumises à d'importantes contraintes de temps et de santé, imposant un emploi du temps très rigoureux. Pour les patients atteints du

diabète de type I insulinodépendant, en attente d'une greffe de pancréas ou d'une greffe d'îlots de Langerhans, la maîtrise de la maladie peut être un véritable calvaire. En effet ces patients contrôlent difficilement leur insulinothérapie en fonction du temps, de leur rythme de vie, de leur alimentation, de leurs dépenses énergétiques et de leur activité sportive.

Il est donc necessaire d'étendre les possibilités de greffe pour des patients toujours plus nombreux. Les professionnels de la santé mettent donc tout en œuvre pour faire augmenter le recensement et le prélèvement d'organes. Plusieurs pistes sont envisagées :

- Améliorer le recensement et le prélèvement de donneurs en état de mort encéphalique,
- Elargir les critères de choix des donneurs vers des donneurs à critères étendus (aussi appelés donneurs marginaux),
- Développer le prélèvement sur des personnes décédées après un arrêt cardiaque, que la loi autorise en France depuis 2006 (décret du 2 août 2005),
- Développer le prélèvement sur des donneurs vivants.

1.2 Les donneurs

Classiquement, en transplantation d'organe, il existe 3 types de donneurs (Figure 1) :

- Le donneur vivant. C'est le donneur idéal, offrant les meilleures conditions de prélèvement et de greffe dans une limite de temps optimale. Ce sont les greffes présentant le meilleur taux de réussite. Le temps de conservation extracorporelle des greffons est court (2 à 3 heures). En France ce type de donneurs ne représente que 10% des greffes rénales et seulement 1,2% des greffes hépatiques. Cette modalité est plus largement développée dans d'autres pays, en effet ces donneurs représentent 24% des dons en Grande-Bretagne, 38% en Suisse, 40% dans les pays scandinaves et 42% aux Etats-Unis.

- Le donneur en mort encéphalique. Cette forme de décès fait suite à des événements violents (tels que : traumatisme crânien grave, accident vasculaire cérébral, etc...). Ce type de décès correspond à l'arrêt total de la perfusion sanguine au niveau du cerveau aboutissant à sa destruction irréversible alors que tous les autres tissus sont vivants, grâce essentiellement au maintien de la fonction cardiaque et de la respiration artificielle. Cet état de mort encéphalique est mis en évidence par des examens cliniques répétés puis confirmés par un

examen paraclinique défini dans le Décret du 2 décembre 1996. En France, ce sont les donneurs les plus fréquents, ils représentent par exemple 87.9% des greffes de rein, 97% des greffes hépatiques et 100% des greffes de pancréas ou d'îlots pancréatiques.

- Le donneur décédé après arrêt cardiaque (DDAC). Le manque de donneurs a poussé un comité de pilotage, composé notamment de l'Agence de Biomédecine et des transplanteurs, à élargir les sources de dons. C'est pourquoi, en France, depuis 2006 la loi autorise le prélèvement chez les donneurs DDAC. Cette nouvelle source serait susceptible d'augmenter le pool de greffons de 20 à 40% [Daemen JH.1996] [Kootstra G.1991]. Néanmoins, les organes issus de cette catégorie de donneurs sont soumis à une durée d'ischémie chaude non négligeable suite à l'arrêt de la circulation sanguine ("no flow") et à la période de réanimation lors du massage cardiaque externe ("low flow"). De plus, ces greffons présentent un risque accru de non fonction primaire (NFP) et de reprise retardée de fonction (RRF) au moment de la transplantation [Hernandez-Alejandro R.2010] [Hoogland ER.2010] [Barlow AD.2009] [Malaise J.2007] [Sanchez-Fructuoso AI.2007] [Tojimbara T.2007] [Doshi MD.2007] [Sanni AO.2006] [Rengel M.2006] [Merion RM.2005] [Alonso A.2005] [Matsuno N.1997] [Casavilla A.1995] [Daemen JW.1994]. En effet, des études monocentriques ont montré, sur un recul de 10 ans, une nette augmentation ($p<0.001$) des NFP et des RRF des greffons provenant de donneurs DDAC [Alonso A.2005] [Gok MA.2002].

Sur le territoire français en 2012, 14 centres hospitaliers sont autorisés au prélèvement de reins chez les DDAC, selon un protocole strictement encadré en accord avec les principes précisés par l'Agence de Biomédecine en avril 2007 [Antoine C.2008]. L'extension au prélèvement de foie est rendue possible depuis 2009, 2 centres hospitaliers sont rentrés dans ce programme. Ce type de prelevement oblige au recours à la circulation régionale normothermique (CRN). Concernant les prélèvements de reins et de foie, ils sont limités aux patients issus des catégories I, II et IV de Maastricht (Tableau 2), c'est-à-dire les arrêts cardiaques extra-hospitaliers et les arrêts cardiaques survenant chez un patient en état de mort encéphalique. Les critères d'exclusion sont : (i) un âge du donneur supérieur à 55 ans et inférieur à 18 ans, (ii) certaines étiologies d'arrêt cardiaque : indication à la circulation extracorporelle (CEC) thérapeutique, hypothermie, (iii) intoxications médicamenteuses, (vi) certains antécédents : maladie rénale, hypertension, diabète, néoplasie, sepsis grave, (v) les polytraumatisés à haute énergie cinétique, (vi) les hémorragies cérébrales, et (vii) les décès par homicide et suicide.

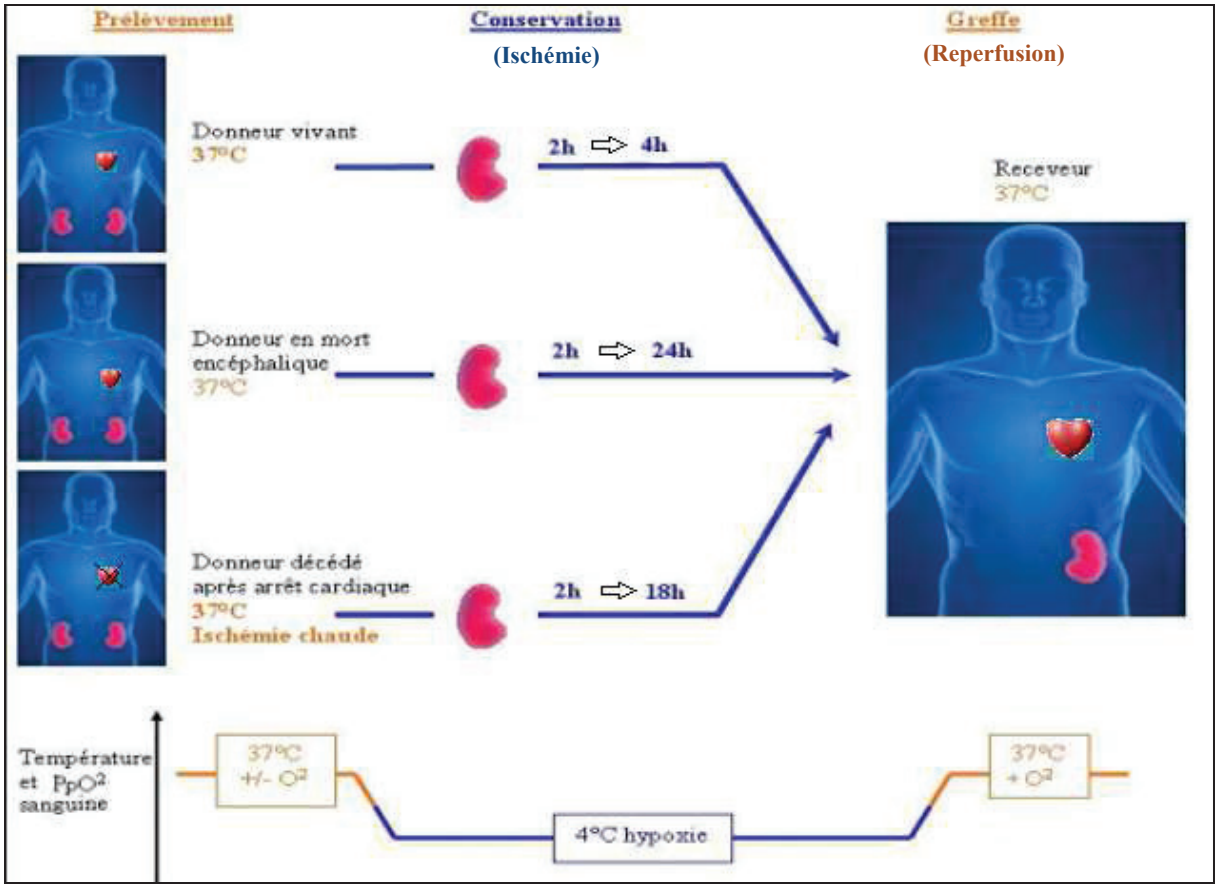


Figure 1 : Les différentes étapes du processus de transplantation.

Tableau 2 : Classification de Maastricht.

Classification de Maastricht		
I	Arrêts cardiaques extra-hospitaliers	Personnes qui arrivent à l'hôpital en arrêt cardiaque et pour lesquelles le prélèvement d'organes est envisagé si la durée de l'arrêt cardiaque est inférieure à 30 minutes. Il s'agit d'un arrêt cardiaque constaté en dehors de tout secours médical ou paramédical et s'avérant immédiatement ou secondairement irréversible.
II		Personnes qui ont un arrêt cardiaque en présence des secours, et dont la réanimation (massage cardiaque et respiration artificielle) échoue. C'est l'arrêt cardiaque dit "réfractaire".
III	Arrêts cardiaques intra-hospitaliers	Personnes pour lesquelles une decision d'un arrêt de soins en réanimation est prise en raison de leur pronostic
IV		Personnes décédées en mort encéphaliques qui font un arrêt cardiaque irréversible au cours de la prise en charge en réanimation.
V		équivalent de la Classe II, sauf qu'au lieu de se trouver hors de l'hôpital, le patient y est déjà.

Le comité de pilotage a également défini les conditions dans lesquelles ces prélèvements de reins sur DDAC doivent être réalisés, à savoir :

- Le délai entre l'arrêt cardiaque et le début de la réanimation ("no flow") doit être inférieur à 30 minutes,

- La durée de réanimation doit être d'un minimum de 30 minutes ("low flow"),

- Le délai entre l'arrêt cardiaque et le début du refroidissement *in situ* par la sonde de Gillot ou du début de la Circulation Régionale Normothermique (CRN) (délai d'ischémie chaude = "no flow" + "low flow") doit être inférieur à 150 minutes,

- La durée de refroidissement *in situ* doit être inférieure à 180 minutes ou inférieure à 240 minutes pour la CRN

- La préservation des greffons rénaux doit être réalisée par machine de perfusion,

- La durée d'ischémie froide doit être inférieure à 18 heures pour le rein (à partir de la néphrectomie pour la CRN ou à partir de la canulation pour le refroidissement *in situ*)

En France, le prélèvement sur les donneurs DDAC est encore très récent et le nombre de ces donneurs représente en 2011 seulement 2,2% des greffes de rein et 0,5% des greffes de foie. En 2011, le nombre de sujets DDAC déclarés à l'Agence de la biomédecine était de 122 (contre 121 en 2010), le taux de prélèvement était plus faible avec 58 donneurs sur les 10 sites actifs ayant fait l'objet de prélèvement de reins et ayant abouti à 66 greffes de rein (79 en 2010). Deux centres se sont engagés en 2010 dans l'activité de prélèvement hépatique, et en 2011, un total de 6 foies ont été prélevés dont 5 ont pu être greffés. L'âge moyen des donneurs DDAC prélevés est de 41,4 ans.

Les causes de non greffe d'organes provenant de donneurs DDAC sont encore représentées par la mauvaise qualité du greffon et par la détérioration du greffon. En 2006 seulement une non-greffe était due à la mauvaise qualité du greffon et aucune non-greffe n'était due à une détérioration du greffon. A partir de 2007 le chiffre de non-greffes suite à une mauvaise qualité des greffons n'a fait qu'augmenter pour atteindre en 2011 un nombre de 146 greffons rénaux provenant des donneurs en état de mort encéphalique et 21 pour les greffons rénaux provenant des donneurs décédés après arrêt cardiaque (Tableau 3) [Agence-de-Biomedecine.2011]. Ces données incitent à encourager le recours à des méthodes optimales pour le conditionnement et la préservation des organes. C'est pourquoi, la recherche

en transplantation doit concentrer ses efforts au développement de nouveaux moyens de préservation de l'intégrité des greffons.

Tableau 3 : Evolution des causes de non greffe des greffons rénaux prélevés sur donneurs décédés après arrêt cardiaque [Agence-de-Biomedecine.2011].

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Doneurs décédé en état de mort encéphalique						
Mauvaise qualité du greffon	128	139	132	105	109	146
Donneurs décédés après arrêt cardiaque						
Mauvaise qualité du greffon	1	11	17	23	19	21

Solution à la pénurie d'organe.

L'évolution actuelle du don d'organes nécessite d'augmenter le pool des donneurs et implique donc une extension des critères de choix. Le donneur à critères étendus est un donneur à risques pour le receveur : NFP, reprise retardée de fonction, surmortalité post-opératoire, durée de survie du greffon diminuée [Ojo AO.2005]. Excepté le donneur vivant, le donneur "idéal" est un donneur en état de mort encéphalique, âgé de moins de 40 ans, dont la cause de la mort est traumatique, dont l'hémodynamique est contrôlée (stable) au moment du prélèvement, qui n'a pas de stéatose ni d'autres lésions parenchymateuse chronique sous-jacente et qui n'est pas porteur de maladie transmissible [Feng S.2006] [Feng XN.2006]. Pour ce type de donneur "idéal", le risque de NFP ou de dysfonction du greffon conduisant au décès ou à la re-transplantation est inférieur à 5 %. Par définition, un donneur à critères étendus est un donneur présentant une ou plusieurs des caractéristiques différentes de celles d'un donneur décédé "idéal". À l'inverse, des facteurs indépendants du donneur liés à des difficultés techniques survenant après le prélèvement, par exemple, ne doivent pas être pris en compte dans cette définition [Bernard M.2009].

Selon la définition américaine [Ojo AO.2005], un donneur est considéré "à critères étendus" ou "marginal" quand il a plus de 60 ans ou bien entre 50 et 59 ans avec deux des critères suivants:

- L'hypertension artérielle,
- Un décès lié à un accident vasculaire,
- La créatininémie supérieure à 150 µmol/L.

Selon une étude américaine, les greffes réalisées à partir de donneurs âgés à critères étendus sont associées à un risque plus important de rejet de greffe et de décès du patient [Ojo AO.2005] [Chavalitdhamrong D.2008]. Par rapport aux patients dialysés, les patients greffés à partir de reins marginaux, une fois passée la phase de surmortalité post-opératoire, ont un gain d'espérance de vie de 5 ans, alors qu'elle est de 13 ans avec un donneur "idéal" non marginal. Il a aussi été montré que le risque de mortalité post-transplantation, à partir d'un greffon marginal, est diminué de 60 % par rapport aux patients restant en liste d'attente. L'évaluation des reins passe aussi par un score histologique et le suivi de certains paramètres biologiques. L'optimisation d'un rein marginal requiert un recours éventuel à une biopsie au moment du prélèvement, la régulation simplifiée de l'organe, l'amélioration des conditions de perfusion, la sélection du receveur, et surtout d'accorder la priorité à la durée d'ischémie [Merville P.2007]. L'amélioration des conditions de conservation des greffons marginaux, telle que l'utilisation de la machine de perfusion, permet une réduction du taux de RRF et une surveillance *ex vivo* de l'organe [Moers C.2009].

En France, depuis une dizaine d'années, la part des donneurs jeunes (âgé de moins de 50 ans) tend à diminuer au profit des donneurs âgés de 50 à 64 ans et surtout des donneurs âgés de plus de 60 ans (augmentation de 7,5% en 1999 à 41,1% en 2011) (Tableau 4) et de plus de 65 ans (augmentation de 412% en 10 ans), en 2011 les donneurs âgés de 65 ans et plus représentent près de 30%. L'age moyen des donneurs en 1998 était de 38 ans, alors qu'il est de 53 ans en 2011. Parallèlement à ce vieillissement de la population des donneurs, les causes de décès tendent également à se modifier, avec une augmentation des décès vasculaires (cause de décès plus fréquente chez les personnes âgées) par rapport aux décès par traumatisme (cause de décès plus fréquente chez les personnes jeunes). Les données de l'Agence de Biomedecine montrent également une augmentation constante depuis 2001 du nombre de donneurs présentant 2 facteurs de risques ou plus (2,7% des donneurs présentaient 2 facteurs de risques ou plus en 2001, alors qu'ils sont 9,7% en 2011) (Tableau 4).

Tableau 4 : Evolution du nombre de donneurs présentant des facteurs de risques d'échec de la greffe (Rapport 2011 de l'Agence de Biomédecine) [Agence-de-Biomedecine.2011].

	60 ans ou moins		Plus de 60 ans		Total	Moins de 2 facteurs de risque*		2 facteurs de risques ou plus*		Total
Années	N	%	N	%	N	N	%	N	%	N
1997	814	92,4	67	7,6	881	860	97,6	21	2,4	881
1998	919	92,5	75	7,5	994	967	97,3	27	2,7	994
1999	895	92,3	75	7,7	970	945	97,4	25	2,6	970
2000	892	87,8	124	12,2	1016	975	96	41	4	1016
2001	904	84,9	161	15,1	1065	1036	97,3	29	2,7	1065
2002	1018	85	180	15	1198	1141	95,2	57	4,8	1198
2003	895	80	224	20	1119	1069	95,5	50	4,5	1119
2004	975	75,5	316	24,5	1291	1217	94,3	74	5,7	1291
2005	972	70,9	399	29,1	1371	1298	94,7	73	5,3	1371
2006	1004	69,6	438	30,4	1442	1375	95,4	67	4,6	1442
2007	1062	68	499	32	1561	1441	92,3	120	7,7	1561
2008	1001	64	562	36	1563	1441	92,2	122	7,8	1563
2009	926	62,5	555	37,5	1481	1345	90,8	136	9,2	1481
2010	882	59,8	594	40,2	1476	1335	90,4	141	9,6	1476
2011	926	58,9	646	41,1	1572	1420	90,3	152	9,7	1572
Total	**14085**	**74,1**	**4915**	**25,9**	**19000**	**18262**	**96,1**	**738**	**3,9**	**19000**

* : Au moins deux facteurs de risque parmi l'hypertension artérielle, le diabète, un décès de cause vasculaire ou une créatinémie supérieure à 150 µmol/l

Tous ces facteurs de risques participent à l'augmentation du nombre de greffons "marginaux" présentant des facteurs de comorbidités non négligeables (Tableau 4). Ces organes sont donc nettement plus sensibles aux lésions d'I/R, majorant ainsi les risques d'échec de la greffe. La conséquence directe étant évidemment les désordres de reprises de fonction des greffons et l'émergence de rejet de greffes à plus ou moins long terme [Eltzschig HK.2011] [Jamieson RW.2008] [Perico N.2004].

Les données françaises montrent que l'âge du donneur est un facteur pronostic de la durée de survie du greffon. En effet, plus le greffon est âgé plus la durée de survie de celui-ci sera réduite chez le receveur. Pour un greffon rénal, la survie à 5 ans d'un greffon provenant d'un donneur âgé entre 18 et 60 ans est de 81.3% alors que cette survie est de seulement 63.6% pour un greffon âgé de plus de 70 ans [Agence-de-Biomedecine.2011]..

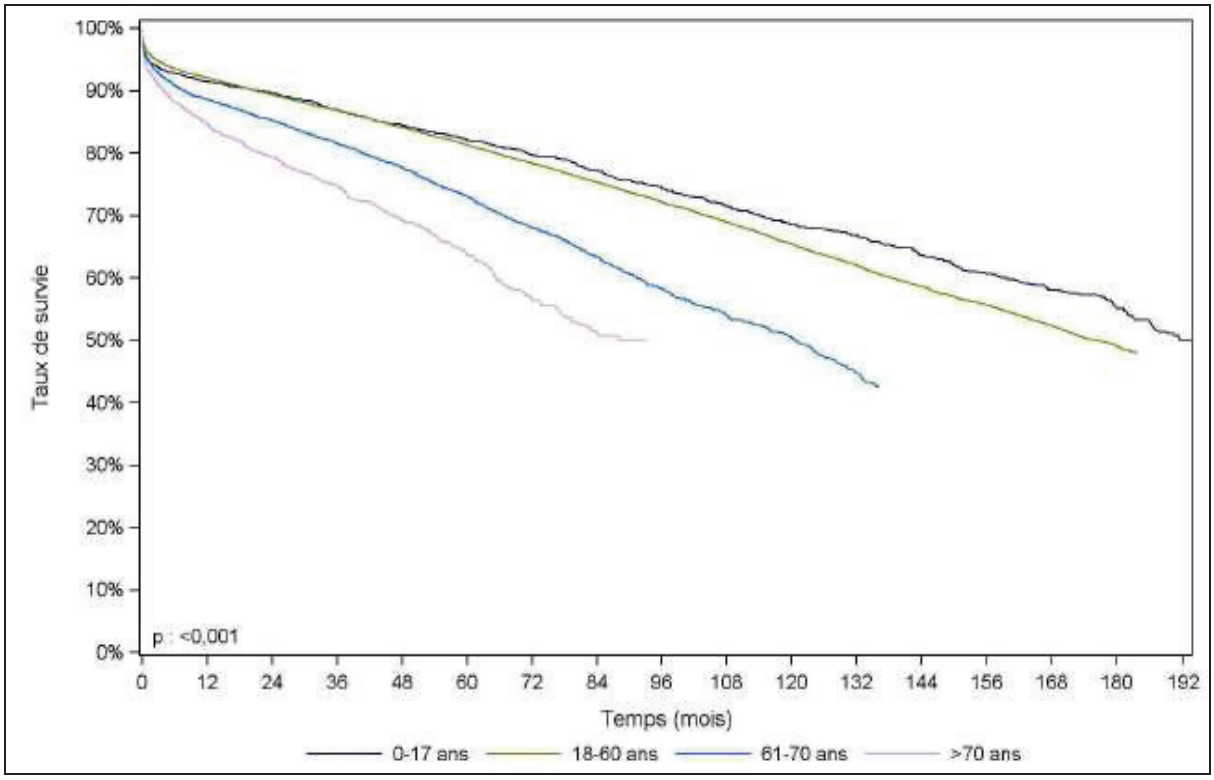


Figure 2 : Survie du greffon rénal selon l'âge du donneur entre 1993 et 2010 (Rapport 2011 de l'Agence de Biomédecine) [Agence-de-Biomedecine.2011].

Répartition des 3 types de donneurs

Chacun de ces 3 types de donneurs est en augmentation depuis quelques années sur le territoire français. Mais cette augmentation reste en deçà de la croissance des patients en liste d'attente de greffe.

Actuellement, en France, les greffons rénaux et hépatiques peuvent être prélevés chez les 3 différents types de donneurs. Le pancréas quant à lui est prélevé en France uniquement chez les donneurs en mort encéphaliques. "En 2009, un groupe de travail réunissant les équipes françaises de greffes de pancréas entier et d'îlots pancréatiques, a mené une réflexion sur les moyens d'augmenter l'activité de greffe pancréatique tout en stimulant les travaux de recherche sur les greffes d'îlots. Il a été décidé de clarifier et simplifier les règles d'attribution en orientant, dans un premier temps, le prélèvement du pancréas (organe entier ou destiné à une greffe d'îlots) selon des critères d'âge et d'indice de masse corporelle. La greffe de pancréas ne peut être réalisée qu'avec des pancréas de donneurs en mort encéphalique dits optimaux, c'est-à-dire âgés de moins de 50 ans, sans surcharge pondérale ou sans arrêt cardiaque prolongé notamment, alors que les îlots peuvent être isolés à partir de pancréas à

critères plus larges en termes d'âge et d'indice de masse corporelle" [Agence-de-Biomedecine.2011].

A l'échelle internationale le choix des donneurs est plus étendu pour la transplantation d'îlots de Langerhans issus de pancréas. En effet, aux Etats-Unis par exemple, les donneurs d'îlots peuvent être des donneurs en mort encéphalique ou des donneurs DDAC. La durée d'ischémie froide est d'environ 5,7 heures pour les transplantations d'îlots combinées à une transplantation de rein et est de 7,3 heures pour une greffe d'îlots seuls. Depuis plus d'une dixaine d'années, l'âge des donneurs est en moyenne de 44 ans et 36 % des donneurs présentent des antécédents d'hypertension. Malheureusement le poids et l'index de masse corporelle (BMI) de ces donneurs augmentent significativement depuis 1999. En 2009 le poids moyen des donneurs était de 91,3 kg pour un BMI de 30,3 kg/m^2, alors qu'il était de 84,9 kg pour 28,3 kg/m^2 [Registry CIT.2010].

L'état général du donneur, ses antécédents médicaux, la cause du décès, ainsi que les délais de prise en charge du donneur sont tous des facteurs établissant le lit de la sensibilité du greffon aux lésions d'I/R. La démographie actuelle des donneurs d'organes présente des greffons dont l'intégrité et la fonctionnalité sont de plus en plus altérés, auxquels la séquence d'I/R est un choc considérable sur le devenir de l'organe.

1.3 Impact du donneur sur les lésions d'ischémie/reperfusion

Les facteurs provenant du donneur sont les premiers moteurs des lésions d'I/R influencants le devenir du greffon. En effet les facteurs allo-indépendants font le lit des lésions favorisant les dysfonctions primaires et tardives du greffon. Les facteurs allodépendants quand à eux participent aux rejets aigus et chroniques du greffon. Durant la séquence d'I/R, des intéractions existent entre ces facteurs allodépendants et alloindépendants (Tableau 5). Ces réactions croisées renforcent les lésions conduisant aux rejets métaboliques et/ou immunologiques des transplants à plus ou moins long terme.

Tableau 5 : Facteurs donneurs influencants le rejet d'allogreffe à court ou long terme

Facteurs influençant le rejet d'allogreffe	**Fateurs allo-dépendants**		**Facteurs allo-indépendants**	
Facteurs Donneur	Alloantigènes		Diabète Dyslipidémie Hypertension Mort encéphalique Age	
Ischémie/Reperfusion Greffon	Augmentation de l'immunogénicité du greffon Intensification de la réponse inflammatoire		Perte de l'intégrité cellulaire et tissulaire (nécrose et apoptose) Coagulation " no reflow " Stress oxydant Activation endothéliale DAMPs Secretion de cytokines et chemokines	
Incidences	Vasculopathie Déclenchement de la réponse immunitaire adaptative		Dysfonction métabolique	Fibrose interstitielle Intensification de la réponse immunitaire Vasculopathie
Facteurs Receveur			Coagulopathies	Diabète Hypertension Age
Devenir du greffon	Rejet aigu Rejet chronique		Dysfonction primaire (Non reprise de fonction ou reprise retardée)	Participation au rejet aigu Rejet chronique

2 Séquence d'ischémie/reperfusion (I/R), principaux mécanismes physiopathologiques en transplantation

La séquence d'I/R est inévitable dans le processus de transplantation. L'ischémie est définie comme une diminution ou un arrêt de l'apport sanguin artériel à un tissu ou à un organe provoquant l'altération de ses fonctions. La reperfusion est la restauration du flux sanguin, chargé en O_2 et en nutriments, au niveau du greffon.

L'ischémie a pour conséquence directe des troubles majeurs de l'hémostase, tels que :

- un arrêt du flux vasculaire induisant une stase sanguine et une activation de la cascade de coagulation,
- un arrêt de l'apport en oxygène aux tissus (hypoxie),

- un arrêt des apports en nutriments sanguins comme le glucose,
- une diminution de la température de l'organe non vascularisé.

Cette période ischémique selon le type de donneur et en fonction des organes peut s'étendre sur différentes phases :

- L'ischémie débute, chez le donneur DDAC, à l'arrêt de la circulation sanguine suite à l'arrêt cardiaque. Chez les donneurs à cœur battant (donneurs vivants ou donneurs en état de mort encéphalique), l'ischémie débute lors du prélèvement au moment du clampage des vaisseaux sanguins de l'organe. Cette première période ischémique chez le donneur est appelée ischémie chaude (à température corporelle), classiquement en clinique elle ne doit pas excéder 30 minutes.

- Suite au prélèvement de l'organe chez le donneur le greffon subi une phase de conservation extracorporelle. Dès l'explantation, l'organe est privé de son environnement physiologique et devient alors très exposé. Dans la majorité des cas, durant cette période, le greffon est rincé avec une solution de conservation hypothermique puis plongé pour conservation dans cette même solution, cette phase est nommée ischémie froide. En effet, les principes empiriques de la préservation des greffons recommandent une température de préservation à 4°C pour inhiber le métabolisme cellulaire. Cependant, à 4°C, le métabolisme cellulaire n'est pas totalement inhibé [Watson CJ.2012]. Selon la loi de Van't Hoff, le métabolisme diminue de 50% à chaque palier de 10 degrés, à 4°C le métabolisme actif résiduel est donc d'environ 10%. En France, en règle générale, cette période d'ischémie froide varie (i) entre 2h et 4h pour le foie et le rein provenant du donneur vivant, (ii) entre 2h et 18h pour le pancréas et entre 2h et 24h pour le rein provenant de donneur en mort encéphalique, et (iii) entre 2h et 18h pour le rein provenant du donneur décédé après arrêt cardiaque. Le prélèvement du pancréas chez les donneurs DDAC n'est pas encore réalisé en France. Pour un pancréas destiné à l'isolement des îlots de Langerhans, la durée d'ischémie froide doit être inférieure à 8h. Durant cette période, la solution de conservation joue un rôle majeur sur la préservation de l'intégrité du greffon. Cette solution doit être capable de répondre aux besoins du greffon et protéger le tissu des effets délétères de l'ischémie.

- L'ischémie s'étend jusqu'au moment de l'implantation du greffon dans l'organisme receveur avant d'être connecté au réseau vasculaire. Cette période de gestes chirurgicaux est l'ischémie tiède, elle est couplée au réchauffement du greffon. Cette séquence peut être très courte, comme tout autant se prolonger au-delà de 1h en cas de troubles opératoires.

- Au moment de la reperfusion, dans le cas des greffes vascularisées le greffon est relié au réseau vasculaire du receveur permettant ainsi le retour de la circulation sanguine au sein de l'organe. Normalement, à ce moment précis l'ischémie fait place à la normoxie. Malgré tout, certaines zones du greffon ne sont pas reperfusées, c'est le phénomène de "no-reflow", au sein de ces territoires l'ischémie chaude persiste. Dans le cas des greffes non vascularisées, la reperfusion n'a pas lieu immédiatement, la vascularisation se fera que quelques jours voire quelques semaines après greffe.

2.1 Lésions de conservation

La période propice à des bouleversements physiopathologiques majeurs est la séquence d'ischémie. Effectivement cette période présente des facteurs initiateurs néfastes pour le métabolisme cellulaire et tissulaire :

- le retrait de l'organe ou du tissu de son contexte naturel,
- l'arrêt de la circulation sanguine et ses conséquences sur la cessation des apports en oxygène et en nutriments,
- l'utilisation d'une solution de conservation plus ou moins proche des besoins de l'organe,
- le choc thermique inéluctable du fait de la conservation hypothermique.

L'ischémie entraîne une baisse des apports en oxygène et en nutriments, en inadéquation avec les besoins de l'organe ou du tissu, aboutissant à la perturbation de sa fonction. Lors de cette phase d'ischémie, on assiste à une accumulation des déchets issus du métabolisme anaérobie et à une déplétion énergétique importante. Ceci implique la survenue d'un certain nombre de processus qui seront exacerbés lors de la reperfusion du tissu par le sang oxygéné.

L'ischémie qui entraîne une chute de la pression partielle en oxygène provoque une cessation du métabolisme oxydatif cellulaire qui se réoriente vers le métabolisme anaérobie. En effet, en condition d'hypoxie, la mitochondrie ne peut plus assurer la phosphorylation oxydative nécessaire à la production d'ATP. De ce fait, le métabolisme anaérobie assure la continuité de la glycolyse et mène à la réduction du pyruvate en lactate, induisant une situation d'acidose cellulaire [Allen DG.2003] [Perico N.2004] [Bonventre JV.1985]. Cette

voie anaérobie permet la régénération du NADH et assure une production d'ATP résiduelle qui est, néanmoins, insuffisante pour couvrir les besoins énergétiques de la cellule.

La réduction du pyruvate en lactate ainsi que la génération des ions H^+, protons produits par l'hydrolyse de l'ATP, sont responsables d'une baisse du pH intracellulaire provoquant un environnement acide. Cette acidose cellulaire s'étend à l'échelle tissulaire, le lactate intracellulaire étant transféré dans le milieu extracellulaire. Cette lésion s'installe dans les 10 premières minutes de l'ischémie [Neely JR.1984]. En cas d'ischémie prolongée, la diminution du pH va entraîner une perméabilisation membranaire, responsable de l'entrée d'eau dans la cellule et donc de la mort cellulaire.

L'augmentation intracellulaire des ions H^+ induit une activation de la pompe Na^+/H^+ et donc la sortie des protons vers le milieu extracellulaire, ce qui a pour conséquence l'augmentation de la concentration intracellulaire d'ions Na^+. Pour compenser cette hausse en sodium, l'échange Na^+/Ca^{2+} est activé pour expulser les ions Na^+, participant ainsi à l'augmentation de la concentration calcique cytosolique et intra-mitochondriale [Riess ML.2002] [Allen DG.2003]. Cette hausse de calcium intracellulaire permet l'activation des enzymes protéolytiques et cytolytiques calciques dépendantes. Ces enzymes participent fortement à la désorganisation des structures cellulaires, tels que la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le cytosquelette, conduisant la cellule vers l'apoptose ou la nécrose cellulaire.

L'homéostasie cellulaire est assurée par des canaux ioniques membranaires ATP dépendants (Figure 3). Le manque d'ATP provoque donc le blocage de la pompe Na^+/K^+ ATPase. Il y a alors une fuite passive du potassium dans le milieu extracellulaire perturbant ainsi l'équilibre ionique et conduisant à une entrée équivalente de sodium dans la cellule [Garlicki M.1999]. Cette augmentation de la concentration sodique cellulaire induit alors une entrée d'eau dans la cellule. En effet, pour maintenir l'équilibre osmotique, l'entrée massive de Na^+ dans la cellule s'accompagne d'une entrée passive d'eau, et donc d'un œdème cellulaire [Macknight AD.1977]. Cet œdème va mettre la cellule en souffrance, et notamment la mitochondrie, la faisant gonfler et perturbant son métabolisme.

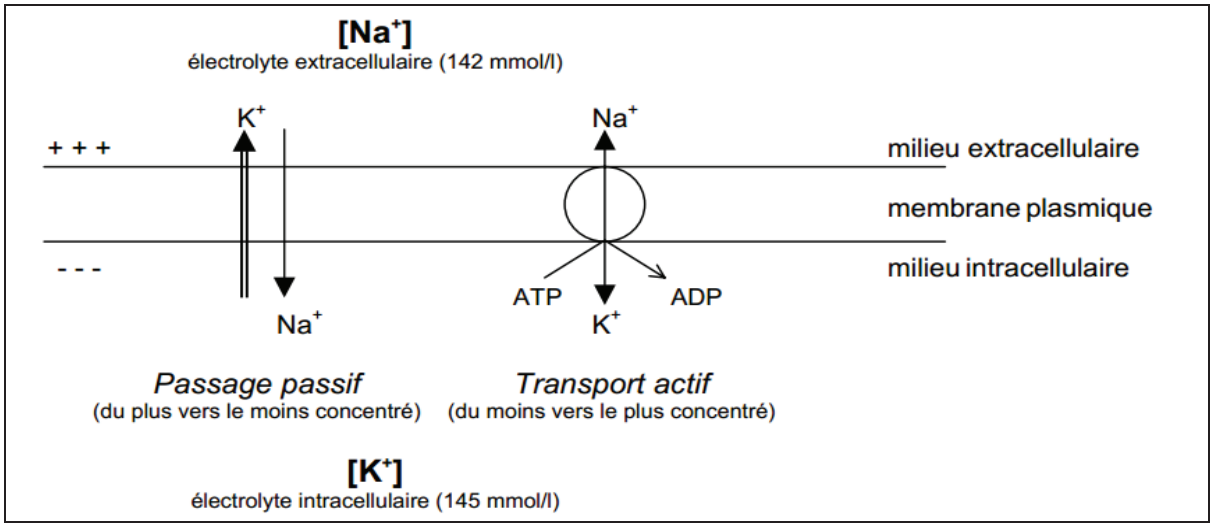


Figure 3 : Pompes membranaire et homéostasie potassique et sodique.

La mitochondrie est l'un des principaux sites cellulaire lésé. Cette organelle est le carrefour de plusieurs voies lésionnelles de par son implication dans la synthèse de l'ATP, la production d'espèces oxygénées réactives (ROS), le cycle du calcium et l'apoptose cellulaire. En effet, la dégradation de l'ATP, couplée à l'augmentation du calcium intracellulaire et à la diminution du pH cellulaire, va entraîner une instabilité de la membrane mitochondriale. De plus, lors de l'hypoxie, on observe un blocage de la chaîne de complexes mitochondriaux qui va conduire à une accumulation d'électrons, entraînant une augmentation de l'électronégativité de la chaîne et une fuite de ces électrons. Dans les temps précoces de l'ischémie, l'oxygène restant disponible va pouvoir réagir avec les électrons libres et créer une espèce radicalaire très active : l'anion superoxide ($O2^{\cdot -}$), métabolite instable de toute la réaction radicalaire [Crompton M.1999].

Pour des périodes d'ischémie assez courtes, la cellule se détoxifie de ce radical grâce à une enzyme clé : la manganèse superoxide dismutase (MnSOD). C'est une métallo-enzyme mitochondriale qui dismute l'$O_2^{\cdot -}$. Elle produit le radical hydroxyle qui, suite à sa prise en charge par le système glutathion/glutathion peroxydase, conduit à la formation d'eau. Cependant, ces défenses antioxydantes s'affaiblissent en fin d'ischémie, rendant la cellule très sensibles aux agressions des ROS à la reperfusion [Fleury C.2002].

L'hypothermie sévère à laquelle le greffon est soumis, choisi empiriquement pour mettre l'organe "au repos", est très dommageable. A 4°C, la diminution du métabolisme rend difficile la mise en place des systèmes de défense cellulaire. "L'arrêt" du métabolisme et notamment de la phosphorylation oxydative limite la production d'ATP. Au bout de 4 heures

d'ischémie à 4°C, environ 95% de l'ATP a disparu [Maathuis MH.2007]. Le froid été donc préjudiciable pour le tissu : les effets indésirables de l'hypothermie étant majoritairement la dégradation de l'intégrité cellulaire, et les lésions liées à la diminution de l'ATP, telles que l'œdème cellulaire et l'acidose [Maathuis MH.2007] [Salahudeen AK.2004b].

L'hypoxie couplée à l'hypothermie, déclenche donc une altération du métabolisme aboutissant à des modifications de l'intégrité cellulaire. Les premières cellules touchées sont les cellules endothéliales tapissant la paroi des vaisseaux sanguins. Les lésions d'ischémie vont provoquer une activation des cellules endothéliales en réponse à l'agression des phénomènes non physiologiques qui constituent son environnement durant la conservation. L'ensemble des lésions d'ischémie, vont conduire certaines cellules du lit vasculaire vers la nécrose et le détachement de leur matrice. A la reperfusion, l'endothélium altéré devient donc le siège d'une activation de la voie de la coagulation et d'une inflammation majeure ayant pour conséquence l'activation du système immunitaire inné.

Les effets secondaires des lésions d'ischémie apparaissent peu pendant la phase d'ischémie, ils sont plutôt "visibles" au moment de la transplantation chez le receveur. En effet, les modifications métaboliques et structurelles qui ont lieu pendant la période d'ischémie font le lit des lésions de transplantation.

2.2 Lésions à la transplantation

Les premiers processus physiopathologiques liés à la transplantation sont : l'initiation de la réponse aux lésions provoquées par l'ischémie et l'extension de ces dernières par un mécanisme immuno-inflammatoire [Perico N.2004] [Eltzschig HK.2012].

Les lésions de transplantation peuvent varier selon la nature de la greffe, qu'elle soit vascularisée ou non vascularisée.

2.2.1 Aspect de la greffe vascularisée

Dans le cas des greffes d'organes vascularisés, comme le rein ou le foie, lors de la transplantation, la connexion du greffon au réseau vasculaire du receveur doit permettre la recirculation du sang, c'est la reperfusion. "La reperfusion est une phase critique. Tout se

passe comme si elle révélait brutalement les insuffisances accumulées lors de la phase d'ischémie en plus de ses propres effets délétères" [Fornas D.2001].

Lors de cette étape, l'œdème cellulaire et tissulaire, généré au cours de l'ischémie, peut entraîner une compression du lit vasculaire diminuant le débit de perfusion dans l'organe et favorisant le phénomène de "no-reflow" [Gute D.1995]. D'autres phénomènes peuvent contribuer à ce désordre physiologique. En effet, suite aux altérations cellulaires provoquant le remaniement du cytosquelette, l'altération des membranes ou l'apoptose, l'endothélium exprime à sa surface des phospholipides pro-coagulants [Chiang ET.2009]. Ainsi l'expression des phospholipides, provoque des micro-thromboses, sources de "no-reflow" [Gute DC.1998]. L'expression de Tissue Factor (TF) à la surface cellulaire est corrélée à l'intensité de la réaction coagulante et inflammatoire dans les temps précoces post-transplantation [Ushigome H.2002] [Matsuyama M.2003] [Kobayashi Y.1998] [Nakamura K.2002]. De plus, l'endothélium altéré s'active et permet alors l'adhérence des polynucléaires neutrophiles et des monocytes à la paroi vasculaire. La lumière vasculaire est alors encombrée par des agglomérats leucocytaires, limitant la circulation sanguine, amplifiant ainsi le phénomène de "no-reflow" [Gute D.1995] [Gute DC.1998] [Panes J.1999]. La non-reperfusion du greffon est la première lésion dramatique de la transplantation, l'ischémie étant maintenue au sein de ces territoires non vascularisés. Cette ischémie tissulaire est très délétère car l'organe retrouve sa température physiologique favorisant ainsi les désordres métaboliques. Lorsque le nombre de territoires non revascularisés est important, l'organe ne retrouve pas l'intégralité de sa fonction, provoquant ainsi des dysfonctions primaires du greffon (RRF et NRF).

En plus des conséquences sur le "no-reflow", l'activation de la voie de la coagulation a pour conséquence une activation de la NO synthase endotheliale augmentant la production de NO (monoxyde d'azote). A de fortes concentrations cet élément vasodilatateur réagit avec les radicaux superoxides pour produire des peroxinitrites (ONOOH), espèces radicalaires à l'origine de lésions sévères du stress oxydant [Perico N.2004].

La reperfusion conduit à l'afflux de glucose et d'oxygène, permettant un retour au métabolisme aérobie et à la production d'ATP. Lors de la reperfusion, l'apport d'oxygène est à l'origine d'une production incontrolable d'espèces radicalaires oxygénées (ROS) (Figure 4). En effet, les lésions mitochondriales initiées durant l'ischémie sont accentuées à la reperfusion, et la mitochondrie devient donc incapable de faire face à l'afflux d'oxygène. L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (H2O2) réagissent pour former le radical hydroxyle ($HO^{\cdot}$) hautement cytotoxique et réactif, qui va alors initier la peroxydation des

lipides de la membrane mitochondriale augmentant sa perméabilité. L'importante production de ROS surpasse complètement les systèmes de défenses antioxydantes et conduit à de graves lésions cellulaires et tissulaires. Les altérations du réticulum endoplasmique vont ainsi permettre la libération de flux calciques, sources d'activation des enzymes protéolytique. Ce stress oxydant a également pour conséquence la perméabilisation de la membrane mitochondriale entraînant la fuite du cytochrome C dans le cytoplasme. Ce dernier, puissant activateur de la caspase 9, va déclencher l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose initiant la mort programmée de la cellule [Caroppi P.2009]. Un des premiers symptômes de l'apoptose est le remaniement membranaire favorisant l'expression des phosphatidylserines à la surface cellulaire et conduisant au caractère pro-coagulant des membranes cellulaires.

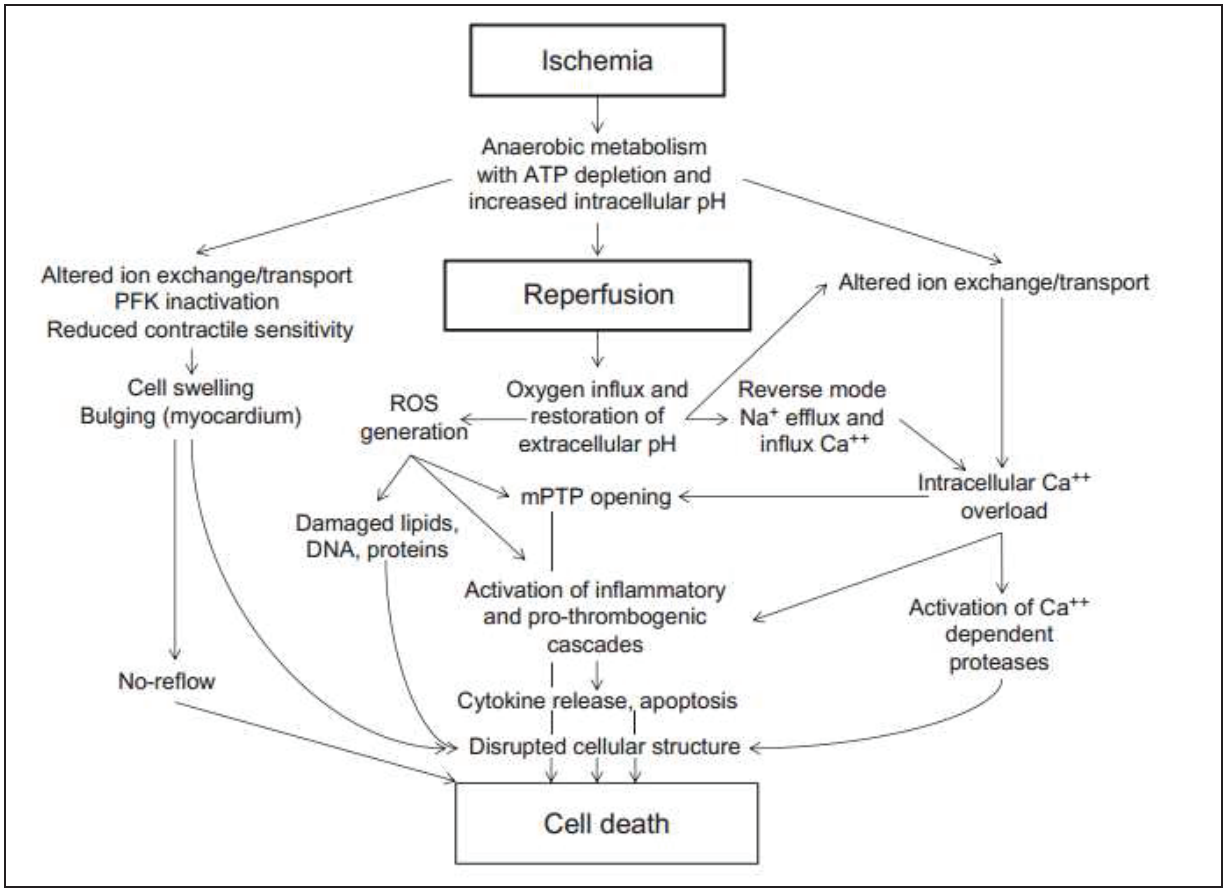


Figure 4 : Physiopathologie des lésions d'I/R. Figure issue de [Kalogeris T.2012]

2.2.2 Aspect de la greffe non vascularisée

Dans le cas de la greffe non vascularisée, comme la transplantation d'îlots pancréatiques, la revascularisation du tissu n'est pas immédiate. En effet celle-ci peut

apparaitre que quelques jours voire quelques semaines après la greffe. Dans ce cas, il est "délicat" de parler de reperfusion.

Lors de la non-vacsularisation l'afflux de glucose et d'oxygène au sein du tissu n'est pas complet, ne permettant qu'un retour partiel au métabolisme aérobie et à la production d'ATP. L'ischémie persiste donc dans le tissu avec pour conséquence des phénomènes d'apoptose et de nécrose cellulaire. En effet, l'équipe de Weir a démontré que l'absence d'oxygène et de nutriments à travers l'îlot lésé, entraîne une perte progressive de la viabilité des cellules au centre des îlots aboutissant à la mort cellulaire [Vasir B.1998].

3 Particularités des lésions immédiates de la greffe non vascularisée d'îlots pancréatiques

Lors de la transplantation chez l'homme, les îlots, après obtention à partir du pancréas, sont injectés dans le réseau porte, ce type de greffe présente donc une nature particulière.

L'absence de vascularisation immédiate du tissu après transplantation entraine une inhibition des apports en nutriments et en oxygène aux îlots, ce qui conduit à la perte de cellules dans les premiers temps après greffe [Carlsson PO.2002] [Carlsson PO.1998]. Ainsi la survie et la fonctionnalité des îlots implantés dépend en grande partie de la réorganisation des néo-vaisseaux qui apportent l'oxygène et les nutriments necessaire à sa survie [Menger MD.2001]. Ce processus de revascularisation semble dépendant du caractère angiogénique des cellules endothéliales résidentes des îlots [Menger MD.2001], mais également de la néo vascularisation provenant du receveur [Vajkoczy P.1995]. Ainsi, une revascularisation rapide et optimale dans les 2 premieres semaines apres transplantation est vitale pour permettre une reprise de fonction optimale du greffon.

Il a été clairement mis en évidence la création d'embolies d'îlots dans la veine porte après injection du greffon. Ces embolies bloquent le flux sanguin et induisent une réaction inflammatoire locale, entraînant une perte fonctionnelle des îlots après transplantation dans le réseau porte [Gao Q.2012]. La transplantation d'îlots pancréatiques déclenche immédiatement une intense réaction inflammatoire non spécifique nomée IBMIR (Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction) [Nilsson B.2011]. Ce phénomène est en partie responsable de la destruction rapide de 50 % des îlots transplantés au moment de la greffe [Bennet W.1999], et participe également au rejet aigu [Han D.2004] et la réactivation de l'auto-immunité [Stegall MD.1996] [Group WHIT.2006].

L'IBMIR est un important phénomène thrombotique et inflammatoire qui se défini par la séquence suivante (Figure 5) :

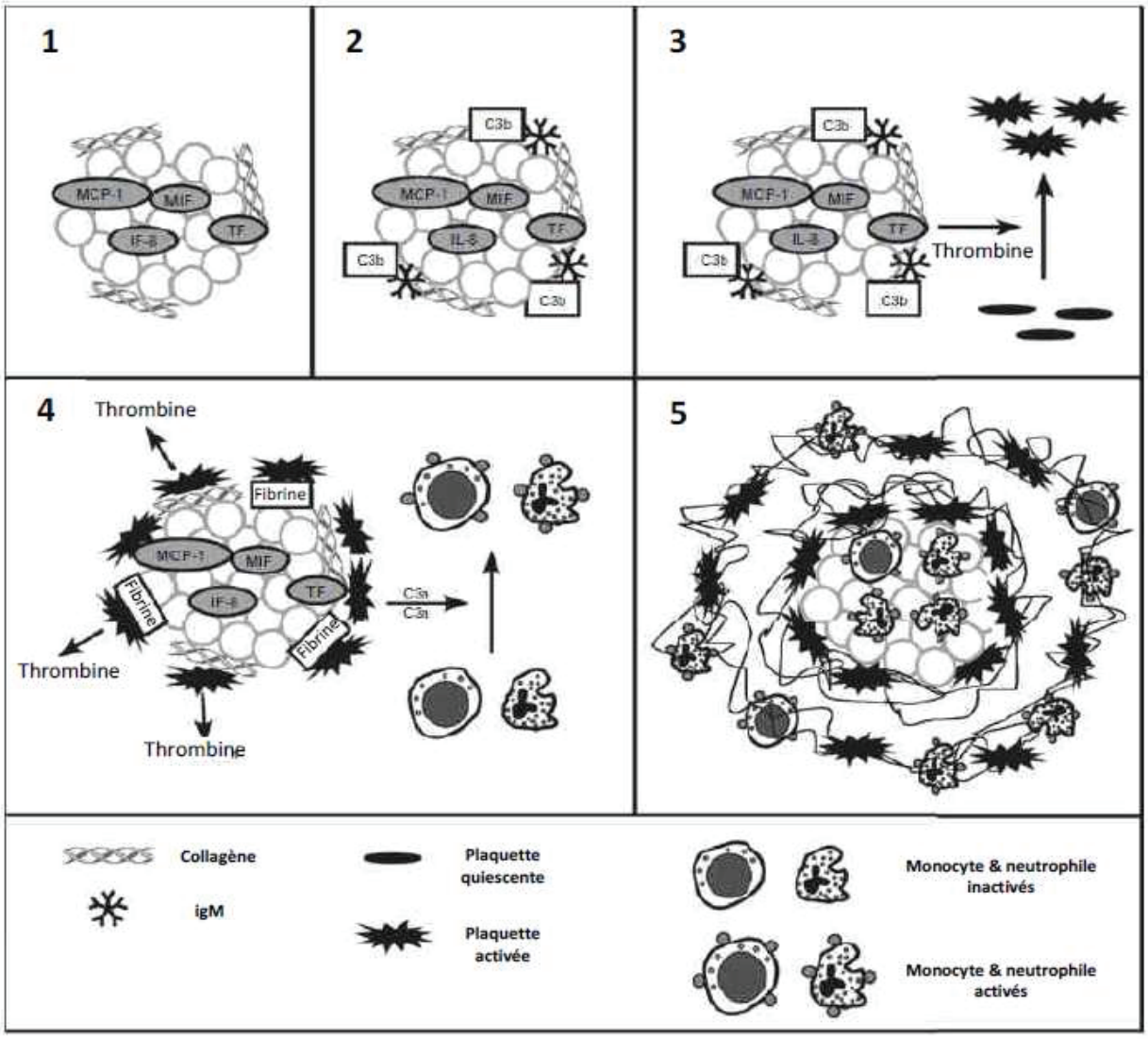


Figure 5 : Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction (IBMIR), selon le modèle développé par [Nilsson B.2011]

1 : Lorsque les îlots de Langerhans sont exposés au sang au moment de l'injection dans le système porte, 2 : des Immunoglobulines G et M peuvent se fixer à la surface des îlots et induire l'activation du complément et le dépôt de fragments C3 (C3b/iC3b). 3 : Le facteur tissulaire (TF) exprimé par les îlots induit l'activation de la coagulation. La thrombine (IIa) ainsi générée active les plaquettes et initie la formation de fibrine. 4 : L'activation des plaquettes augmente l'affinité des intégrines (GPIIb-IIa et α2β1) pour la fibrine et le collagène respectivement, et favorise la liaison des plaquettes activées à la surface des îlots. En outre, l'activation plaquettaire induit une activation du complément et conduit à la génération des anaphylatoxines C3a et C5a, qui recrutent et activent les monocytes et les granulocytes au voisinage des îlots. 5 : L'activation des plaquettes induit la libération de thrombine générant de la fibrine qui finit par former une capsule autour des îlots piégés par les plaquettes, les granulocytes et les monocytes. De plus les cellulles altérées par les lésions du processus d'obtention des îlots et par l'ischémie, vont également libérés des facteurs chimiotactiques, tels que l'IL-8 ou MCP-1. L'ensemble de ces signaux vont concourir à l'infiltration des monocytes et neutrophiles au sein des îlots dans l'heure après injection [Nilsson B.2011]. Figure issue de [Vivot K. 2012].

Les différentes étapes de l'IBMIR :

- Expression de facteurs procoagulants et génération de thrombine.

Il existe une véritable interaction entre l'inflammation et le système de la coagulation. La coagulation affecte considérablement la réponse inflammatoire. La thrombine peut activer des récepteurs cellulaires spécifiques (PARs ; Proteases Activated Receptors) sur les leucocytes ou les cellules endothéliales, conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires [Levi M.2004]. L'initiateur central de la génération de thrombine est le Tissue Factor (TF) exprimé par les cellules des îlots [Vivot K.2012]. TF est considéré comme un facteur clé dans le déclenchement d'IBMIR. Son implication est supportée par le fait que le blocage de l'activité de TF par des antagonistes peut abroger IBMIR *in vitro* [Moberg L.2002] [McCall M.2012]. En clinique, les résultats positifs de la transplantation d'îlots sont directement liés au taux d'expression de TF [Johansson H.2005]. Dans le cas de la transplantation intraportale d'îlots pancréatiques, d'autres molécules chargées négativement à la surface des îlots peuvent participer à l'activation de la coagulation [Bennet W.2000]. En effet suite aux lésions d'ischémie et d'isolement, les cellules apototiques expriment, à leurs surfaces, des phosphatidylsérines au carractère très pro-coagulant [Chiang ET.2009]. L'ajout de molécules anticoagulantes inhibitrices de la thrombine, telles que l'héparine ou le Melagatran, permet d'inhibiber la réaction IBMIR [Ozmen L.2002].

- Activation et fixation des plaquettes activées sur les ilots

La thrombine (IIa) générée active les plaquettes et initie la formation de fibrine. L'activation des plaquettes augmente l'affinité des intégrines GPIIb-IIa et α2ß1 pour la fibrine et le collagène respectivement, et favorise la liaison des plaquettes activées à la surface des îlots [Deible CR.1998].

- Création d'un réseau de fibrine

L'activation des plaquettes induit la libération de thrombine générant de la fibrine qui finit par former une capsule autour des îlots [Nilsson B.2011].

- Activation du système du complement

Le système du complément est une composante centrale de l'inflammation comprenant un réseau de protéines sériques et de surface cellulaire, dont les fonctions

participent notamment à l'élimination des cellules apoptotiques et la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. L'activation du système du complément est également provoquée par le processus de coagulation [Markiewski MM.2007]. La présence de niveaux significatifs d'immunoglobulines G et M, et des fractions du complément C4 et C3 à la surface des îlots suggère que l'activation du complément pourrait être médiée en partie par les immunoglobulines. Elle se produit via la voie classique du complément pour aboutir à la formation de complexe d'attaque membranaire [Tjernberg J.2008]. En effet, les auto-anticorps chez les patients diabétiques de type 1 peuvent se lier aux cellules ß des îlots et fixer le complément [Radillo O.1996]. Par conséquent, le rôle des anticorps circulants chez le receveur dans ce processus inflammatoire n'est pas exclu [Vivot K.2012].

Une des fonctions des plus importantes du système du complément est la génération des produits d'activation C3a, C4a et en particulier C5a qui sont de puissants anaphylatoxines, capables d'induire la migration des phagocytes. Au cours de l'IBMIR, l'activation plaquettaire induit une activation du complément et conduit à la génération des anaphylatoxines C3a et C5a, qui recrutent et activent les monocytes et les granulocytes au voisinage des îlots [Vivot K.2012].

- Activation, adhésion et infiltration des leucocytes

Durant la première heure suivant la transplantation d'îlots pancréatiques, l'ensemble de ces signaux IBMIR vont concourir à l'infiltration des monocytes et neutrophiles au sein des îlots [Nilsson B.2008] [Moberg L.2002] [McCall M.2012] [Nilsson B.2011]. En effet, les plaquettes activées surexpriment à leur surface la P-Selectine, qui est le récepteur primaire pour l'interaction avec les neutrophiles et des monocytes [Contreras JL.2004]. La thrombine stimule les récepteurs activés par les protéases (PAR1) qui sont présents à la surface des granulocytes et les monocytes, et leurs voies de signalisation conduisant à l'importante production de cytokines pro-inflammatoires [Coughlin SR.2000]. D'autre part, le TF, la fibrine et le fibrinogène ont aussi une action directe sur les macrophages (Szaba & Smiley, 2002). De plus, les cellules endothéliales portales activées produisent le facteur d'activation plaquettaire, qui est un facteur chimiotactique puissant des neutrophiles [Biancone L.2006]. Enfin, les produits d'activation du complément, C3a et C5a, sont de puissants chimio-attractants pour les neutrophiles et les macrophages [Bennet W.1999].

En outre, la procédure d'isolement et d'ischémie expose les îlots à une perturbation de l'intégrité cellulaire et à un stress inflammatoire générateurs de la production de DAMPs et

de facteurs chimiotactiques par les îlots, tels que le TNFa, l'IL-8 ou MCP-1 [Bennet W.1999]. Cette séquence est inductrice de l'activation des leucocytes résidents des îlots et des leucocytes du receveur qui vont générer des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, TNF-α). La production d'IL-1β et de TNF-α par ces cellules CPA activées, va entraîner la destruction et la perte de fonction des îlots. En effet, ces cytokines inflammatoires induisent la nécrose et l'apoptose des cellules de l'îlot, notamment par les voies de signalisation du TNF-α [Pileggi A.2001]. Ces cytokines jouent un rôle majeur, leur neutralisation favorise la survie et l'integrité des îlots [Giannoukakis N.1999] [Held W.1990] [Hunger RE.1997] [Farney AC.1993]. L'environnement TNF-α + IL-1β est capable d'initier la production d'espèces radicalaires dérivées du NO via l'activation de la NO synthase inductible (iNOS) [Narang AS.2006]. L'ensemble de ces effecteurs sont délétères pour la fonction et la survie des cellules β [Narang AS.2006]. L'émergence de cet environnement immuno-actif va favoriser le déclenchement de la réponse immunitaire ayant pour conséquence l'infiltration des cellules immunitaires du receveur au sein du greffon. Cet infiltrat leucocytaire est favorisé par l'expression des molécules d'adhésion, telle que ICAM-1, à la surface des cellules β [Kuttler B.2002]. Par conséquent, le recrutement des neutrophiles et des macrophages du receveur favorise le déclenchement et l'augmentation de la réponse immunitaire innée et adaptative.

Au cours de la procédure complète de transplantation des îlots, les réactions inflammatoires débutent donc dés la période d'isolement des îlots à partir du pancréas jusqu'aux premiers temps après greffe. Ainsi, le contrôle de l'inflammation dés la récupération des îlots jusqu'à leur implantation est cruciale pour limiter le stress inflammatoire de l'isolement et l'IBMIR, afin d'optimiser la survie et la fonctionnalité du greffon à court et long terme. Il est clairement établi que le phénomène IBMIR participe au rejet allogénique [Han D.2004] et/ou à la réactivation de l'auto-immunité [Worcester-Human-Islet-Transplantation-Group.2006].

4 Lésions d'I/R et aspects immunologiques

4.1 Impact des lésions d'I/R sur la réaction inflammatoire

Lors de la transplantation, vascularisées ou non vascularisées, les lésions d'ischémie indépendantes de l'alloantigène induisent une immunogénicité de l'organe conduisant à

l'activation des cellules du système immunitaire inné [Perico N.2004] [LaRosa DF.2007]. Les cellules altérées du greffon libèrent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires qui activent les leucocytes sanguins, et les orientent vers un phénotype effecteur. Un lien entre ces lésions et les dysfonctions du greffon est clairement établi [Eltzschig HK.2011].

Une partie de ces signaux pro-inflammatoires, que les cellules lésées vont relarguer, sont des molécules appartenant à la famille des DAMPs (Damages Associated Molecular Patterns) [Rao DA.2008]. Selon la théorie de P Matzinger, ces molécules vont déclencher un "signal danger" chez le receveur activant rapidement et fortement le système immunitaire inné, indépendamment de l'alloantigénicité [Gallucci S.2001]. Les DAMPs sont des ligands des Toll Like Receptors (TLR), récépteurs appartenant à la famille des PRR (Pattern Recognition Receptors) [Bianchi ME.2007] [Arumugam TV.2009]. L'activation des TLR induit une signalisation intracellulaire, en partie dépendante de la molécule MyD88 (un adaptateur de la signalisation de tous les TLR, sauf TLR3) et des MAPK. Ces DAMPs, tels que : certaines protéines de la matrice cellulaire, la protéine HMGB1 (high mobility group box 1) ou quelques protéines HSP (heat shock proteins), sont normalement séquestrés de façon intracellulaire. Lors d'un dommage tissulaire, ils peuvent être libérés dans le compartiment extracellulaire où ils sont à l'origine d'une activation du système immunitaire inné [Iyer SS.2009]. Des signaux DAMPs provenant de cellules mortes ou de lysats cellulaires sont capables d'induire la maturation des cellules dendritiques du receveur et du donneur (leucocytes passagers ou résidents au sein du greffon) [Gallucci S.1999]. L'heparan sulfate et ses métabolites, ligands endogènes des PRRs, induisent une maturation, des cellules dendritiques, dépendante de TLR4 [Johnson GB.2002]. La liaison de HMGB1 à son récepteur TLR4 à la surface des cellules dendritiques induit la migration et la maturation de ces cellules vers un profil pro-inflammatoire [Messmer D.2004] [Dumitriu IE.2005] [Yang D.2007] [Wu H.2010]. L'acide hyaluronique, fragment de la matrice extracellulaire, ligand des TLR, induit une réponse inflammatoire via l'activation des cellules dendritiques et des macrophages [Shirali AC.2008] [Tesar BM.2006]. La liaison de ces molécules solubles aux récepteurs TLR conduit à l'activation des voies de signalisation, incluant les voies des MAPK (mitogen-activated protein kinase) et du NF-κB, voies activant la production des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires [Chen GY.2010].

Le recepteur TLR4 joue un rôle essentiel dans le développement de la réponse immunitaire accentuant les lésions d'ischémie-reperfusion [Pulskens WP.2008] [Wu H.2007]. Dans un modèle murin d'I/R rénale, l'augmentation d'expression des transcrits

TLR4 et TLR2 a été constatée au niveau du tissu rénal [Leemans JC.2005]. Des souris comportant une délétion du gène codant pour TLR4 sont protégées de l'ischémie rénale. Les expériences ciblant le rôle de TLR4 "donneur" versus TLR4 "receveur" ont suggéré que la signalisation intrinsèque rénale "donneur" de TLR4 joue le rôle le plus prépondérant dans la médiation des lésions d'I/R [Wu H.2007]. L'étude clinique de Kruger en 2009 a révélé le rôle néfaste de la signalisation TLR4 dans la perte précoce du greffon rénal [Kruger B.2009]. Ces travaux sont supportés par l'augmentation des ligands endogènes de TLR4 que sont HMGB1 et le biglycan, observée suite à l'I/R [Kruger B.2009]. Il est clairement établi dans la littérature que l'activation de TLR4 induit l'expression de cytokines pro inflammatoires telles que IL-1β, TNF-α (Tumor Necrosis Factor–1) et MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1). Quant à l'expression de TLR2, elle peut être induite sur l'épithélium rénal par l'hypoxie [Kuhlicke J.2007] ou l'inflammation [Wolfs TG.2002]. La voie de signalisation de TLR2 rénale contribue aux lésions rénales aigues et à l'inflammation durant l'ischémie et la reperfusion [Leemans JC.2005]. Dans le foie, le développement des lésions d'I/R implique l'activation du récepteur TLR4, activation dépendante de IRF-3 et indépendante de MyD88 [Zhai Y.2004]. L'équipe de Peng a observé une augmentation de l'expression des transcrits de TLR4, de même qu'une production de TNF-α, dans les cellules de Küpffer après une séquence d'I/R, production inhibée par les anticorps anti-TLR4 [Peng Y.2004]. L'implication de la signalisation HMGB1/TLR4 pourrait jouer un rôle non négligeable dans les dysfonctions précoces du greffon d'îlots pancréatiques [Gao Q.2010]. La liaison de HMGB1 à TLR4 ou TLR2 présents à la surface des îlots pancréatiques murins induit l'activation de NF-kB : médiateur pro-inflammatoire et initiateur de la dysfonction précoce du greffon [Kruger B.2010].

Les cellules activées par les lésions d'Ischémie vont également libérer des cytokines pro-inflammatoires (comme le TNF-α) ainsi que des chimiokines CC (tel que CCL2 = MCP-1), et des chimiokines CXC (tels que CXCL2 = MIP-2a, CXCL8 = IL-8) attirant par chimiotactisme les cellules du système immunitaire du receveur. La contribution de ces CXC chimiokines dans les lésions tissulaires est soutenue par des données montrant que le traitement par des anticorps dirigés contre CXCL1, CXCL2 (MIP-2a : macrophage inflammatory protein 2), CXCL5 et CXCL8 (IL-8), diminue l'infiltration des neutrophiles et les lésions inflammatoires après une ischémie/reperfusion expérimentale ou une transplantation [Miura M.2001] [Chandrasekar B.2001] [Sekido N.1993]. La sécrétion de l'interleukine-8 (CXCL8) a été rapportée dans la transplantation rénale et pulmonaire

humaine [De Perrot M.2002] [Hoffmann SC.2002], ainsi que suite à une ischémie-reperfusion du poumon de lapin [Sekido N.1993] et de cœur de chien [Kukielka GL.1995]. L'induction immédiate et la sécrétion des chimiokines CXC est détectable 1h après transplantation, entraînant l'initiation de l'infiltration des leucocytes [Miura M.2001] [Chandrasekar B.2001].Une deuxième phase de l'expression des chimiokines, qui implique CCL2 (MCP-1), débute environ 3 heures après la transplantation. Elle contribue à l'infiltration des neutrophiles et initie le recrutement des monocytes, des cellules NK (Natural killer) et des lymphocytes T [DeVries ME.2003]. D'autres molécules chimio-attractantes, comme le C5a, élément de la cascade de complément, contribuent également à l'infiltration des neutrophiles et aux lésions tissulaires d'I/R.

De plus dans le cas des transplantations vascularisées, les lésions de l'endothélium et la surexpression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, vont favoriser l'adhésion des leucocytes attirés par chimotactisme. L'aboutissement est le recrutement sur le site lésionnel de cellules immunitaires telles que les polynucléaires neutrophiles et les monocytes. Après le "rolling" initial des leucocytes sur l'endothélium activé, leurs récepteurs intégrines β1 et β2 interagissent avec les molécules d'adhésions sur les cellules endothéliales (ICAM1 = intercellular adhesion molécule 1, et VCAM1 = vascular cell adhesion molécule 1). Ces liaisons provoquent l'immobilisation les leucocytes sur l'endothélium et leur diapédèse à travers la paroi du vaisseau. Plusieurs études sur le foie, les îlots pancréatiques, le pancréas, le myocarde et le rein ont montré que la protéine ICAM-1 est surexprimée à la surface des cellules ayant subi les lésions d'I/R. Ces mêmes travaux ont montré que les anticorps dirigés contre ICAM-1 réduisent les dommages tissulaires et protègent le greffon [Kelly KJ.1994], permettant, en clinique, une meilleure reprise de fonction des greffons [Haug CE.1993]. L'équipe de Nicolls a montré que l'inhibition de l'adhésion des leucocytes sur ICAM-1, en utilisant des anticorps dirigés contre son ligand leucocytaire LFA-1 (100µg/jour durant 6 jours), permet de réduire significativement le nombre d'épisodes de rejet aigu des allogreffes d'îlots pancréatiques chez la souris [Nicolls MR.2000]. Les travaux de Zeng ont montré que le prétraitement *in vitro* des îlots pancréatiques avec des anticorps anti ICAM-1 prolonge la survie d'une xénogreffe chez la souris accompagné d'une importante diminution de l'infiltration lymphocytaire [Zeng Y.1994].

Dans le cas des greffes non vascularisées, ce phénomène est également présent, en effet certaines cellules ou tissus expriment les molecules ICAM-1 à leurs surfaces après un stress, tel que les îlots pancréatiques et les cellules épitheliales.

L'activation et l'infiltration des neutrophiles et des monocytes/macrophages vont aboutir à la dégradation tissulaire, notament via la génération de ROS. La myéloperoxidase de ces cellules phogocytaires activées interagit avec le peroxyde d'hydrogène pour oxyder les ions chlorites en ion acide hypochlorite possédant un fort pouvoir oxydant. De plus, la production massive de monoxyde d'azote, via la NO synthase inductible (iNOS) leucocytaire, génère du peroxynitrite et le radical hydroxyle. A cela il faut ajouter que les leucocytes recrutés, qui vont se lier aux molécules d'adhésions, génèrent des enzymes protéolytiques et libèrent des cytokines cytotoxiques additionnelles, telles que TNF-α, IL-1β.

Le résultat final de ce complexe (interagissant réciproquement sur les espèces oxygénées radicalaires, les chimiokines, les cytokines, les molécules d'adhésion et les leucocytes) est un puissant processus inflammatoire conduisant à l'augmentation des lésions tissulaires (Figure 6). Au niveau du greffon, l'infiltrat des cellules immunitaires va contribuer à la formation des lésions soit par action cellulaire directe soit à travers la production de molécules pro-inflammatoires. Ces cellules vont également aider à déclencher, amplifier et maintenir la réponse immunitaire T adaptative. L'ensemble de ce processus immunologique provoquera ainsi le rejet d'allogreffe.

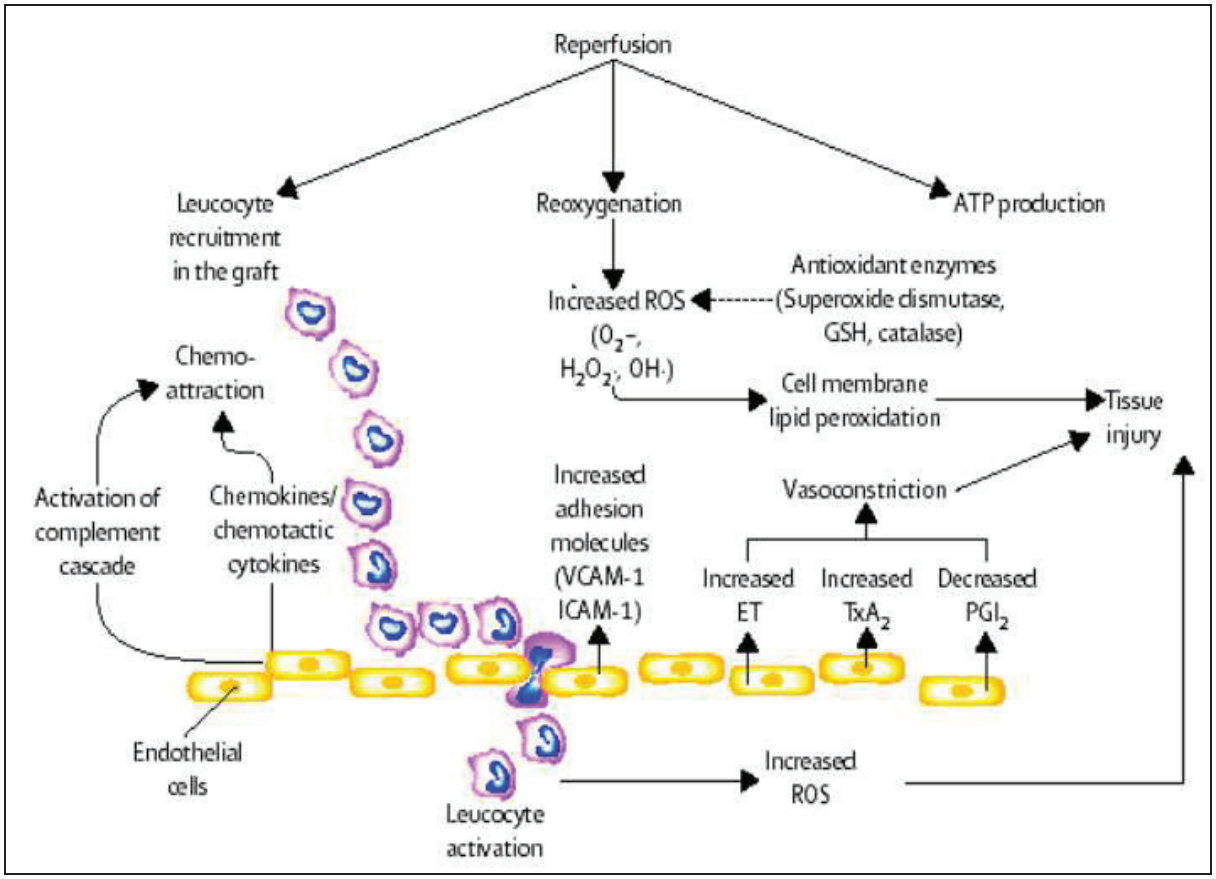


Figure 6 : Schéma représentant les mécanismes moléculaires déclenchés au moment de la reperfusion [Perico N.2004].

4.2 Rejet d'allogreffe

Le rejet d'allogreffe désigne l'ensemble des mécanismes pathogéniques qui aboutissent au dysfonctionnement du transplant. L'évolution dans le temps des diverses réactions de rejet d'une greffe dépend du type de tissu ou d'organe greffé et de la réponse immunitaire impliquée. La cinétique et l'intensité du rejet de greffe est clairement influencée par les lésions d'I/R.

4.2.1 Rejet aigu

Les réactions du rejet aigu commencent habituellement au cours de la première semaine suivant la transplantation [Roitt IM.1997]. Ce rejet traduit un conflit entre le système immunitaire du receveur et le transplant. Le rejet aigu du greffon est induit essentiellement par une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre les alloantigènes (antigènes majeurs ou mineurs d'histocompatibilité) exprimés à la surface des cellules du greffon. Les

lymphocytes cytotoxiques ou producteurs de cytokines jouent un rôle central dans ce type de rejet [Colombani J.1993] [Chatenoud L.1993] [Chatenoud L.1996]. Même si le rejet aigu à médiation humorale est à l'origine de lésions importantes, les anticorps jouent un rôle secondaire au cours du rejet aigu [Colombani J.1993] [Chatenoud L.1993]. Ainsi, les mécanismes du rejet aigu sont cellulaires dans les 10 premiers jours après transplantation, puis deviennent ensuite cellulaires et humoraux [Colombani J.1993] [Roitt IM.1997] [Roitt IM.2001].

Le processus de rejet aigu du greffon peut être divisé en deux étapes :

- une phase de sensibilisation, dans laquelle les lymphocytes alloréactifs du receveur prolifèrent en réponse aux alloantigènes du greffon

- une étape effectrice, dans laquelle s'instaure la destruction immunitaire du greffon.

Phase de sensibilisation

Au cours de la phase de sensibilisation, les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ reconnaissent les peptides alloantigèniques présentés par les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), par l'intermédiaire de leur TCR (T Cell Receptor), s'activent puis prolifèrent. Le greffon allogénique présente avec le receveur des différences antigéniques histo-incompatibles, induisant une réponse immunitaire alloréactive conduisant au rejet du transplant. Les divers antigènes qui déterminent l'histocompatibilité, responsables de la plupart des réactions violentes de rejet d'allogreffes, sont localisés dans le CMH. Au moment de la transplantation, il existe une surexpression des molécules CMH et des molécules de costimulation liée aux lésions d'I/R, induisant une augmentation de l'immunogénicité de greffon.

Dans le cas de la greffe vascularisée de rein, la séquence ischémique est responsable d'une surexpression des molécules du CMH de classe I et II [Bidmon B.2012]. Cette augmentation d'expression des molécules de classe II se situe au niveau des cellules endothéliales et interstitielles du greffon rénal, et au niveau des cellules tubulaires rénales pour les molécules du CMH de classe I [Shoskes DA.1996] [Penfield JG.1999] [Rodriguez-Iturbe B.2001]. Cette surexpression du CMH de classe II est aussi observée durant les premiers jours post greffe au sein du greffon rénal [Hauet T.2002] [Faure JP.2002] et du greffon pulmonaire [Waddell TK.1996]. Cette augmentation de l'immunogénicité est aussi constatée à la surface des îlots de Langerhans isolés du pancréas en vue d'une transplantation [Barrou B.1997].

Dans le cas de la grefe non vascularisée d'îlots pancréatiques, cette importante immunogénicité peut être caractérisée par analyse de l'alloréactivité après une coculture d'îlots + splénocytes (ou MLIC) [Stock PG.1988] [Giraud S.2007] [Scott MD.2004] [Lee DY.2004] [Jang JY.2004]. Cette alloréactivité est dépendante des voies d'alloreconnaissances directes (CMH de classe I du donneur, reconnu par les lymphocytes T CD8 du receveur) et indirectes (peptides, provenant du greffon, endocytés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) du receveur puis présentés aux lymphocytes T du receveur) [Stock PG.1991].

Alloreconnaissance

La structure du récepteur TCR des Lymphocytes T permet son interaction avec des peptides antigéniques associés aux molécules du CMH. La restriction de la reconnaissance de l'antigène par le CMH est établie par la sélection négative puis positive des lymphocytes T au cours de la différenciation intrathymique [Revillard JP.1995] [Roitt IM.1997]. Le TCR est donc spécifique de l'ensemble CMH + peptide. L'activation du lymphocyte T se produit lorsque les peptides, présentés par les molécules du CMH, sont reconnus comme "non soi" par le TCR [Revillard JP.1995] [Roitt IM.1997]. Le TCR est couplé à un complexe de transduction du signal, le complexe CD3. L'interaction entre la molécule CD4 localisée sur la membrane cellulaire des lymphocytes T $CD4^+CD8^-$ et le domaine extracellulaire β2 de la molécule de classe II du CMH permet aux lymphocytes T $CD4^+$ d'interagir avec les CPA [Revillard JP.1995] [Roitt IM.1997]. De même, l'interaction entre la molécule CD8 et le domaine extracellulaire α3 de la molécule de classe I du CMH permet aux lymphocytes T $CD8^+$ de reconnaître les antigènes de classe I du CMH [Revillard JP.1995] [Roitt IM.1997]. Des signaux de costimulation sont cependant nécessaires, ils sont produits par l'interaction entre des molécules portées par les CPA et les molécules exprimées à la surface des lymphocytes T. Ces interactions sont les liaisons CD86-CD28, CD80-CD28, CD40-CD154, ou CD80/86-CTLA4 (ce dernier est un signal de costimulation négative). Les signaux activateurs permettent l'entrée du lymphocyte dans un nouveau cycle cellulaire entraînant la sécrétion d'IL-2 (hormone autocrine et paracrine). La fixation de l'IL-2 à son récepteur CD25 induit la synthèse d'ADN et l'entrée en mitose. Ceci aboutit à l'activation, la transformation et l'expansion clonale des lymphocytes T alloréactifs [Revillard JP.1995].

La réponse aux antigènes majeurs d'histocompatibilité implique la reconnaissance des molécules du CMH du donneur et d'un peptide associé dans la cavité du CMH. Les peptides présents dans la cavité des molécules allogéniques de classe I du CMH dérivent des protéines

synthétisées au sein de la cellule allogénique. Les peptides présents dans la cavité des molécules allogéniques de classe II du CMH sont généralement des protéines captées et apprêtées par la voie endocytaire de la cellule allogénique présentatrice d'antigène [Revillard JP.1995].

Présentation directe

Dans certaines transplantations d'organes ou de tissu, comme le rein, le pancréas ou les îlots pancréatiques, il existe une population de CPA du donneur, appelée leucocytes passagers, qui migrent du greffon vers les ganglions lymphatiques régionaux du receveur. Selon les tissus, différentes populations de cellules au sein d'un greffon peuvent fonctionner comme CPA. Etant donné que les cellules dendritiques interstitielles sont présentes dans la plupart des tissus et qu'elles expriment des taux élevés de molécules de CMH de classe II et de classe I, elles représentent les principales CPA des tissus [Roitt IM.1997] [Homberg JC.1999]. D'autres cellules exprimant les molécules de classe I et II du CMH, peuvent jouer le rôle de CPA, comme les cellules endothéliales qui bordent les vaisseaux sanguins.

Lors d'une transplantation, des cellules dendritiques du donneur peuvent migrer vers les organes lymphoïdes du receveur. Celles-ci ne sont plus immatures car activées par les traumatismes mécaniques, thermiques, oxydatifs liés à la séquence d'I/R. Pendant cette migration les cellules dendritiques perdent leur capacité de phagocyter mais acquièrent des capacités de présentation en exprimant à leur surface, d'une part, une grande quantité de molécules de classe II du CMH, et d'autre part, des molécules de costimulation et des molécules d'adhésion. Les cellules dendritiques matures ayant migré peuvent activer des lymphocytes T au niveau des zones T dépendantes des organes lymphoïdes secondaires du receveur (Figure 7). Cette présentation directe (Figure 8) des alloantigènes par les cellules dendritiques du donneur se déroule au cours des premiers jours après la transplantation. Cette présentation directe représente 90 à 95% de l'intensité de la réaction allogénique. Elle explique la fréquence des épisodes de rejet aigu cellulaire durant les premières semaines après la transplantation.

Présentation indirecte

Les leucocytes de l'hôte, capablent de phagocyter, peuvent migrer dans le greffon et effectuer l'endocytose d'alloantigènes du donneur. Après migration et activation, les CPA du receveur présentent, par l'intermédiaire de leurs molécules du CMH, les peptides issus des protéines du donneur aux lymphocytes T du receveur [Roitt IM.1997] [Roitt IM.2001]. C'est

la présentation indirecte (Figure 8) qui, progressivement, remplace la présentation directe. Elle serait peut être responsable de rejets aigus mais elle est surtout suggérée comme étant le grand mécanisme supposé du rejet chronique. Les lymphocytes T CD4 activés par voie indirecte vont activer les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes B (entraînant la formation d'anticorps anti alloantigènes), les monocytes et les macrophages.

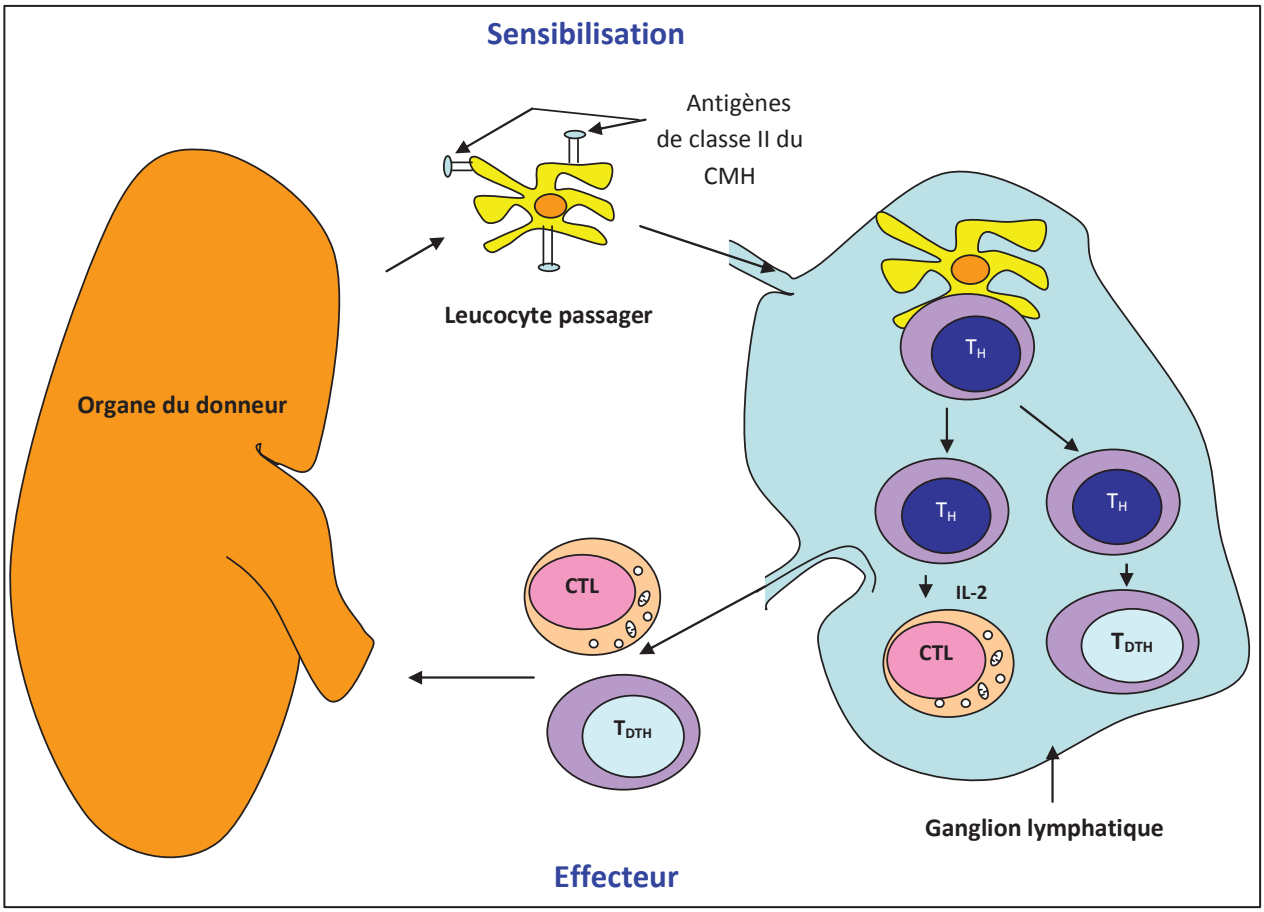


Figure 7 : Présentation directe par les leucocytes passagers.

"La migration des leucocytes passagers du donneur vers les ganglions lymphatiques du receveur se traduit par l'activation des cellules T Helper (T_H) en réponse aux différents antigènes de classe II du CMH exprimés sur les leucocytes passagers. Ces cellules T_H activées induisent ensuite la création de cellules T_{DTH} et/ou de CTL (Lymphocytes T cytotoxiques), qui sont tous deux médiateurs du rejet de greffon. (T_{DTH} = Lymphocytes T impliqués dans le développement de l'hypersensibilité retardée, DTH = "delayed-type hypersensitivity"). Figure reproduite de "Immunologie, le cours de Janis Kuby. Editions Dunod 2001" [Goldsby RA.2001].

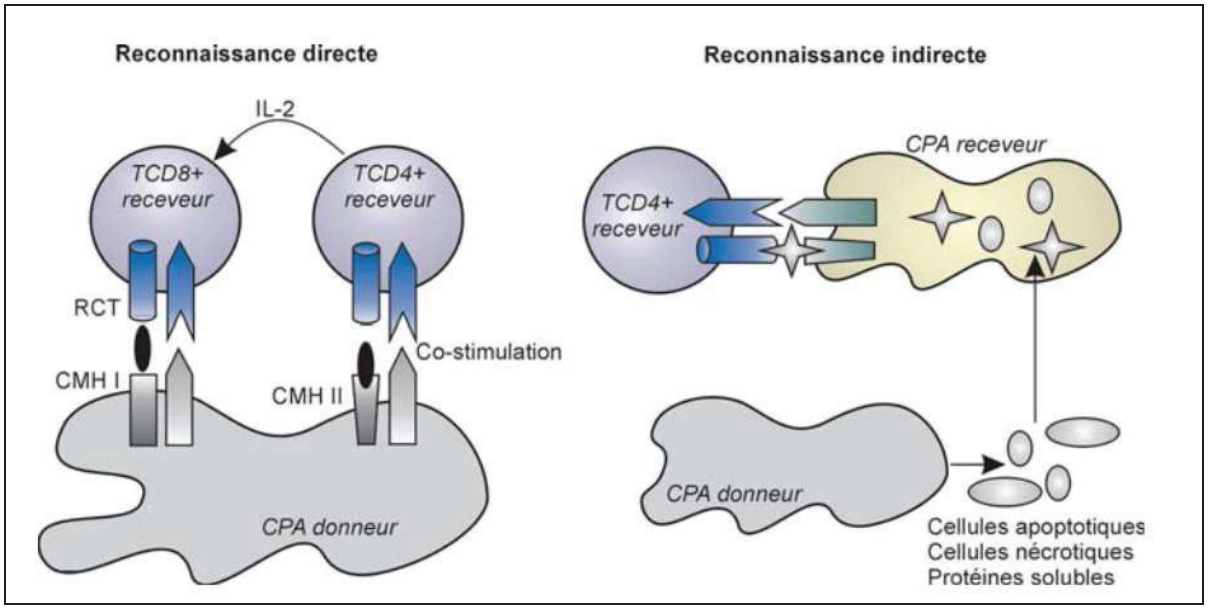


Figure 8 : Voies de reconnaissance des alloantigènes par les lymphocytes T [Golshayan D.2007].

"Reconnaissance allogénique directe : les cellules T du receveur reconnaissent les complexes CMH allogénique-peptides présentés par les CPA du donneur. Les cellules T du receveur pourraient aussi reconnaître la structure du CMH allogénique en l'absence de peptide. Reconnaissance allogénique indirecte : les allo-antigènes provenant de la dégradation des cellules allogéniques sont endocytés par les CPA du receveur puis apprêtés et présentés aux cellules T en tant que peptides allogéniques associés aux molécules du CMH de classe II du receveur. (CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; CPA : cellule présentatrice de l'antigène ; RCT : récepteur de cellule T ; T CD8$^+$ et T CD4$^+$: lymphocytes T CD8$^+$ et T CD4$^+$). Figure reproduite de "Golshayan et al. Transpl Int 2007 [Golshayan D.2007].

Rôle des lymphocytes T Helper (T_H)

La reconnaissance des alloantigènes via le TCR induit une vigoureuse prolifération des cellules T de l'hôte. La principale cellule prolifératrice est la cellule T CD4$^+$ qui reconnaît les molécules de classe II du CMH du donneur. Cette population semble jouer un rôle central dans l'induction des divers mécanismes effecteurs du rejet d'allogreffe [Roitt.1997]. Quelle que soit la voie d'activation (directe ou indirecte), les lymphocytes T CD4$^+$ activés sont à l'origine de la prolifération et de la différenciation des autres cellules engagées dans la réaction de rejet [Roitt IM.1997] [Roitt IM.2001]. Ainsi, en répondant aux antigènes par la synthèse de cytokines dont l'IL-2 et par leur prolifération, les lymphocytes T CD4$^+$ aident les

lymphocytes T $CD8^+$ et les lymphocytes B, activés par la reconnaissance de l'alloantigène, à proliférer et à se différencier.

Une fois sensibilisés, les lymphocytes du receveur migrent vers le greffon et l'infiltrent. Seule une minorité des cellules qui infiltrent le greffon sont spécifiques des alloantigènes du donneur. La grande majorité des cellules de l'infiltrat sont, en fait, le reflet des mécanismes d'amplification de la réaction inflammatoire.

Toute une série de mécanismes effecteurs participe au rejet d'une allogreffe. Les plus habituelles sont les réactions à médiation cellulaire impliquant une hypersensibilité retardée (DTH = "delayed-type hypersensitivity") et une cytotoxicité médiée par les Lymphocytes T cytotoxiques (CTL) essentiellement $CD8^+$. La marque du rejet d'une allogreffe impliquant des réactions à médiation cellulaire est un influx de cellules T et de macrophages dans le greffon. La reconnaissance des alloantigènes de classe I du CMH par les cellules $CD8^+$ de l'hôte peut conduire à la mort cellulaire médiée par les CTL. Dans certains cas, le rejet du greffon est médié par les cellules T $CD4^+$ qui fonctionnent comme des cellules cytotoxiques restreintes à la classe II du CMH.

Dans chacun de ces mécanismes effecteurs, les cytokines sécrétées par les cellules T_H (T Helper) jouent un rôle central. L'IL-2, l'IFN-γ et le TNF-α sont tous les trois d'importants médiateurs du rejet du greffon. L'IL-2 joue un rôle majeur en favorisant la prolifération des cellules T et la communication entre les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ aboutissant à la création des CTL effecteurs. L'IFN-γ est essentiel dans le développement d'une réponse d'hypersensibilité retardée (DTH), dans la migration et l'activation des macrophages dans le greffon. Le TNF-α a un effet cytotoxique direct sur les cellules du greffon (Figure 9). De nombreuses cytokines favorisent le rejet du greffon via leur effet sur l'augmentation d'expression de molécules du CMH à la surface des cellules du greffon [Roitt IM.1997] [Roitt IM.2001]. Le TNF-α et les interférons (α, β et γ) induisent une expression des molécules de classe I du CMH, et l'IFN-γ induit l'expression des CMH de classe II.

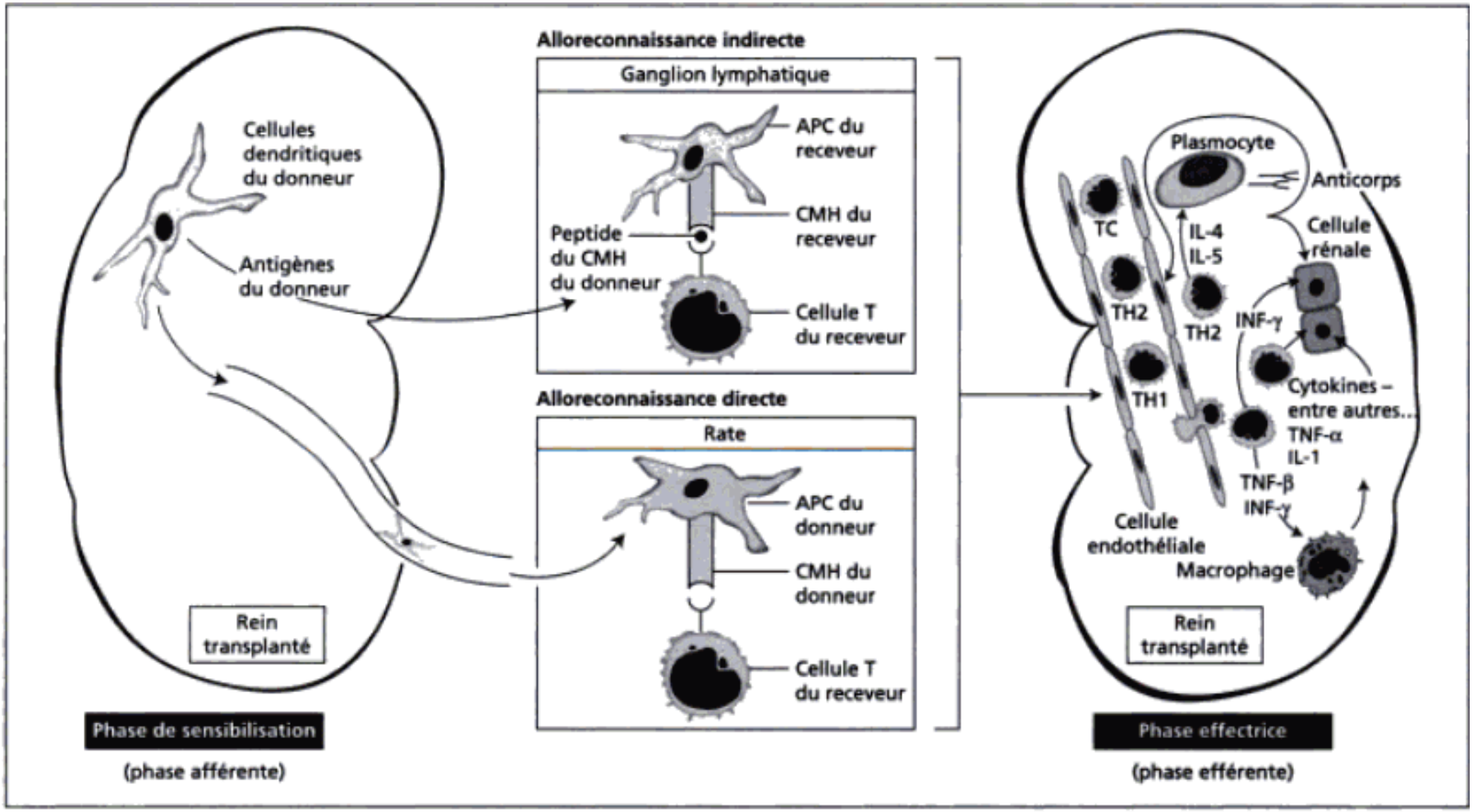


Figure 9 : Schéma récapitulatif de l'immunopathologie du rejet de greffe, exemple de la greffe rénale. Figure issue de [Chapel H.2004].

4.2.2 Rejet chronique

Alors que des avancées importantes ont été réalisées dans le cadre des thérapies immunosuppressives permettant des réductions importantes de la survenue de rejet aigu et une amélioration de la survie du greffon à un an, la survie du greffon à plus long terme n'a que peu progressée [Inserm.2009]. Les réactions du rejet chronique peuvent apparaître des mois ou des années après la transplantation. Ce rejet est caractérisé par une détérioration lente, progressive et irréversible des fonctions du greffon. Les lésions au niveau du transplant résultent de mécanismes cellulaires (inflammation, cytokines, lymphocytes T cytotoxiques, cellules NK, macrophages) et humoraux (anticorps et lyse dépendants du complément). Cependant, les mécanismes du rejet chronique ne sont pas encore parfaitement élucidés.

En transplantation rénale, les facteurs principaux influençant la dysfonction chronique du greffon sont l'inflammation, les réactions immunitaires adapatives, le développement de la transition épithélio-mesenchymateuse, la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire. Au cours des différentes agressions immunologiques et non immunologiques, les cellules du greffon vont être responsables du développement d'une matrice extracellulaire. La différenciation de cellules en myofibroblastes et leur expansion impliquent différents facteurs de croissance incluant notamment le TGF-β, le CTGF, l'angiotensine II, le MCP-1 et le TNF-α. Ces différents facteurs pourraient participer à des degrés divers à l'initiation de la transition épithélio-mesenchymateuse, à l'expansion des cellules myofibroblastiques et à leur migration [Border WA.1994] [el-Agroudy AE.2003] [Coupes BM.1994] [Baczkowska T.2005] [Roos-van Groningen MC.2006] (Figure 10). La matrice extracellulaire accumulée constitue une irréversible lésion de fibrose, qui va s'amplifier, réduisant ainsi la masse fonctionnelle du greffon. Ce développement de fibrose, constituant une des causes de la perte de fonction du greffon à moyen et long terme, est également observé en transplantation hépatique [Alcolado R.1997] et en transplantation cellulaire [Banovic T.2005].

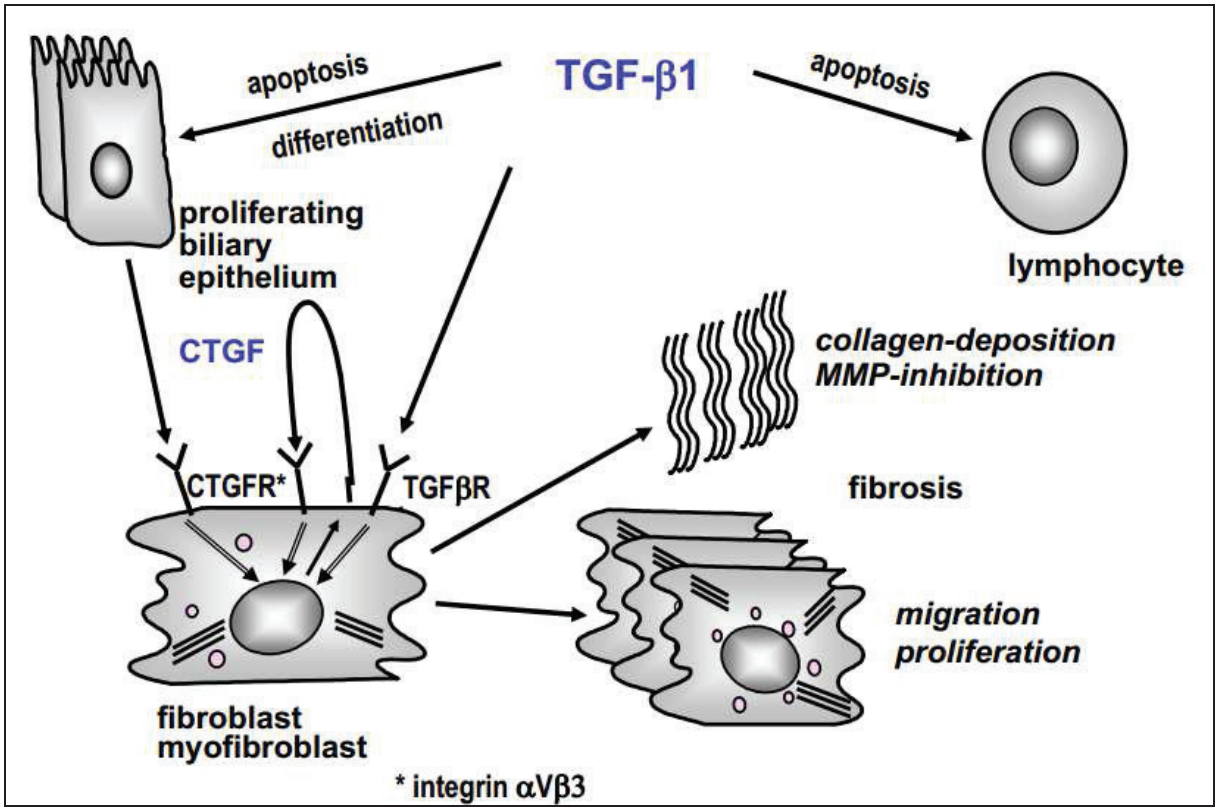


Figure 10 : Rôle du TGF-β dans le développement de la fibrose au sein du greffon rénal. *Figure issue de [http://spiral.univ-lyon1.fr/files_m/M6576/WEB/02-praticien_des_formation_continue/01-immunologie/01-immunologie-de-la-transplantation/rejet_chronique_dysfonction_chronique_greffon.pdf]*

4.3 Impact des lésions d'I/R sur l'autoréactivité

La séquence d'I/R induit une réaction immunitaire dirigée contre l'allogreffon, cependant certains travaux montrent l'existence d'une réaction autoimmune naissante au cours du rejet chronique de l'allogreffe [Win TS.2009]. En effet de récents travaux ont montré une production d'anticorps dirigés contre le système HLA autologue au cours du syndrome de vasculopathy chronique d'une allogreffe cardiaque [Nath DS.2010]. Il semblerait que l'apparition de ces autoanticorps fait suite au déclenchement de la reponse immunitaire humorale anti alloantigènes [Win TS.2009] [Nath DS.2010]. Ces données sont concordantes avec l'observation d'une appartition d'une réponse immunitaire adaptative dirigée contre le greffon dans des conditions d'autotransplantations expérimentales [Hauet T.2002] [Faure JP.2002]. Ces données suggèrent que l'I/R perturbe la tolérance au soi.

ETUDES DANS LA GREFFE D'ILOTS PANCREATIQUES

1 Choix du modèle

La séquence d'I/R, qui définie en partie le processus de transplantation, peut être modélisé expérimentalement selon différentes façons, classées ici selon leur ordre de pertinence pour la transplantation :

- Par un modèle *in vitro* mimant la séquence d'I/R, c'est-à-dire par une culture de cellule en normoxie, puis en hypoxie, puis un retour à la normoxie (et ceci avec modélisation si possible de la tempértaure et de la perfusion du milieu de culture).

- Par le prélevement d'un organe ou tissu, conservé de façon extracorporelle puis reperfusé *ex vivo* sur un banc de perfusion avec du sang ou un milieu dédié (organe isolé perfusé).

- *In vivo*, par un arrêt puis un retour en apport sanguin par clampage puis déclampage de l'artère afférente à un organe ou un tissu (sans conservation extracorporelle de l'organe).

- *In vivo*, par un organe prélevé chez un animal, explanté, conservé puis transplanté chez ce même animal (autotransplantation) ou chez un animal allogénique (allotransplantation), ou chez une autre éspèce animale (xenotransplantation)

- Pour ce travail de thèse nous avons choisi d'utiliser un modèle murin d'isolement et de transplantation d'îlots de Langerhans afin de limiter les lésions "d'ischémie/reperfusion" répondant à 2 objectifs :

- préserver l'intégrité du greffon et réduire l'immunogénicité de celui-ci

- évaluer une stratégie d'induction de tolérance immunitaire à une allogreffe (dans un modèle murin transgénique de déplétion transitoire des lymphocytes T activés (gène suicide TK + GCV)

2 La transplantation d'îlots pancréatiques comme thérapie du diabète

Le diabète est une maladie métabolique qui se définit par une hyperglycémie. On "déclare" généralement le diabète lorsque l'on constate, à deux reprises, une glycémie à jeun

supérieure ou égale à 1,40 g/L. Chez l'homme, la normoglycémie se situe entre 0,80 et 1,10 g/L à jeun.

Le diabète affecte plus de 14 millions de personnes en Europe. L'accroissement de sa fréquence concerne les deux grandes catégories de diabète, à savoir le diabète de type I et le diabète de type II.

- le diabète de type I, ou diabète insulinodépendant (DID), d'origine auto-immune, représente environ 15 % des diabétiques. Il survient le plus souvent avant l'âge adulte. Il se traduit par un défaut de sécrétion d'insuline. L'insuline est une hormone hypoglycémiante, favorisant l'entrée du glucose dans les tissus [Grimaldi A.1998].
- le diabète de type II, ou diabète non insulinodépendant (DNID), représente 85% des diabétiques. Il survient le plus souvent après 50 ans [Grimaldi A.1998]. Il est dû à une diminution de la production d'insuline par le pancréas à laquelle s'ajoute souvent une mauvaise utilisation de cette hormone par l'organisme.

L'insuline est sécrétée par les îlots de Langerhans qui constitue la partie endocrine du pancréas, représentant seulement 2% de l'organe. C'est cette partie qui est atteinte par le diabète, la partie exocrine reste fonctionnelle, elle représente 98% du pancréas.

4.1 Morphologie du pancréas

Chez l'homme le pancréas est un organe situé profondément dans l'abdomen, derrière l'estomac, devant et au-dessus des reins. Il est formé d'une tête enchâssée dans le duodénum, d'un corps et d'une queue. A contrario, chez la souris comme chez le rat, le pancréas est très diffus (étalé dans l'abdomen).

Le pancréas est une glande volumineuse à tissu exocrine et endocrine. Le pancréas exocrine est une glande acineuse, à l'intérieur de laquelle sont dispersées les formations glandulaires endocrines nommées "îlots de Langerhans". Le parenchyme glandulaire est divisé en lobules par de fines travées conjonctives issues de la capsule de l'organe ; ils contiennent des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des nerfs. La queue du pancréas, située derrière l'estomac, au contact de la rate, est celle qui possède la densité la plus élevée d'îlots pancréatiques.

La fonction endocrine du pancréas est principalement la sécrétion d'hormones régulant la glycémie, qui sont véhiculées par le sang. La fonction exocrine du pancréas est

principalement la sécrétion d'enzymes pancréatiques qui s'écoulent dans le canal pancréatique (canal de Wirsung) pour rejoint le canal cholédoque en provenance du foie pour ensuite se déverser dans le duodénum (

Figure **11**). La quantité quotidienne de suc pancréatique sécrétée chez l'homme oscille entre 1000 et 3000 ml, soit environ 20 ml par kg. Cette fonction n'est pas atteinte au cours du diabète.

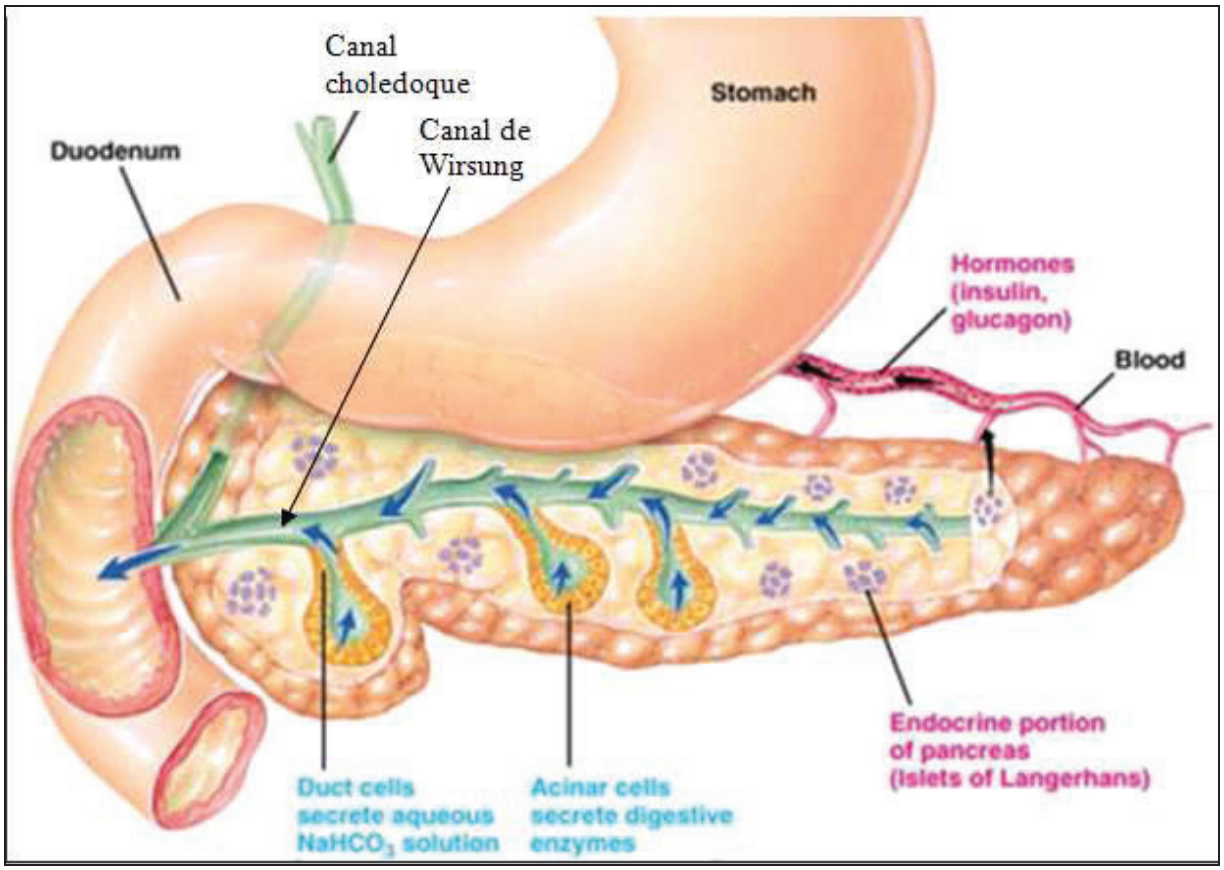


Figure 11 : anatomie du pancréas humain, figure modifié de [http://www.olivelab.org/the-pancreas-overview.html]

Les îlots de Langerhans

Les îlots de Langerhans constituent environ 2% de la masse totale du pancréas. Ces îlots pancréatiques sont des amas d'environ 1000 à 2000 cellules endocrines, disséminés au sein des lobules acineux. Ils sont caractérisés par une vascularisation propre. La partie endocrine, qui nous intéresse, est constituée de différentes cellules ayant des rôles distincts :

- les cellules β productrices de l'insuline : peptide hypoglycémiant.
- les cellules α productrices de glucagon : peptide hyperglycémiant.
- les cellules γ productrices de la somatostatine ayant un effet inhibiteur sur le glucagon et l'insuline.

- les cellules PP productrices de polypeptide pancréatique stimulant la sécrétion de HCl.

Chez les mammifères, la sécrétion d'insuline par les cellules β joue un rôle majeur dans le contrôle de la glycémie et l'homéostasie énergétique. Alors qu'il existe plusieurs facteurs nerveux ou hormonaux hyperglycémiants dont la libération est déclenchée par l'hypoglycémie, l'insuline est la seule hormone hypoglycémiante.

Le glucose pénètre facilement dans la cellule β grâce à l'action d'une protéine transporteur favorisant l'entrée de ce sucre, la protéine Glut-2. Le glucose va être phosphorylé par une glucokinase (GK). Le Glucose-6-phosphate produit est engagé dans deux voies métaboliques importantes que sont : la voie de la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Le résultat final de ces voies métaboliques se traduit par la génération d'ATP.

4.2 Pathogénèse du diabète du type I

4.2.1 Etiologie

Le diabète de type I (DID) est une maladie qui aboutit à une destruction totale des cellules β des îlots de Langerhans. Les mécanismes conduisant à la destruction des îlots de Langerhans impliquent un processus auto-immun, précédant le syndrome hyperglycémique et son panel de signes cliniques. Néanmoins, les antigènes qui initient cette pathologie auto-immune ne sont pas clairement établis :

- Des facteurs environnementaux pourraient être à l'origine du déclenchement du syndrome auto-immunitaire. Ils pourraient expliquer "le gradient nord-sud" du DID : en effet, un enfant scandinave a 7 à 8 fois plus de risque de développer un diabète insulino-dépendant qu'un enfant français. Le stress psychologique pourrait intervenir dans le déclenchement ou la progression des réactions auto-immunes, à l'origine du DID, au cours de la première année de vie [Sepa A.2005].

- Le rôle des virus dans la pathogénie du DID est suspecté mais non clairement démontré. L'infection virale au niveau du pancréas pourrait être responsable d'une réaction inflammatoire favorisant le développement de la réaction auto-immune [Filippi C.2005] [Cavallo MG.1992]. La haute prévalence, d'environ 20 %, du diabète de type 1 en cas de rubéole congénitale ou la présence du virus coxsackie B4 isolé dans le pancréas d'enfant décédé lors d'une acido-cétose inaugurale, sont des arguments en faveur de cette hypothèse.

Certains virus pourraient présenter un antigène commun avec des protéines de cellule β, comme le virus coxsakie B4 ou le cytomégalovirus [Tong JC.2002].

- L'acide glutamique-décarboxylase (GAD) semble être décrite à ce jour comme un antigène cible initiateur, et particulièrement l'isoforme 65 kDa de l'acide glutamique décarboxylase (GAD65). Les anticorps anti-GAD sont les premiers auto-anticorps dépistés [Christie MR.1992] [Diaz JL.1992]. L'induction de tolérance avec un virus recombinant exprimant l'antigène GAD65 prévient l'apparition du diabète de type I chez la souris NOD (non-obese diabetic) [Jun HS.2002], prouvant ainsi le rôle initiateur de l'antigène GAD dans le déclenchement de la maladie auto-immune. Les anticorps anti-GAD65 reconnaissent une enzyme impliquée dans la conversion de l'acide glutamique en acide g-aminobutyrique (GABA), dont la distribution est limitée aux îlots pancréatiques, au système nerveux central et périphérique et aux spermatozoïdes. Curieusement les travaux de l'équipe de Tong ont mis en évidence que la séquence de GAD65 est similaire à celle de la protéine P2-C du virus Coxsackie B [Tong JC.2002]. Les anticorps anti-GAD sont présents chez 50 à 80% des récents diabétiques de type I et chez moins de 2% des sujets sains. Ces anticorps peuvent persister plusieurs années après le diagnostic [Delgrange E.2001]. Malgré ces évidences, un premier essai clinique international a cherché à évaluer si l'administration du "vaccin" GAD-alum (une forme aluminium hydroxide de GAD65, commercialisée sous le nom de Diamyd®, permettant d'induire une tolérance immunitaire envers l'auto-antigène GAD65) pouvait préserver la fonction des cellules β chez les patients dont le diabète de type 1 avait été déclaré dans les 3 mois. Les résultats ont montré que le traitement n'a pas eu d'effet sur les doses journalières d'insuline, les taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) ou sur les niveaux d'hypoglycémies par comparaison avec le placebo. De plus cette administration de GAD-alum n'a pas freinée significativement la baisse du peptide-C après un repas test et n'a pas amélioré les paramètres cliniques sur 15 mois post-traitement [Ludvigsson J.2012]. Cependant le traitement est peut être administré trop tardivement après le début de la réaction auto-immune, de plus la posologie n'est peut-être pas adaptée.

Le syndrome auto-immunitaire débute plusieurs années avant l'apparition clinique du DID. En clinique, une infiltration des îlots de Langerhans par des cellules mononuclées, appelée insulite, a été mise en évidence dans la pathogenèse du DID. Il s'agit de lymphocytes T $CD4^+$ et surtout une majorité de T $CD8^+$ cytotoxiques, auxquels s'associent des macrophages et des lymphocytes B.

Il existe 2 voies de destruction :

- La première voie est une réaction immunitaire à médiation cellulaire dans laquelle les Lymphocytes T $CD8^+$ interagissent directement avec la surface de la cellule β pour initier un processus cytotoxique.

- La seconde voie est une réaction immunitaire à médiation humorale dans laquelle le lymphocyte T $CD4^+$ interagit avec un peptide issu des cellules β des îlots de Langerhans, présenté par une cellule CPA. Cette interaction conduit principalement à la libération de cytokines et à l'activation des cellules T $CD4^+$ et des lymphocytes B produisant des anticorps anti antigènes de cellules β.

De nombreuses limites interviennent dans la compréhension de la pathogenèse du DID, telles que l'hétérogénéité génétique, les variations environnementales et la difficulté d'obtention de tissus pancréatiques pour des études histologiques, protéomiques et transcriptomiques.

4.2.2 Conséquences de la pathologie

L'élévation de la glycémie suppose qu'il y ait déjà une destruction d'environ 80 à 90% des cellules β. Cette hyperglycémie déclenche à long terme de très sévères complications touchant principalement le réseau vasculaire de nombreux organes et tissus, tels que les yeux et les reins. En raison de l'hyperglycémie chronique et/ou de son association à d'autres facteurs de risques cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, l'excès de triglycérides sanguins, l'obésité, la sédentarité..., le DID favorise le développement de plaques d'athéroscléroses au niveau des artères de gros calibre (macroangiopathie). Ce vieillissement accéléré des artères coronaires a pour conséquence :

- Une mortalité prématurée chez les diabétiques de type 1, en particulier chez les femmes, habituellement protégées contre les maladies cardiovasculaires jusqu'à la ménopause.

- La probabilité de décès suite à un infarctus du myocarde est multipliée par quatre chez un sujet atteint du DID.

- Les diabétiques sont deux fois plus enclins que les personnes non diabétiques à développer une pathologie vasculaire des membres inférieurs, risque accru par d'autres facteurs comme le tabagisme.

- Le DID est un facteur important de survenues d'accidents vasculaires cérébraux.

Si les macroangiopathies font la gravité de la maladie diabétique, l'atteinte des petits vaisseaux comme les artérioles et les capillaires induit des microangiopathies, complications propres au diabète. Ces microangiopathies sont directement liées à l'hyperglycémie. Elles sont caractérisées par une importante infiltration des glycoprotéines (protéines altérées par l'excès de glucose) au niveau de l'endothélium des petits vaisseaux sanguins. La paroi de l'endothélium ainsi altérée va conduire à un défaut de perfusion du flux sanguin et à des troubles majeurs de l'hémostase. L'atteinte des petits vaisseaux irriguant la rétine détermine ainsi des altérations visuelles, passant longtemps inaperçues mais pouvant aboutir à une cécité irréversible. La circulation sanguine est également très souvent endommagée au niveau des micro-vaisseaux des membres inférieurs, comme les pieds. Ceci explique la nécessité de recourir parfois à des amputations des orteils lorsque ceux-ci ne sont plus suffisamment irrigués par le sang. De plus, le DID expose à des lésions précoces des micro-vaisseaux du rein, avec le risque de voir se développer une néphropathie se traduisant par une insuffisance rénale. La plupart des diabétiques présentent donc de nombreux facteurs de risque dont les effets délétères se renforcent mutuellement.

Il est donc fondamental de rétablir une normoglycémie précise et constante chez ces sujets diabétiques, car seul le strict contrôle de la glycémie peut prévenir les redoutables complications microangiopathiques du diabète [Group TDCaCTR.1993] [Group U.1998].

4.3 Traitements du diabète de type I

Le traitement idéal du diabète doit théoriquement permettre d'atteindre deux objectifs complémentaires, tout en limitant au minimum les contraintes imposées aux patients :

- La normalisation en continu de l'équilibre glycémique.
- Le ralentissement ou, au mieux, la prévention des complications dégénératives de la maladie.

4.3.1 Insulinothérapie

Aujourd'hui les patients atteints de diabète de type 1, ont recours à l'insulinothérapie exogène. Ce traitement vise à remplacer, (i) l'insulinosécrétion physiologique par des injections d'insuline lente et (ii) les pics d'insulinémie prandiale par l'injection d'insuline rapide avant chaque repas. Un sujet sain présente une insulinosécrétion basale continue et régulée à laquelle vient s'ajouter des pics insulinosécrétoires lors des repas [Grimaldi A.1998]. Comme l'a montré l'essai clinique "The Diabetes Control and Complications Trial", chez la plupart des patients, la meilleure façon d'obtenir un strict contrôle glycémique repose sur une insulinothérapie intensive [Group TDCaCTR.1993]. Ce traitement est très contraignant puisque il nécessite un contrôle très régulier de la glycémie, plusieurs injections quotidiennes d'insuline, et l'adaptation des doses d'insuline en fonction de l'alimentation et de l'exercice physique. Cette insulinothérapie intensive permet d'obtenir un contrôle glycémique satisfaisant chez la plupart des patients. Cependant, une insulinothérapie intensive mal équilibrée par rapport à un exercice physique par exemple, peut entraîner des risques d'hypoglycémies pouvant aboutir à de graves problèmes chez le patient [Group TDCaCTR.1997].

En outre, malgré une insulinothérapie bien conduite, certains patients présentent une instabilité glycémique associée à une progression des complications spécifiques, mettant en jeu leur pronostic vital et altérant leur qualité de vie. Il est clair que l'insulinothérapie exogène ne permet pas de réguler parfaitement l'équilibre glycémique des patients diabétiques. Ce contrôle approximatif des fluctuations de glucose participe à l'évolution des nombreuses complications dégénératives du DID, que sont les néphropathies, les rétinopathies, les troubles cardio-vasculaires et l'athérosclérose [Bloomgarden ZT.2004] [Bailes BK.2002] [Hill J.2004].

La greffe des cellules β qui produisent l'insuline et adaptent cette sécrétion en fonction de la glycémie, semble la voie la plus logique pour obtenir une normoglycémie permanente sans risque d'hypoglycémie. Cela peut désormais être réalisé grâce à la transplantation du pancréas, ou plus récemment, à la greffe des îlots de Langerhans.

4.3.2 Transplantation de pancréas entier

Bien que la greffe de pancréas soit complexe, elle peut produire un bon contrôle de la glycémie. Selon les données du registre de transplantation pancréatique, le taux de patients insulino-indépendants à 1 an après la greffe est de 82%. Toutefois, la transplantation de pancréas entier présente quelques inconvénients. Le caractère invasif et le geste chirurgical lourd sont des facteurs limitants. Cette opération est responsable d'une morbidité importante. Certaines complications techniques peuvent entraîner la perte précoce du greffon, et imposer sa "détransplantation". En outre la greffe de la partie exocrine du pancréas (fonctionnelle chez les sujets diabétiques) entraîne des complications chez le patient en rapport avec la production de sucs digestifs qu'il est nécessaire de dériver par anastomose sur l'intestin grêle. Il faut ajouter que cet apport de masse tissulaire non "désirée", constitue une source supplémentaire d'alloantigènes. Pour toutes ces raisons, la transplantation du pancréas est réservée à un faible taux de patients. Sont concernés les patients qui vont avoir recours à une chirurgie et à une immunosuppression pour la transplantation d'un rein, et dans de rares cas en greffe isolée, lorsque tous les autres traitements ont échoué et que les hypoglycémies deviennent invalidantes.

4.3.3 La greffe d'îlots de Langerhans

4.3.3.1 Aspects Cliniques

La greffe d'îlots de Langerhans représente une alternative de choix à la transplantation du pancréas entier. Seuls les îlots de Langerhans du pancréas, capables de sécréter de l'insuline, sont injectés chez le patient. Ce traitement permet la restauration d'une sécrétion d'insuline endogène régulant les fluctuations glycémiques sévères, limitant prioritairement les hypoglycémies. Cet objectif pouvant être obtenu avec une petite masse fonctionnelle d'îlots, associée à de besoins insuliniques exogènes de second rôle [Lehmann R.2008]. La greffe sélective des îlots de Langerhans débarrassés de la partie exocrine du pancréas, aussi délétère qu'inutile pour le receveur, ne nécessite qu'une intervention chirurgicale très peu invasive. Par rapport à la greffe de pancréas entier, la greffe d'îlots a une morbidité moindre. Cette procédure cause essentiellement des risques d'hémorragie hépatique (dans 10-15% des cas), et de thrombose porte (rare cas), la mortalité est exceptionnelle [Bucher P.2004].

Cette thérapie est plus spécifique et adaptée aux besoins des patients diabétiques. La transplantation d'îlots pancréatiques a été l'objet de progrès déterminants ces dernières années, et il n'est pas déraisonnable de penser que cette thérapie constitue dans un futur proche, une

option de premier ordre pour le diabète de type I, voire également dans certains cas de type II [McCall M.2012]. Les dysfonctions des îlots de Langerhans jouent, en effet, un rôle clé au cours du stade évolutif du diabète de type II [Porte D, Jr.1995] [Pratley RE.2001].

Depuis les travaux princeps de l'équipe de Lacy, de grands espoirs ont été placés dans la greffe d'îlots de Langerhans. Dans cette étude les îlots isolés des pancréas de rats par digestion enzymatique, ont permis de corriger le diabète après injection intra-péritonéale [Lacy PE.1967]. Les premiers essais cliniques ont débuté après la mise au point en 1988 d'un dispositif semi-automatique d'isolement des îlots humains par l'équipe de Ricordi [Ricordi C.1988]. Avant les années 2000, selon le registre international des transplantations d'îlots, le taux d'insulino-indépendance consécutif aux allogreffes d'îlots n'atteignait que 12% à une semaine et seulement 8% à 1 an [Brendel M.1999].

Les résultats de l'équipe d'Edmonton, publiés en 2000, ont secoué le monde de la transplantation d'îlots et de la diabétologie. Ces données ont montré une série de 7 patients qui présentait un taux d'insulino-indépendance de 100% rapidement après la greffe d'îlots pancréatiques. Il a été observé chez ces patients un excellent control métabolique sans épisodes d'hypoglycémies sévères [Shapiro AM.2000]. Ce succès a pu être rapporté à plusieurs facteurs :

- à une sélection de pancréas "parfaits" issus de donneurs cadavériques.
- à un ratio donneur/receveur équivalent à 2/1 pour 6 patients et à 3/1 pour le septième patient, afin d'obtenir un plus grand nombre d'îlots greffés (greffon en moyenne de 11500 IEQ/kg).
- à une méthode d'isolement des îlots, utilisant de la Liberase® (collagénases de moindre variabilité et contenant moins d'endotoxine [Linetsky E.1997]), utilisant la chambre de Ricordi avec quelques améliorations, et une purification satisfaisante des îlots par gradient de Ficoll et séparateur Cobe 2991 (automate pour la technique de séparation par densité cellulaire sur gradient de Ficoll).
- à un protocole immunosuppresseur innovant, moins diabétogène, avec association de sirolimus, de faibles doses de tacrolimus et d'anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de l'interleukine-2, mais surtout dépourvu de glucocorticoïdes.

Les résultats à cinq ans sont cependant plus décevants avec moins de 20% de patients greffés sans traitement exogène d'insuline. Ce qui est cependant encourageant est le fait que les îlots greffés sont toujours fonctionnels, démontré par la présence de C-peptide circulant,

même s'ils ne suffisent plus entièrement à couvrir les besoins en insuline [Ryan EA.2005]. De manière intéressante, les patients ayant besoin d'insuline exogène gardent néanmoins un bon contrôle glycémique, ce qui est démontré par des valeurs d'hémoglobine glyquée à 6,5% [Ryan EA.2005]. Depuis, plusieurs équipes, ont tenté de reproduire les résultats du protocole d'Edmonton, cependant d'importantes variations entre les centres persistent. Malgré cet effet centre, aucune hypoglycémie majeure ne fut observée chez les 36 patients de cette étude, dont le taux d'insulino-indépendance à 1 an était de 44% [Shapiro AM.2006].

A l'heure actuelle en France, la greffe d'îlots de Langerhans est réservée à des malades diabétiques de type I qui ne justifient pas une indication de greffe de pancréas entier pour des raisons évidentes de rapport bénéfice/risque défavorable [Agence-de-Biomedecine.2011]. La greffe d'îlots s'adresse donc à des patients diabétiques :

- ayant déjà reçu un rein et dont la glycémie est difficile à réguler (îlots après rein, IAK),
- souffrants des complications macrovasculaires limitant la greffe de pancréas entier. Dans ce cas la greffe d'îlots est alors associée à une greffe de rein (rein-îlots simultanés, SIK),
- présentant un diabète très instable avec de multiples hypoglycémies sévères, parfois non ressenties et impactant sur la qualité de vie des patients (transplantation d'îlots seuls, ITA).

En 2011, sur le territoire Français et Genevois, les greffes d'îlots étaient réalisées dans le cadre de trois protocoles de recherche clinique : un à Lille, un protocole multicentrique GRAGIL entre la France et la Suisse et un protocole TRIMECO commun à tous les centres. Pour exemple, l'expérience du groupe GRAGIL montre un taux d'insulino-indépendance, 2 ans après transplantation, de 62.5% chez des patients ayant reçu une injection d'îlots (5,312 IEQ/kg) et de 71,4% chez des patients ayant reçus 2 injections (10,564 IEQ/kg) [Borot S.2011]. Leurs données suggèrent que le nombre d'infusion d'îlots influence la durée d'insulino-indépendance, en effet elle est de 4,7 mois (médiane) après une injection et de 19 mois (médiane) après 2 injections. Chez ces patients 24 mois après transplantation, les greffons "2 infusions" présentent cependant pas de différences significatives en termes de besoins d'insuline exogène ni de taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c). L'influence de la double injection est nettement plus appréciable que l'unique injection ($p<0,05$), concernant les taux de C-peptide (599 pmol/L versus 302 pmol/L) et de β score ≥ 4 (100% versus 37% des patients), 2 ans après transplantation [Borot S.2011].

En France, le prélèvement de pancréas destinés à la greffe d'îlots est en croissance depuis 5 ans au détriment des prélèvements de pancréas destinés à la transplantation de l'organe entier. En 2011, 102 pancréas ont été prélevés en vue d'une greffe d'organe entier, soit une baisse de 20 % par rapport à 2010 [Agence-de-Biomedecine.2011] (Tableau 6).

Tableau 6 : Evolution du nombre de donneurs décédés de mort encéphalique prélevés d'un pancréas en vue d'une transplantation de pancréas ou d'îlots pancréatiques (Rapport 2011 Agence de Biomédecine) [Agence-de-Biomedecine.2011].

Année	Donneurs décédés de mort encéphalique prélevés d'un pancréas en vue de greffe pancréatique	Donneurs décédés de mort encéphalique prélevés d'un pancréas en vue de greffe d'îlots de Langerhans	Donneur décédé en état de mort encéphalique prélevé d'au moins un organe
2006	118	79	1442
2007	128	86	1561
2008	105	89	1563
2009	120	70	1481
2010	120	84	1476
2011	102	95	1572

Sur le plan international, les données du Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) montrent que 677 transplantations d'îlots seuls ou d'îlots après une greffe rénale, ont été réalisées entre 1999 et 2010 [Barton FB.2012]. Les données du CITR soulignent les nettes améliorations durant ces 12 années, avec aujourd'hui un taux d'insulino-indépendance à 3 ans de 44% alors qu'il était de 27% entre 1999 et 2002 et de 37% entre 2003 et 2006. Le nombre de ré-infusion a également diminué ces 4 dernières années, et est actuellement de 48% dans la première année suivant la première injection d'îlots alors qu'il était de 60-65% entre 1999 et 2006. Ce registre fait également état d'une légère réduction de la survenue d'événements indésirables dans la première année après greffe [Barton FB.2012].

Malgré ces avancées, cette thérapie nécessite encore des améliorations. Les résultats à long terme de ces protocoles permettront de mieux préciser la place de la greffe d'îlots de Langerhans dans le traitement du diabète et d'envisager le passage en routine de cette activité actuellement réalisée principalement dans le cadre de protocoles de recherches [Agence-de-Biomedecine.2011]. Parmis les améliorations envisageables, les étapes d'isolement et de culture des îlots sont des points de premiere ligne.

Technique d'isolement d'îlots de Langerhans

En France, après prélèvement d'un pancréas sur un sujet en état de mort encéphalique, le pancréas est conservé en solution de préservation (cf. tableau 12 ci-dessous) en condition statique à 4°C, puis acheminé au laboratoire d'isolement dans un délai qui doit être inférieur à 8 heures. Les différentes étapes de l'isolement des îlots comprennent (Figure 12):

- la dissection et la canulation du pancréas,
- l'injection de collagénases à travers le canal de Wirsung, afin de séparer les îlots du tissu exocrine, enzymes dont le choix est primordial [Robertson GS.1993],
- la digestion enzymatique à 37°C stimulée par agitation mécanique selon les bases établies par l'équipe de Ricordi,
- la purification par centrifugation sur gradient de densité (Ficoll) sur COBE 2991 selon la méthode de Ricordi optimisée [Ricordi C.1988] [Bucher P.2005] [Linetsky E.1997]. Le séparateur de cellules Cobe 2991 a significativement amélioré l'automatisation et la standardisation de la procédure d'isolement.
- des lavages, puis la mise en culture des îlots. Un tel isolement dure de 6 à 9 heures.
- Sur le plan international, les îlots sont cultivés en moyenne durant 26 heures avant greffe, depuis 2007, alors qu'en 1999 cette culture durait en moyenne 11 heures (Tableau 8).
- la fonctionnalité des îlots est déterminée après la période de culture par mesure de l'insulinosécrétion après stimulation au glucose. L'évaluation de la viabilité est également prise en compte, et elle doit être supérieure à 70%. La masse d'îlots est alors exprimée en nombre d'îlots équivalents (IEQ), unité standard qui prend en compte les variations de taille des îlots en normalisant à un diamètre standard d'îlots de 150 µm [Ricordi C.1990]. En règle générales selon l'âge du donneur, la masse d'îlots obtenue doit être supérieure à 0,5 million d'îlots/pancréas.
- la préparation est conditionnée dans une seringue de 50 ml, puis ensuite injectée dans le système porte, soit par cathétérisme d'une veine colique lors d'une intervention de chirurgie ouverte, soit par cathétérisme de la veine porte par voie percutanée transhépatique. Les îlots vont ainsi se placer dans les branches du système porte hépatique [Naftanel MA.2004] (Figure 12).

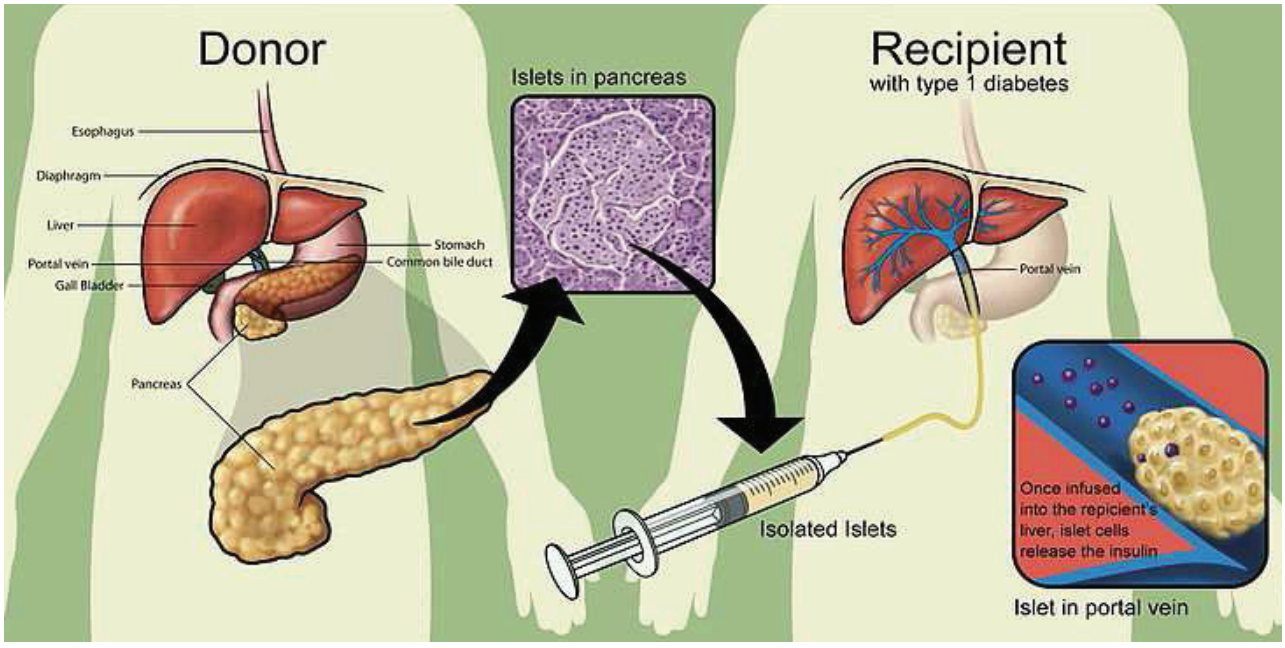


Figure 12 : Protocole de transplantation d'îlots pancréatiques chez l'homme.
Brièvement, le pancréas prélevé chez un donneur est digéré par des collagénases qui permettent de dissocier les îlots du reste du tissu pancréatique. Après purification, les îlots, qui contiennent des cellules β sécrétrices d'insuline sont injectés via un cathéter dans le flux porte et ainsi dans le foie [Naftanel MA.2004].

4.3.3.2 Limites de la greffe d'ilots

La transplantation d'îlots est une thérapie récente qui présente encore des limites en plus des lésions inévitables d'I/R. Les problèmes majeurs rencontrés pour ce traitement sont :

- les conditions de préservation des pancréas qui sont encore perfectibles,
- un rendement insuffisant d'îlots après l'isolement et culture, qui aboutit à un ratio donneur/receveur encore trop élevé,
- une perte cellulaire lors de l'implantation, due à des mécanismes thrombotiques / inflammatoires (IBMIR),
- un rejet du greffon dû à une réaction immunologique à plus ou moins long terme.

A ces difficultés, s'ajoute la démographie actuelle des donneurs, qui influence la qualité des îlots isolés. De plus en plus de pancréas sont issus de donneurs à critères étendus âgés qui présentent des facteurs à risques. Cet état de fait participe à l'émergence des greffons pancréatiques en mauvais état conduisant à une non-greffe des îlots, comme illustré dans le

Tableau 7 (22 pancréas, destinés à l'isolement d'îlots, étaient de mauvaise qualité en 2006 contre 55 en 2011). En 2011, selon le rapport de l'agence de Biomedecine, 25,5% des pancréas prélevés n'ont pas été greffés [Agence-de-Biomedecine.2011].

Tableau 7 : Evolution des causes de non greffe des pancréas prélevés pour îlots en France [Agence-de-Biomedecine.2011].

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Mauvaise qualité du greffon	22	45	62	45	53	55
Détérioration du greffon	1	4	2	1	2	2

L'utilisation de pancréas provenant de donneurs à critères étendus a des répercussions sur l'isolement des îlots et sur la préservation de leur intégrité. En effet, une équipe québécoise a publié, en 2008, une étude mettant en évidence une corrélation significative entre l'âge du donneur et le rendement d'îlots, plus l'âge est élevé, plus le rendement est faible [Hanley SC.2008]. En 2011, une étude rétrospective a été publié, sur 332 isolements d'îlots pancréatiques issus de donneurs en mort encéphalique, dont les patients transplantés ont été divisés en groupes selon l'âge du donneur (≤45 ans et >45 ans). Dans cette étude l'âge du donneur n'a pas influencé le rendement d'îlots, ni même les capacités insulinosécrétrice des îlots après stimulation. Cependant les îlots issus des donneurs plus âgés étaient significativement moins gros, suggérant une moins bonne préservation de leur intégrité lors de l'isolement. Cette étude a montré à 1 mois après injection, que le SUIT index (Secretory Unit of Islet in transplantation), le ratio peptide-C/glucose, le β score (score de fonction des cellules β), et le taux d'insulino-indépendance, étaient significativement moins bons, plus le donneur était âgé. Le ratio peptide-C/glucose et le SUIT index étaient significativement meilleurs, 6 et 12 mois après injection, pour des greffons provenant de donneur âgés de moins de 45 ans comparativement à des donneurs âgés de plus de 45 ans, corrélation non établie pour le β score. De plus les greffons provenant de donneurs âgés de plus de 60 ans ne permettaient aucune insulino-indépendance 1 mois après transplantation, alors que les greffons issus de donneurs âgés de moins de 40 ans permettaient un taux de 38% d'insulino-indépendance [Niclauss N.2011].

Depuis quelques années, selon le CITR, le prélèvement du pancréas est de plus en plus tardif après la déclaration de la mort encéphalique : 21 heures en moyenne entre 2007-2009 contre 16 heures entre 1999 et 2003 (Tableau 8). Depuis ces 10 dernières années, le temps d'ischémie froide du pancréas c'est également allongé significativement de 7h en moyenne

entre 1999 et 2003 à 7,4 heures en 2009 (Tableau 8). Au regard de l'importance des lésions engendrées par la mort encéphalique (notamment via l'orage cytokinique) et par l'ischémie froide, l'allongement de ces temps est un problème lourd de conséquences pour les îlots pancréatiques.

Tableau 8 : Evolution, à l'échelle internationale, des temps d'ischémie froide des pancréas avant isolement des îlots et durée de culture des îlots avant greffe (CITR report 2010, http://www.citregistry.org) [CITR.2010].
*(*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)*

	Transplant type						p	Era								p
	ITA			IAK/SIK				1999-2003			2004-2006			2007-2009		
	N	Mean	SD	N	Mean	SD		N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	
Time from cross clamp to pancreas recovery (mins)	500	0.8	1.3	131	0.9	0.4		220	0.6	0.5	285	0.9	1.5	126	0.8	0.9	
Duration of cold ischemia (hrs)	671	7.4	3.4	124	6.4	2.8	**	343	7.0	3.2	319	7.4	3.3	133	7.4	3.9	*
Time from brain death to pancreas recovery (hrs)	453	19.4	8.6	120	16.1	10.1	***	210	16.8	7.8	251	19.2	9.3	112	21.1	9.7	***
Culture time (hrs)	692	17.1	18.6	104	17.0	18.3		342	11.7	17.9	312	18.9	17.3	142	26.3	18.6	***

En plus de l'état initial du pancréas, et des conditions de conservations de ce dernier, la technique d'isolement des îlots est délicate et n'a qu'un rendement faible. A l'heure actuelle, en clinique, afin d'aboutir à l'insulino-indépendance du receveur, Il est nécessaire de greffer une masse importante d'îlots provenant d'un ou plusieurs pancréas. Les données internationales du CITR montrent que 571 patients diabétiques ont été transplantés, nécessitant 1072 infusions d'îlots obtenus à partir de 1187 donneurs (Tableau 9). Seulement 31% de ces receveurs une obtenus insulinosécrétion satisfaisante avec une seule infusion d'îlots, 47% après 2 injections, 20% après 3 injections et 2% après 4 injections [CITR.2010]. En moyenne une infusion d'îlots, correspondant à la masse d'îlots obtenus à partir d'un pancréas, varie entre 417±7,5 et 465±11,2 IEQ [CITR.2010].

L'amélioration des méthodes de préservation du pancréas et d'isolement des îlots est donc un enjeu majeur dans le but d'améliorer ce "faible" rendement d'îlots.

Tableau 9 : Nombre de patients receveurs d'îlots, nombre d'injections d'îlots et nombre de donneurs d'îlots, entre 1999 et 2009, données du CITR [CITR.2010].

	Islet Transplant Alone (ITA)			Islet After Kidney or Simultaneous Islet-Kidney (IAK-SIK)			
	Total	**North America**	**Europe/ Australia**	Total	**North America**	**Europe/ Australia**	**GRAND TOTALS**
Recipients	**481**	341	140	**90**	35	55	**571**
Infusions	**897**	650	247	**175**	66	109	**1,072**
Donors	**988**	693	295	**199**	73	126	**1,187**

Sur le plan international, il existe quelques variations de procédures entre les centres. Le CITR fait registre de l'évolution des modalités de préservation des pancréas (solutions de conservations utilisées), d'isolement et de culture des îlots avant greffe (Tableau 10, Tableau 8, Tableau 11).

Tableau 10 : Evolution, à l'échelle internationale, des processus d'obtention des îlots (CITR, Report 2010, http://www.citregistry.org) [CITR.2010].
*(*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).*

Final islet preparations for infusion		Transplant type					Era						
		ITA		IAK/SIK			1999-2003		2004-2006		2007-2009		
		N	%	N	%	p	N	%	N	%	N	%	p
Pancreas Preservation	Missing/Unknown	61	6.8	6	3.4		27	6.3	6	1.5	34	14.0	
	UW only	359	40.0	83	47.4	**	243	56.4	154	38.7	45	18.5	***
	2L only	188	21.0	22	12.6	*	75	17.4	114	28.6	21	8.6	***
	HTK only	87	9.7	1	0.6	?	-	0.0	33	8.3	55	22.6	*
	Celsior	14	1.6	6	3.4	?	6	1.4	7	1.8	7	2.9	
	UW+2L	33	3.7	8	4.6		15	3.5	20	5.0	6	2.5	
	Other	155	17.3	49	28.0		65	15.1	64	16.1	75	30.9	
Cultured	Miss/Unk	205	22.9	71	40.6		89	20.6	86	21.6	101	41.6	
	None	292	32.6	41	23.4		219	50.8	92	23.1	22	9.1	
	Islets cultured >=6 hrs	400	44.6	63	36.0		123	28.5	220	55.3	120	49.4	***

Depuis le début des années 2000, les préservations du pancréas avec UW seul ou avec la méthode "2 Layer" seule, sont en déclin en faveur de la solution HTK et "autres" solutions. L'important déclin, voire l'abandon, de la methode "2 Layer" peut s'expliquer par la complexité et le cout de la méthode par rapport à une conservation classique à froid en HTK ou UW donnant des résultats similaires [Barlow AD.2013]. En effet entre 1999 et 2003, 56% des pancréas étaient préservés en UW et 17% en "2 Layer", alors qu'entre 2007 et 2009, seulement 18% des pancréas étaient conservés en UW et 8% en "2 Layer". La solution Celsior et la préservation UW+"2 Layer" sont quant à eux que très peu utilisés. De plus, depuis 2007, 49% des greffons d'îlots sont cultivés plus de 6 heures avant greffe alors qu'entre 1999 et 2003 seulement 28% étaient mis en culture.

De plus, le CITR fait état d'un important effet solution sur le devenir des îlots en fin d'isolement. Toutefois, il est très difficile de faire émerger une solution de préservation de

référence pour le pancréas (Tableau 11). En termes de rendement d'îlots, la conservation des pancréas avec la solution Celsior donne de moins bons résultats que l'utilisation des autres solutions. Ceci peut expliquer le fait que cette solution (ne contenant pas de colloïde) soit très peu utilisée pour la conservation du pancréas. La conservation avec UW seule ou avec la méthode "2 Layer" ne permet pas un meilleure rendement de cellules β (402 IEQ/pancréas avec UW et 365 IEQ/pancréas avec 2L) par rapport à la méthode "UW+2 Layer" (449 IEQ/pancréas) ou à la solution HTK (406 IEQ/pancréas). Cependant en termes de capacité et de pureté des îlots, la préservation avec UW et "2 Layer" seuls ou les 2 combinés donnent les meilleurs résultats, notamment par rapport à HTK. Il serait très intéressant d'avoir des précisions statistiques sur les résultats obtenus avec les différentes solutions du groupe "Other" au vu des bons résultats de rendement (457 IEQ/pancréas).

Tableau 11 : Evolution, à l'échelle internationale, des caractéristiques des îlots obtenus en fonction des méthodes de préservation des pancréas (CITR report 2010, http://www.citregistry.org) [CITR.2010]
*(*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).*

Final Islet Preparations for Infusion	Pancreas Preservation Method																		
	UW only			2L only			HTK only			Celsior			UW+2L			Other			
	N	Mean	SE	N	Mean	SE	N	Mean	SE	N	Mean	SE	N	Mean	SE	N	Mean	SE	p
Total cell volume	382	4.0	0.1	198	3.7	0.1	71	3.8	0.2	19	3.7	0.4	35	4.2	0.4	68	4.1	0.3	
Total islet particles (final preparation)	361	402.8	8.5	167	365.7	12.7	76	406.3	14.8	20	361.5	33.9	37	**449.8**	**33.3**	57	457.9	29.2	*
Embedded islets (%)	253	16.0	1.2	111	18.6	2.1	83	17.0	2.2	17	14.5	3.9	22	23.9	5.0	44	14.0	2.8	
IEQs infused	420	427.3	7.8	206	415.1	11.2	72	439.9	16.7	20	317.2	12.9	38	496.2	26.7	142	405.6	10.3	
Islet equivalents (1000s) / kg donor weight	408	5.1	0.1	206	4.8	0.1	69	4.9	0.2	20	4.0	0.2	38	6.1	0.4	122	4.9	0.1	
Beta cells (1000s)	144	196.5	15.4	76	255.1	21.9	40	**329.4**	**31.8**	0	-	-	7	241.1	58.6	6	**316.3**	**33.7**	**
Beta cells (1000s) / kg donor weight	136	2.8	0.3	76	3.0	0.2	40	3.8	0.4	0	-	-	7	3.2	0.6	6	3.2	0.4	
Insulin content (micrograms)	170	3.4	0.2	81	3.4	0.2	3	5.7	1.2	0	-	-	9	5.1	0.9	12	2.9	0.5	
Total endotoxin units	339	25.3	3.2	166	28.9	4.0	86	4.4	2.3	6	0.2	0.1	32	45.4	16.6	41	8.4	4.5	
Endotoxin units / kg donor weight	328	0.3	0.0	166	0.3	0.0	83	0.0	0.0	6	0.0	0.0	32	0.6	0.2	36	0.1	0.0	
Islet potency: Stimulation index	385	**3.4**	**0.2**	176	**3.1**	**0.2**	**80**	2.8	0.3	6	1.7	0.4	30	**3.1**	**0.6**	41	2.5	0.3	*
Islet viability	362	91.0	0.3	200	92.4	0.4	88	87.7	0.7	11	88.9	1.2	36	91.4	0.9	55	90.6	0.8	
Purity	364	**63.2**	**1.0**	201	**61.6**	**1.2**	**83**	63.9	1.7	18	47.3	3.9	38	**63.9**	**3.0**	62	55.5	2.3	**
Total DNA	178	7.5	0.7	85	11.7	1.3	41	**13.7**	**1.2**	1	12.3	-	13	7.5	1.6	5	8.2	1.3	*

L'amélioration de cette technique reste donc un objectif majeur afin d'obtenir une masse importante d'îlots fonctionnels nécessaire pour instaurer une insulino-indépendance dès la première injection d'îlots. La recherche clinique s'accorde donc à améliorer la préservation du pancréas et la préparation d'un nombre suffisant d'îlots pour répondre à la demande métabolique des patients. Des études de recherche translationnelle doivent donc être

menées afin de définir de nouvelles méthodes ou améliorer les protocoles existants. Une des stratégies pour augmenter le rendement d'îlots et la préservation de leurs intégrités, serait d'utiliser une nouvelle et performante solution de préservation.

5 Intérêts expérimentaux du modèle d'isolement et de transplantation d'îlots

Dans le but d'améliorer la préservation de l'intégrité tissulaire durant la conservation extracorporelle du greffon, le modèle expérimental d'isolement et de transplantation d'îlots de Langerhans, présente plusieurs intérêts. De fait, les îlots sont un judicieux modèle à l'équilibre entre l'organe entier et la cellule isolée. De plus la technique d'isolement des îlots affecte particulièrement l'intégrité de ceux-ci, présentant ce modèle comme un bon modèle d'évaluation de la préservation cellulaire et tissulaire. L'effet solution est un facteur qui influence le rendement d'îlots, ce modèle d'isolement est donc un judicieux modèle d'évaluation d'une nouvelle solution de conservation. Les bénéfices obtenus par de nouvelles méthodes de préservation des îlots, peuvent dans ce modèle être facilement quantifiables grâce à la fenêtre de culture *in vitro*. De plus cette période de culture est un formidable "banc d'essai" pour tester et moduler l'immunogénicité des îlots, dans le but de réduire les réactions inflammatoires et d'alloreconnaissance dès la transplantation. De plus comme tous les modèles animaux de transplantation, il présente l'intérêt d'être au cœur des phénomènes d'immunogénicité dépendante ou indépendante de l'alloantigène, justifiant pleinement la recherche de protocoles immunomodulateurs et de stratégies d'induction de tolérance. Enfin ce modèle de transplantation est un des rares modèles disponible et réalisable chez la souris, permettant ainsi d'évaluer expérimentalement les bases de nouvelles stratégies (qui devront ensuite être validés chez le gros animal dans un modèle préclinique).

5.1 Un outil d'évaluation de la conservation d'organe (phase d'ischémie)

Les îlots se comportent comme un tissu, comprenant un réseau vasculaire dont la nécessité d'un accès sanguin est essentielle (Figure 13). Les îlots de Langerhans, dans le pancréas, reçoivent 5 à 10 fois plus de sang par volume de tissu que le compartiment exocrine du pancréas.

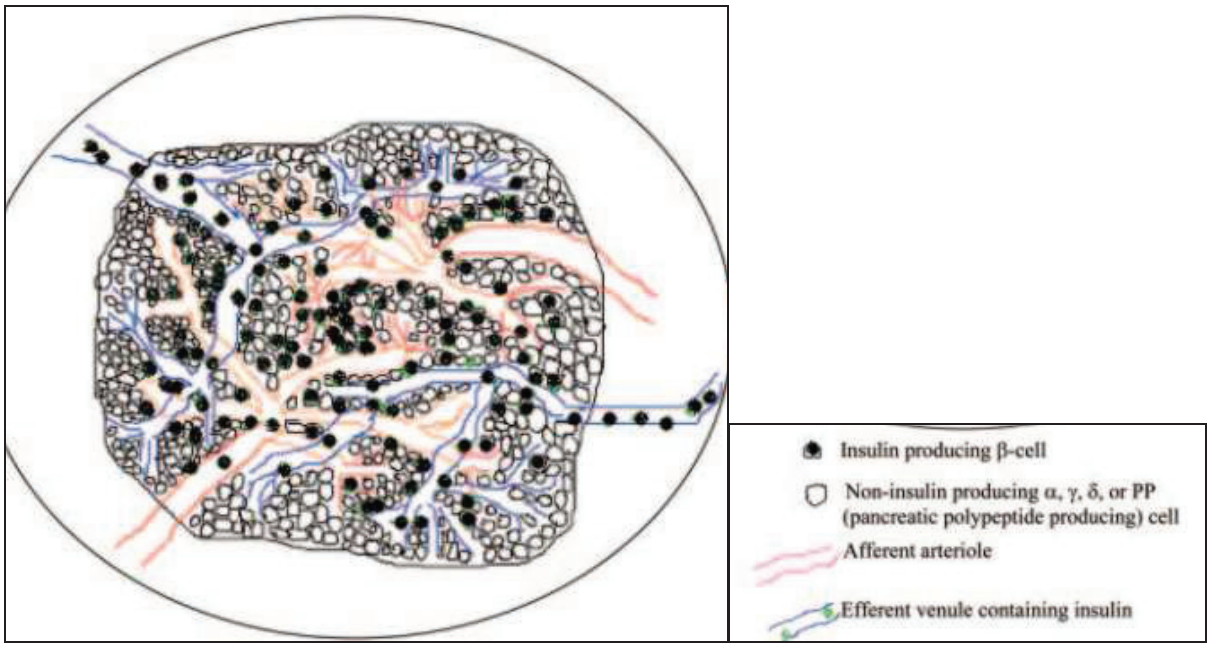


Figure 13 : Micro-anatomie des îlots de Langerhans [Narang AS.2006].

Pour déterminer la présence et l'orientation du système vasculaire intra-îlots, l'équipe de Menger a transplanté 8 à 10 îlots isolés de hamsters dans le pli cutané dorsal d'animaux syngéniques. Quatorze jours après transplantation, afin de visualiser les microvaisseaux des îlots transplantés, les animaux ont subi une injection intra-veineuse de dextran 150 kDa conjugués à la fluorescéine 5% isothiocyanate (FITC), puis la vasculature des îlots a été analysée par microscopie intra-vitale à fluorescence. Comme on le distingue sur la figure ci-dessous, les artérioles de soutien pénètrent dans la périphérie de l'îlot et percent les capillaires à l'intérieur de l'îlot (Figure 14). La perfusion capillaire est dirigée vers les microvaisseaux situés au cœur de l'îlot [Menger MD.2001] [Brissova M.2008].

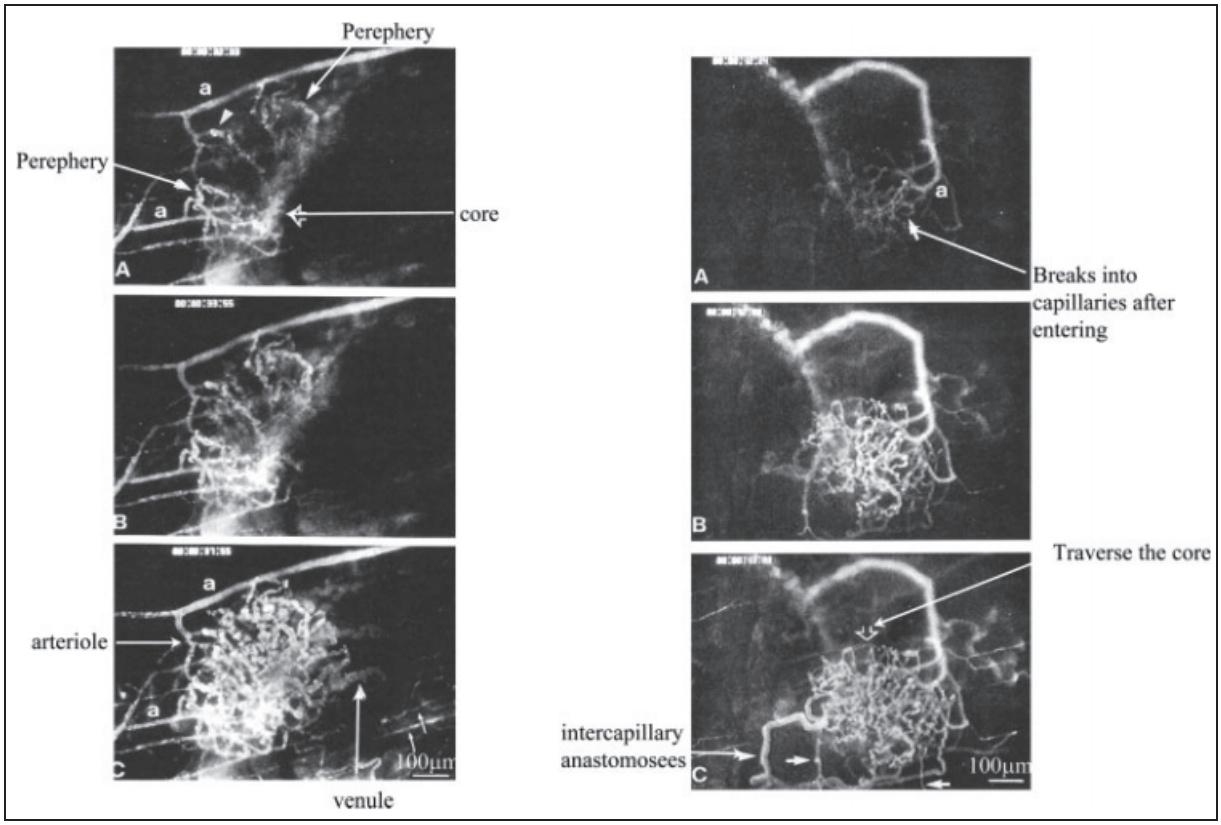


Figure 14 : Démonstration expérimentale de la vascularisation intra-îlots par administration intra-veineuse de dextran-FITC, analyse par imagerie à fluorescence *in vivo* [Narang AS.2006].

Ce réseau endothélial est précieux pour l'afflux d'oxygène et des nutriments aux cellules situées au centre de l'îlot, tout comme pour la circulation des sécrétions hormonales [Menger MD.2001] [Brissova M.2008] [Carroll P.1992]. Les hormones sécrétées par ces îlots sont déversées dans les capillaires sanguins qui rejoignent la veine porte. Le sens de la microcirculation insulaire n'est pas clairement élucidé, mais il existe des interactions entre les différentes hormones du tissu endocrine via cette circulation insulaire [Brunicardi FC.1996] [Bunnag SC.1963]. Ce réseau vasculaire permettrait au pancréas endocrine de réguler les sécrétions hormonales nécessaires à l'homéostasie glucidique en fonction de l'environnement métabolique. Il existe une pression en oxygène plus importante dans les îlots de Langerhans que dans le tissu exocrine, pression en O_2 importante pour le fonctionnement optimal des îlots [Menger MD.2001] [Brissova M.2008]. La production par les îlots de facteurs angiogéniques tels que l'angiopoietine-l et le VEGF-A semble nécessaire à cet état hyper vasculaire [Olsson R.2006] [Lammert E.2003].

La séquence d'ischémie des îlots, ponctuée par la conservation extracorporelle du pancréas puis par la séquence d'isolement, ainsi que par la non vascularisation des îlots au moment de la greffe, est très délétère pour l'intégrité du réseau vasculaire et pour le tissu dans sont ensemble [Mattsson G.2005]. L'équipe de Vasir et Weir a clairement mis en évidence que l'absence d'oxygène et de nutriments à travers le réseau capillaire lésé, entraîne une perte progressive de la viabilité des cellules au centre des îlots pouvant aboutir à la mort cellulaire après 48h de culture [Vasir B.1998]. A la transplantation ces îlots non vascularisés et encore fonctionnels sont capables de sécréter ou d'exprimer des molécules pro-angiogeniques, telles que le VEGF et ces récepteurs Flk-1 et Flt-1 [Vasir B.2001] [Vasir B.2000], afin de rétablir la vascularisation qui est un facteur fondamental dans la survie du greffon [Menger MD.2001] [Brissova M.2008]. En effet, la survie des îlots et leur fonction à long terme après transplantation sont, en partie, liées à la prévention de l'intégrité du réseau vasculaire [Narang AS.2004]. Par conséquent, la revascularisation complète et rapide est cruciale pour la reprise de fonction et la survie du greffon [Brissova M.2004], réduisant ainsi la réaction immunitaire précoce [Lukinius A.1995].

5.2 Un outil d'évaluation de l'immunoprotection du greffon

L'intérêt des îlots comme modèle d'évaluation de protocoles immunoprotecteurs et dans des stratégies d'induction de tolérance, est renforcé par l'importante immunogénicité des îlots. Les îlots pancréatiques sont particulièrement immunogènes, de par leur importante expression des molécules du CMH de classe I et II [Pavlovic D.1997] [Von Gaudecker B.1989]. Les travaux de Von Gaudecker ont pu mettre en évidence, par microscopie électronique, les localisations d'expression des molécules du CMH. Ils ont montré que l'expression du CMH de classe II est très élevée à la surface des cellules endothéliales, des macrophages et des cellules dendritiques et est plus limité à la surface des cellules β (Figure 15). Cependant cette expression n'est pas seulement constitutive, car les auteurs ont observé une surexpression des molécules de CMH classe I à la périphérie des cellules β, après culture des îlots dans des conditions stimulantes (Figure 15).

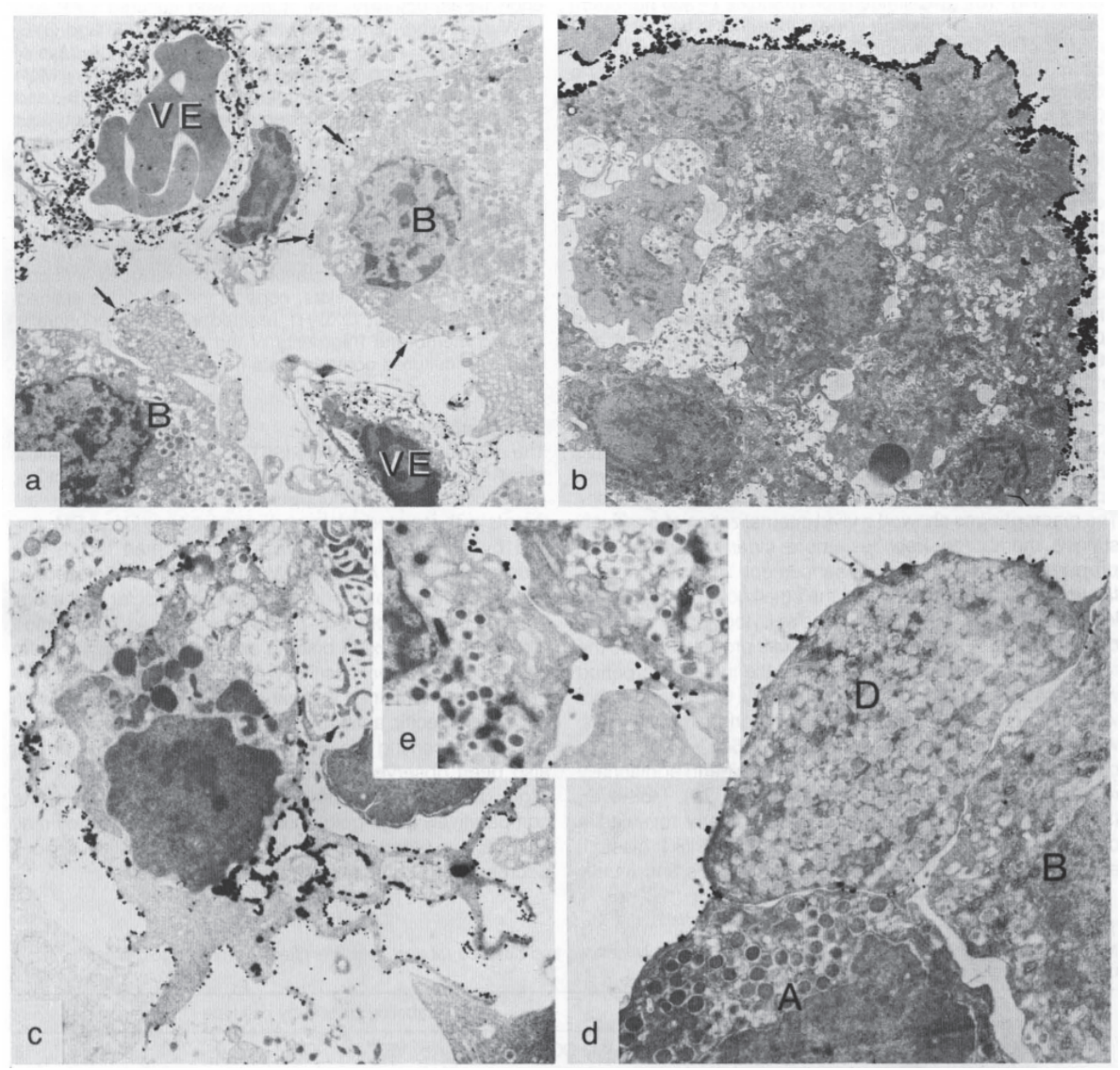


Figure 15 : Marquage des molécules du CMH de classe I et II par Immunogold-sliver, sur des îlots isolés de pancréas de rat [Von Gaudecker B.1989].

(a) Forte expression des molécules du CMH de classe II sur les cellules endothéliales du réseau vasculaire (VE) des îlots fraichement isolés, marquage plus léger à la surface des cellules β. (b) Après 4 jours de culture en présence de glucose et d'IFN-γ, l'expression des molécules de classe I est très forte à la périphérie des îlots. (c) Forte expression des molécules du CMH de classe II à la surface et dans les endosomes des macrophages contenus dans les îlots fraichement isolés. (d) Expression modérée et parsemée des molécules de classe I à la périphérie des cellules α, β, et δ. (e) Expression des molécules de classe II du CMH à la surface des cellules β, expression nettement plus visible à un fort grossissement (photo e, x8800), plutôt qu'avec un plus faible (photo b) [Von Gaudecker B.1989].

L'immunogénicité du greffon d'îlots est aussi liée au fait que la séquence d'I/R couplée au stress de l'isolement, induit le phénomène inflammatoire IBMIR responsable

d'une activation des leucocytes du receveur et des cellules dendritiques résidentes et des leucocytes passagers du greffon [Narang AS.2006]. L'émergence de cet environnement immuno-actif va favoriser le déclenchement de la réponse immunitaire ayant pour conséquence l'infiltration des cellules immunitaires du receveur au sein du greffon (Figure 16A). L'activation notamment des cellules dendritiques induit leur maturation en CPA professionnelles capables de déclencher une réponse immunitaire adaptative via la présentation des alloantigènes aux lymphocytes T [Nicolls MR.2001] [Jiang S.2004] (Figure 16B).

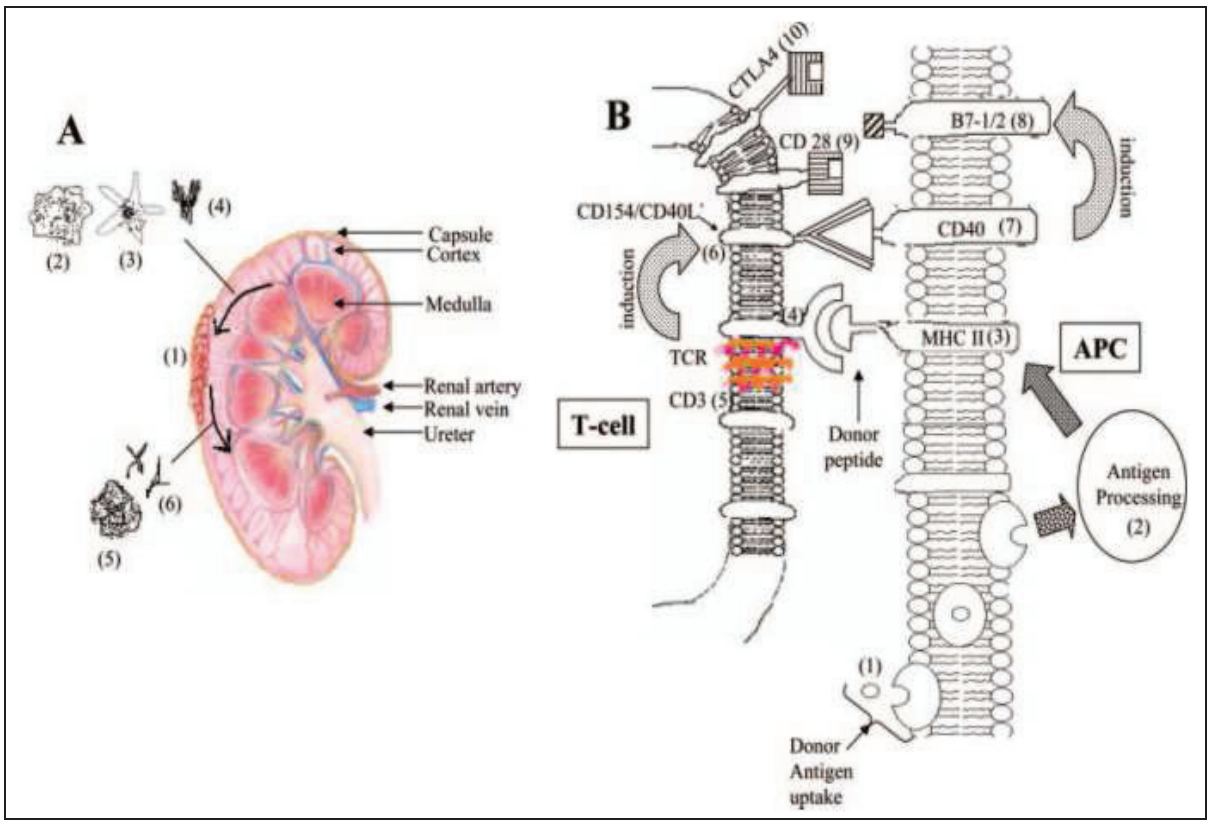


Figure 16 : Réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de l'allogreffe d'îlots [Narang AS.2006]. *Modèle expérimental d'allogreffe d'îlots de Langerhans sous la capsule rénale chez le rongeur. (A) Les îlots greffés sous la capsule rénale (1) sont infiltrés par les macrophages (2), cellules dendritiques (3) et anticorps du receveur (4). Ces cellules hôtes infiltrées qui auront capté des alloantigènes, ainsi que les leucocytes passagers du donneur (5) pourront ensuite migrés vers les organes lymphoïdes secondaires et présentés les alloantigènes du donneur aux cellules T du receveur (B). (B) Les alloantigènes présentés par les CMH de classe II (3) sont reconnus par le TCR des lymphocytes T (4). Il s'en suit une mise en place des signaux de costimulation par liaisons CD40-CD40L (6,7), puis de B7-CTLA4 ou B7-CD28 (8,9,10). [Narang AS.2006].*

L'ensemble de ces signaux, présentés dans la Figure 16, va concourir à l'activation des cellules T du receveur contre les alloantigène du greffon [Narang AS.2006]. Cette immunogénicité des îlots est caractérisée *in vitro* par le déclenchement d'une réponse alloimmune suite à une coculture îlots + Lymphocytes (MLIC), se traduisant par une activation et une prolifération des cellules T alloréactives [Stock PG.1988] [Scott MD.2004] [Giraud S.2007] [Jang JY.2004] [Lee DY.2004].

Ce modèle est donc un très bon modèle pour étudier les lésions d'I/R et la modulation de l'immunogénicité du greffon. Ce modèle expérimental permet d'apporter un début de réponses aux problématiques de la transplantation d'organe solides et de tissus.

Le modèle d'isolement-transplantation d'îlots présente l'avantage de proposer une fenêtre de culture *in vitro*, durant laquelle il est possible de moduler l'inflammation et l'immunogénicité des îlots. Cette période de culture apporte d'autres intérêts :

- elle permet d'évaluer la préservation de la fonctionnalité des îlots.
- elle permet d'agir sur la préservation de l'intégrité cellulaire et sur l'inflammation.
- elle permet d'évaluer l'immunogénicité des îlots [Deol HS.1999].
- elle est une étape aboutissant à un greffon plus pur et moins immunogène [Kuttler B.2002], dans la mesure où les leucocytes passagers activés et les cellules exocrines sont plus susceptibles à la mort cellulaire pendant la culture.
- elle permet également l'analyse des prélèvements bactériologiques et virologiques, permettant de diminuer le risque infectieux chez le receveur [Gillard P.2004].

SOLUTIONS AUX PROBLEMATIQUES CENTRALES EN TRANSPLANTATION

La séquence d'I/R aboutit donc à plusieurs phénomènes délétères pour la survie du greffon. Les lésions de conservation, initiatrices de la perte d'intégrité tissulaire, induisent des dysfonctions de reprise de fonction du greffon. Les lésions d'I/R provoquent le relargage de molécules DAMPs (issues des lésions oxydantes, d'apoptose et de nécrose), l'expression de molécules pro-coagulantes, la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, la surexpression de molécules du CMH et des molécules d'adhésion augmentant ainsi l'immunogénicité du greffon. Cette immunogénicité active rapidement et fortement le système immunitaire inné et adaptatif entraînant un rejet de l'allogreffe à plus ou moins long terme.

Afin de contrôler ces phénomènes, il existe des méthodes de conservation du greffon qui visent à limiter les lésions d'I/R et des possibilités de manipulation du système immunitaire du receveur de manière à contrôler le rejet de l'allogreffe.

5.3 La conservation du greffon ex vivo : ischémie

Les conditions de conservation des organes et des tissus, du prélèvement jusqu'à leur transplantation, et notamment l'utilisation des solutions de préservation, ont un rôle clef dans le devenir du greffon à court terme et long terme [Anaya-Prado R.2008] [Hicks M.2006] [Jamieson RW.2008] [Maathuis MH.2007]. L'objectif de la conservation d'organe est d'assurer la reprise de fonction du greffon après transplantation. Pour cela, la solution de préservation doit maintenir le métabolisme du greffon. L'hypothermie à 4°C permet de réduire les besoins métaboliques du greffon. Malgré cette faible température, les besoins de la cellule ne sont pas nuls et le métabolisme résiduel, qui est d'environ 10%, n'est pas suffisant. Aujourd'hui, il est évident que le choix de ces solutions est une étape critique en transplantation. Cette problématique mérite le développement de programmes de recherche afin de rationaliser leur composition.

Les solutions de conservation doivent répondre aux problèmes physiopathologiques liés à la séquence d'I/R, afin de prévenir un certain nombre d'événements qui vont concourir à la constitution de lésions plus ou moins réversibles [Badet L.2006] [t Hart NA.2002] [Maathuis MH.2007] :

(i) la diminution des ressources en ATP,

(ii) le déséquilibre ionique entre le compartiment intra et extracellulaire,

(iii) l'œdème cellulaire,

(iv) l'acidose cellulaire,

(v) la désorganisation des membranes cellulaires et mitochondriales,

(vi) l'apoptose et la nécrose cellulaire,

(vii) la formation de radicaux libres,

(viii) l'inflammation tissulaire consécutive.

Le rôle de la solution de conservation est de subvenir aux besoins du greffon dans des conditions hypothermiques. Idéalement la conservation doit permettre de diminuer la survenue de évènements listés ci-dessus, afin d'optimiser la conservation de la fonctionnalité et de l'intégrité tissulaire [Badet L.2006] [Maathuis MH.2007] [t Hart NA.2002]. Les bénéfices de la préservation optimisée devraient avoir pour conséquence de réduire les lésions à la transplantation, comme l'inflammation, et d'améliorer la reprise de fonction du greffon, facteurs conditionnant la durée de survie du transplant. En pratique clinique, l'idéal serait la conception d'une solution capable de répondre aux besoins de l'ensemble des organes abdominaux au cours du prélèvement multi-organes (PMO).

5.3.1 Composition de la solution de conservation

En terme de propriétés physicochimiques, les références physiologiques à 37°C pour le plasma correspondent à une osmolarité de 308 mOsmol/L, une viscosité cinématique de 1,6cSt et donc une viscosité dynamique de 1,64 mPa.s, et pour le sang une viscosité cinématique 4,5 cSt et dynamique de 4,76 mPa.s. La perfusion de l'organe au moment du prélèvement et la qualité du rinçage du lit vasculaire devraient être d'autant meilleures que la viscosité de la solution sera légèrement inférieure à celle du sang. Théoriquement afin de limiter les échanges excessifs d'eau entre le milieu intra et extracellulaire, l'osmolarité de la solution doit être comprise entre 290 et 320 mOsm/L. Cependant, les solutions à pression oncotique élevée sont généralement plus visqueuses que celles à pression oncotique basse ce qui impose de trouver un juste compromis.

En termes de composition ionique, les références physiologiques pour le plasma correspondent à une concentration de 5mM de K^+, 140 mM de Na^+ et 2,5 mM de Ca^{2+}. Historiquement, les solutions de conservation utilisées sont hyperpotassiques (de type intracellulaire). Ces solutions riches en potassium, telle que l'UW (Viaspan), entraînent une dépolarisation cellulaire, induisant une vasoconstriction, et donc une augmentation des

pressions de perfusion et une diminution du débit sanguin pendant la reperfusion, conduisant à une mauvaise revascularisation et amplifiant ainsi le phénomène de "no-reflow".

La forte concentration en potassium extracellualire perturbe l'équilibre ionique de part et d'autre de la membrane cellulaire qui va entraîner une accélération du fonctionnement des pompes ioniques (Na^+/K^+ ATPase) dans le but de rétablir les concentrations ioniques. Ce fonctionnement intensif des pompes va consommer une quantité importante d'ATP alors que la cellule n'est pas dans les meilleures conditions pour la synthèse d'ATP (due à l'hypoxie et l'hypothermie). La première conséquence néfaste est l'acidose métabolique liée à la dégradation de l'ATP, principale source de protons H^+, génératrice d'acidose. Cette acidose va participer à la dégradation des structures cellulaires et à la génération d'espèces radicalaires oxygénées. La seconde conséquence délétère est l'œdème intracellulaire conditionné en parti par l'arrêt du fonctionnement des pompes ATP dépendantes, laissant place à la diffusion passive des ions à travers la membrane et aux mouvements d'eau de part et d'autre de la membrane cellulaire. Idéalement, afin d'éviter ces désagréments, la solution de conservation doit mimer les concentrations ioniques du plasma.

Le Ca_2^+ joue également un rôle important. Durant la phase d'ischémie, le stress cellulaire va mettre en péril le précieux équilibre des gestions du Ca_2^+ intracellulaire au niveau du cytosol, du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie. Par conséquent, on assiste à une importante augmentation du Ca_2+ intracellulaire libre qui, en absence d'ATP, ne peut être régulé par les transporteurs ioniques ATP dépendants [Rauen U.2004]. A la reperfusion, le retour à la normothermie favorise ainsi l'activation des différentes protéases cytolytiques calciques dépendantes, comme la calpaïne, qui altérent la structure de la cellule [Salahudeen AK.2004b] [Salahudeen AK.2004a] [Rauen U.2004] [Jamieson RW.2008] [Jassem W.2004] et induisent d'irréversibles lésions d'I/R [Auger S.2003].

L'acidose liée à l'hydrolyse de l'ATP et à l'accumulation de métabolites doit être contrôlée. L'utilisation d'un tampon est donc indispensable pour amortir les variations du pH du compartiment intravasculaire, interstitiel et cellulaire [Southard.1995]. Les principaux tampons utilisés sont les tampons bicarbonate, phosphate, histidine, HEPES et tryptophane [Southard JH.1995] [Southard JH.1993] [Southard JH.1989].

Le glucose est un élément vital pour répondre aux besoins énergétiques de la cellule. Cependant sa dégradation est une importante source de lactate provoquant une acidose intracellulaire [Kallerhoff M.1987]. Le glucose est donc un élément essentiel dont la concentration dans la solution ne doit pas être exagérée.

Comme décrit précédemment, l'œdème intracellulaire et interstitiel, généré durant la période d'I/R, conduit à une dégradation de la matrice extracellulaire puis à une sévère altération de la viabilité cellulaire. L'œdème entraîne, par ailleurs, une compression du lit vasculaire et une augmentation des résistances vasculaires, ce qui va diminuer le débit de perfusion de l'organe au moment de la reperfusion [Badet L.2006]. Au niveau intracellulaire, l'œdème entraîne un gonflement mitochondrial qui s'accompagne d'un dysfonctionnement du métabolisme aérobie, d'une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés et d'une destruction des membranes cellulaires. La présence, dans le milieu extracellulaire, de molécules exerçant une pression oncotique permettant d'éviter l'œdème est donc indispensable pour optimiser la qualité d'un liquide de conservation [Hauet T.2008] [Badet L.2006]. Dès le début des années 70, les travaux de Robinson, puis ceux de Daniel et Wakerley, avaient suggéré que pour permettre une survie cellulaire de plusieurs heures, l'ajout d'une molécule non toxique exerçant une pression oncotique est une composante essentielle dans la solution de conservation [Robinson JR.1971] [Robinson JR.1975] [Daniel M.1976].

Il est classique de diviser les molécules limitant l'œdème en deux familles :

- Les imperméants qui sont soit des sucres (raffinose, sucrose, mannitol, …) qui limitent la formation de l'œdème intracellulaire par la pression osmotique qu'ils exercent dans le compartiment vasculaire, soit des anions tels que le citrate, le gluconate ou l'acide lactobionique qui présentent par ailleurs un effet protecteur de membrane.

- Les colloïdes (hydroxyéthyl-amidon, polyéthylène glycol, albumine, dextran …) qui ne peuvent pas passer la membrane cellulaire et qui préviennent, par la pression oncotique qu'ils exercent, la constitution d'un œdème interstitiel. Leur utilisation semble bénéfique, en particulier pour des temps d'ischémie longs. L'albumine serait la molécule la plus physiologique, cependant, son obtention résulte d'un processus long et très coûteux. Les colloïdes de synthèse semblent plus accessibles. L'hydroxyethyl-starch (HES), contenu dans l'UW, présente une toxicité tubulaire [Brunkhorst FM.2008] [Thomas G.2008] [Baatard R.1993] et induit l'agrégation des érythrocytes [Panzera P.2005] [van der Plaats A.2004], pouvant aboutir à des dysfonctions du greffon. Il est donc nécessaire d'utiliser un colloïde, atoxique, sans conséquences néfastes sur la structure et la fonctionnalité du greffon. La molécule de PEG présente trois caractéristiques majeures. Premièrement (i), c'est une molécule neutre, atoxique et non immunogène. Deuxièmement (ii), elle exerce une pression oncotique limitant l'œdème cellulaire et tissulaire [Robinson JR.1971] [Robinson JR.1975]

[Ganote CE.1977] [Daniel M.1976] [Ganote CE.1977]. Troisièmement (ii), elle présente des capacités immunoprotectrices, de par sa fixation à la membrane cellulaire où elle dissimule les antigènes de surface par un effet d'immunocamouflage [Giraud S.2007] [Eugene M.2004]. Cet effet immunoprotecteur a été confirmé expérimentalement pour le cœur [Wicomb WN.1990] [Wicomb WN.1989] [Collins GM.1991], le foie [Tokunaga Y.1992], l'intestin [Itasaka H.1994], le pancréas [Zheng TL.1991], le rein [Hauet T.2002] et le poumon [Jayle C.2002] [Jayle C.2003], les îlots pancréatiques [Giraud S.2007] [Scott MD.2004] [Lee DY.2004], les leucocytes [Scott MD.2004] et les globules rouges [Bradley AJ.2002] [Murad KL.1999b] [Scott MD.1997] [Scott MD.1998] [Scott MD.2000] [Murad KL.1999a].

Le fait que les solutions de conservation doivent au moins être pourvues d'un imperméant ou d'un colloïde est acquis. Classiquement les imperméants sont utilisés pour des périodes courtes de conservation et les colloïdes pour des périodes plus longues, mais de manière générale, les colloïdes sont plus polyvalents. Les solutions ne contenant pas de colloïdes, ne préviennent pas la génération d'un œdème cellulaire et d'une inflammation au niveau du greffon [Hauet T.2002] [Hauet T.2001] [Faure JP.2002]. Il n'est pas établi cependant de façon indiscutable que l'utilisation de plusieurs de ces molécules associées soit nécessaire, même si certaines idées le suggèrent [Maathuis.2007].

5.3.2 Historique des solutions de conservations

Au cours des premières transplantations rénales à partir de donneurs vivants réalisées dans les années 50, les organes étaient refroidis par contact et quelquefois lavés avec du Ringer. A la fin des années 60, l'augmentation des temps d'ischémie suite au développement du prélèvement sur des donneurs en état de mort encéphalique, pousse un certain nombre de centres à s'intéresser aux solutions de conservation. C'est ainsi qu'en 1969, le groupe de Collins met au point le premier liquide de conservation [Collins GM.1969], qui sera ensuite modifié dans le réseau Eurotransplant pour devenir l'Eurocollins (addition de glucose et suppression du magnésium qui précipitait durant le stockage). A la fin des années 80, Belzer et son équipe développent une nouvelle solution, Solution de l'Université du Wisconsin (UW) qui tente d'améliorer les résultats très inégaux obtenus avec l'Eurocollins et particulièrement les échecs en transplantation hépatique et pancréatique. L'utilisation de ce liquide de type hyperpotassique, va marquer un tournant dans le concept de la solution de conservation. Son utilisation en pratique clinique va véritablement donner un nouvel élan à la greffe d'organes

solides [Vreugdenhil PK.1992] [Wahlberg JA.1987]. Ce liquide permet d'augmenter considérablement les temps d'ischémie, et également d'améliorer significativement les résultats immédiats de la greffe rénale [Ploeg RJ.1988], hépatique [Todo S.1989] et pancréatique [Wahlberg JA.1987]. A partir de ce moment, l'UW est devenue la solution de préservation de référence et plusieurs études en transplantation hépatique et rénale comparant l'UW à l'Eurocollins renforçaient cette tendance [Moukarzel M.1990] [Ploeg RJ.1992] [Roels L.1998]. Au cours des années 90, en même temps que la position de la solution UW en pratique clinique se renforçait, la recherche biomédicale permettait de mettre en évidence que les solutions de type intracellulaire, riches en potassium, présentaient un certain nombre d'inconvénients et que la solution UW était très probablement perfectible [Moen J.1989] [Lodge JP.1991]. Des arguments expérimentaux indiscutables permettent aujourd'hui de considérer que la modification de la solution UW de composition extracellulaire (inversion des concentrations de Na^+ et de K^+) donne, dans des modèles expérimentaux de référence, de meilleurs résultats que la solution UW originale de type intracellulaire (hyperpotassique) [Moen J.1989] [Hauet T.2003].

Cette remise en question de la composition de la solution de conservation est apparue à la fin des années 80, ceci afin de répondre aux problèmes rencontrés avec certaines solutions existantes : notamment les désagréments rencontrés avec les solutions ne contenant pas d'imperméants ou de colloïdes qui donnent de mauvais résultats cliniques pour le rein, le foie, le pancréas et l'intestin. En effet, les résultats obtenus avec la solution Eurocollins, solution hyperpotassique ne contenant pas de colloïde, ont montré que cette solution était responsable d'une entrée massive d'eau dans la cellule et dans le milieu interstitiel au cours de la phase d'hypothermie et d'une vasoconstriction diffuse de la microcirculation pendant la phase de reperfusion. De plus, cette solution riche en ions phosphates et en glucose est une solution hyper-osmolaire à l'origine de lésions cellulaires due à l'entrée du glucose dans la cellule [Jamart J.1983]. Ce glucose une fois métabolisé entraîne une production de lactate provoquant une acidose intracellulaire [Jamart J.1983] [Kallerhoff M.1987]. L'inversion des concentrations ioniques Na^+ et K^+ oblige la cellule à rétablir l'équilibre physiologique, conduisant à une pénurie des ressources en ATP à l'origine d'une acidose et d'un œdème intracellulaire. Cette remise en question de la composition des solutions tente aussi de répondre aux problèmes rencontrés avec l'Hydroxyethyl-starch (HES), colloïde contenu dans la solution UW, dont la néphrotoxicité a été mise en évidence au début des années 90 [Legendre C.1994] [Legendre C.1993] [Cittanova ML.1996].

L'alternative aux problèmes de conservations des transplants semblerait être l'utilisation d'une solution de préservation optimisée. Idéalement cette solution devrait respecter plusieurs critères :

- respecter les concentrations ioniques du plasma (5mM de K^+ et 140 mM de Na^+),

- contenir du glucose en proportions raisonnables pour répondre aux besoins énergétiques résiduels,

- contrôler les variations du pH,

- prévenir la formation d'un œdème par la présence d'un colloïde de synthèse neutre et atoxique exerçant une pression oncotique.

Dès lors, à partir de 1991, plusieurs travaux ont fait naître de nouvelles compositions de solutions de conservation comprenant notamment des innovations sur les compositions ioniques et colloïdes.

5.3.2.1 Les solutions de quatrième génération

Dans le but d'optimiser la conservation de cellules, de tissus et d'organe, de nombreuses études se sont intéressées à définir les meilleures conditions de conservation en commençant pas déterminer quel serait le meilleur moyen de limiter l'œdème cellulaire et tissulaire. C'est pourquoi de nouveaux colloïdes de synthèse, neutres et atoxiques, ont tout naturellement été évalués, et en particuliers les PEG.

Les premiers travaux publiés sur la prévention, par les PEG, de l'entrée d'eau dans la cellule, furent les travaux de Robinson en 1971. Dans son étude, des "tranches" de cortex de reins de rats adultes ont été équilibrés pendant 24h et 48h au réfrigérateur à 4°C dans des solutions contenant 5 mM K^+, 2,5 mM de Ca_2^+ et Mg_2^+, tampon phosphate M/15 (pH 7,4), 5 mM de cyanure et iodoacétate avec 5, 6, 7 ou 8% de polyéthylène glycol (PEG 6 kDa) et 77, 154, 308, 462 ou 770 mM NaCl. Les tranches qui contenaient le plus d'eau après la stimulation étaient celles conservées avec les concentrations les plus faibles de NaCl et de PEG. L'augmentation de la teneur en eau induite par l'abaissement de la concentration en NaCl a été empêchée par l'ajout d'une plus forte concentration de PEG. Les auteurs ont suggéré que le PEG 6 kDa a été d'autant plus efficace que le NaCl, osmole pour osmole, car le PEG agit comme un soluté non pénétrant exerçant une pression oncotique, tandis que le NaCl pénètre dans la cellule et perturbe l'équilibre ionique [Robinson JR.1971] [Robinson JR.1975] [Robinson JR.1978]. En 1976, dans le but de participer à la définition d'un milieu approprié

pour la conservation d'organes en hypothermie, les travaux de Daniel et Wakerley ont montré que la présence d'un colloïde non toxique comme le PEG 20 kDa était essentielle au cours de la conservation permettant ainsi de conserver la viabilité cellulaire des cellules rénales porcines [Daniel M.1976]. En 1977, le PEG 6 kDa a été décrit comme une molécule limitant l'entrée d'eau dans la cellule lors de la conservation de coupes de tissus cardiaques de rat, permettant de limiter les lésions irréversibles induites par l'hypothermie et l'anoxie [Ganote CE.1977]. Dans un modèle d'hépatocytes de rat isolés et conservés durant 24h en hypothermie, la présence du PEG 8 kDa supprime la formation d'un œdème cellulaire et réduit la mortalité cellulaire [Marsh DC.1989]. De plus, dans un autre modèle de conservation d'hépatocytes de rat, l'ajout de PEG a permis de maintenir la viabilité cellulaire en association avec une meilleure préservation de l'organisation des microfilaments d'actine et une protection de la structure des microtubules [Stefanovich P.1995].

La première étude expérimentale utilisant des PEG comme colloïde durant la conservation d'organe entier fut publiée en 1989. Dans cette étude, les auteurs ont remplacé l'HES contenu dans la solution UW par du PEG 20 kDa 50 g/L, dans un modèle de préservation de greffons cardiaques de lapins. Les résultats obtenus ont montré que la conservation avec des PEG permettait une meilleure préservation de la fonction ventriculaire (meilleur rapport de volume de liquide de perfusion acellulaire pompé par le cœur à la minute, "Cardiac Output"), par rapport à une conservation avec l'UW ou encore avec le Plegisol (St Thomas modifiée) [Wicomb WN.1990].

La première étude clinique utilisant des PEG comme colloïde durant la conservation d'organe entier fut publiée en 1989 dans le Lancet par l'équipe de Collins. Dans cette étude pionnière basée sur 20 patients, les auteurs ont observé une diminution significative du nombre de rejets aigus des greffons cardiaques allogéniques conservés avec la solution St Thomas modifiée par l'ajout de 50 g/L de PEG 20 kDa, par rapport à la solution St Thomas originelle. L'ajout des PEG dans cette solution a été réalisé dans le but d'exercer une pression oncotique pour éviter l'œdème cellulaire. De manière surprenante, la survie à 1 an des greffons préservés avec les PEG était de 95,5% par rapport à 50% avec la solution sans PEG [Collins GM.1991]. Suite à ces résultats, Collins suggéra alors pour la première fois un effet immunoprotecteur des PEG en transplantation. Cette même équipe étendra par la suite ces études à la préservation de foie [Tokunaga Y.1992], de cœur [Wicomb WN.1989], d'intestin [Itasaka H.1994] et de pancréas [Zheng TL.1991], expériences pour lesquelles les mêmes propriétés immunoprotectrices des PEG furent observées. Au début des années 90, à partir de

ces données, plusieurs études ont tenté d'introduire des PEG dans de nouvelles ou déjà existantes solutions de conservation d'organes ou de tissus.

Au milieu des années 90, sur la base des travaux de Collins, une nouvelle a été développée : la solution SCOT pour Solution de Conservation des Organes et des Tissus. Cette solution est de type extracellulaire et contient entre autres 140 mM de Na^+, 5mM de K^+, 1,75mM de $Ca2^+$, 11 g/L de glucose, un tampon bicarbonate et 30g/L de PEG 20kDa comme colloïde (concentration choisie en corrélation avec la viscosité plasmatique). Dans un premier temps, cette solution, à laquelle on peut ajouter du 2,3- butanedione-monoxime (2,3 Bdm), était destinée à la cardioplegie et à la transplantation cardiaque, domaines dans lesquels les premiers bénéfices ont pu être constatés [Bauza G.1996b] [Bauza G.1996a]. Parallèlement, cette solution a été évaluée pour le transport et la cryopréservation de gros troncs artériels humains. Les résultats ont montré une stabilité mécanique comparable à celle observée avec des allogreffons frais [Knosalla C.1998] [Eugene M.1998]. Par la suite, dans le but de développer une solution multi-organes et multi-tissus, l'évaluation de cette solution a été étendue aux organes abdominaux et thoraciques, ainsi qu'aux tissus (solution sans 2,3 BDM). Cette solution a été évaluée dans le contexte de la conservation de foie de rat isolé perfusé : les données ont montré que la conservation avec SCOT versus UW était moins délétère pour la préservation de l'ultrastructure des mitochondries et du réticulum des hépatocytes [Gibelin H.2002]. De plus dans ce contexte, cette solution permettait une diminution de l'activité des Transaminases [Gibelin H.2002]. Dans un modèle de poumon de porc isolé perfusé, la conservation avec la solution SCOT a permis de réduire l'œdème mitochondrial et cellulaire, et de préserver les résistances vasculaires pulmonaires en comparaison avec les solutions UW et Eurocollins [Jayle C.2002]. Cette solution a également permis de significativement réduire le relargage de métabolites cellulaires ainsi que l'acidose dans le liquide broncho-alvéolaire [Jayle C.2002] [Jayle C.2003].

Parallèlement, l'évaluation de cette solution s'est étendue à la conservation rénale dans un modèle préclinique porcin. Dans un modèle de rein de porc isolé perfusé durant 48h à 4°C, la solution SCOT a permis de réduire significativement la lipoperoxidation par rapport aux solutions UW et Eurocollins [Eugene M.1997]. Suite à une conservation extra-corporelle de reins de porc durant 48h à 4°C puis à une autotransplantation, cette même équipe a montré que la conservation avec SCOT versus UW permettait une réduction des lésions tubulaires en histologie, telles que la perte de la bordure en brosse et l'œdème cellulaire. Ces travaux ont également permis de caractériser les bénéfices de cette solution sur la réponse immunitaire

innée. En effet, les auteurs ont montré une inhibition de l'expression des molécules du CMH de classe II au niveau des cellules épithéliales tubulaires après 7 jours de transplantation, corrélée à une importante réduction de l'infiltrat tissulaire par les cellules T $CD4^+$, T $CD8^+$ et macrophages entre 2 et 8 semaines après greffe. Ces données ont montré que les lésions étaient plus aggravées en absence de colloïde et lorsque la solution était de type hyperpotassique. Cet effet lésionnel est inversé lorsque la solution contient du PEG 20 kDa 30 g/L et/ou lorsqu'elle est de type extracellulaire (K^+ à 5 mM) [Hauet T.2002]. Dans ce même modèle, après conservation du greffon avec Eurocollins, UW ou SCOT, les auteurs ont mis en évidence à 1, 2, 4 et 12 semaines après autotransplantion, une diminution significative du niveau d'expression des molécules VCAM-1, E-Selectine et CMH de classe II au sein du tissu rénal conservé avec SCOT [Faure JP.2002]. Dans cette étude, les auteurs ont comparé les effets de la solution contenant soit 30 g/L soit 50 g/L de PEG 20 kDa. Les résultats de l'effet dose sur l'expression de ces marqueurs de l'inflammation sont en faveur de la concentration de 30 g/L. Il en est de même pour les résultats concernant la préservation du métabolisme rénal, les lésions histologiques post reperfusion et l'infiltration de cellules immunitaires [Faure JP.2002]. Le rôle protecteur du PEG 20 kDa à 30 g/L a été démontré par cette équipe, avec : (i) une nette amélioration de la reprise de fonction et de la préservation de l'intégrité tissulaire du greffon rénal [Hauet T.2001], (ii) une importante réduction de l'immunogénicité et de l'inflammation précoce, effet persistant durant les 3 premiers mois après autotransplantation [Faure JP.2004] [Faure JP.2002] [Hauet T.2000] [Hauet T.2002], et (iii) une réduction des lésions de dysfonction chronique du greffon, telles que l'inflammation, l'atrophie tubulaire, la transition épithélio-mesenchymateuse et la fibrose interstitielle [Faure JP.2004] [Thuillier R.2011b].

C'est ainsi que depuis les années 80 plusieurs solutions de conservation ont vu le jour. Leurs compositions sont très différentes et on distingue trois grandes familles :

- les solutions, dites de type intracellulaires, à concentration en potassium (K) supérieure à 6 mM et à concentration en Sodium (Na) inférieure à 100 mM, telle que l'UW.
- les solutions, dites de type extracellulaires, à concentration en K inférieure à 6 mM et à concentration en Na supérieure à 100 mM, telle que SCOT.
- les solutions, dites de type intermédiaires, à concentration en K supérieure à 6 mM mais inférieure à 30 mM, telles que Celsior, IGL-1, Polysol, Lifor et HTK.

Chacun de ces trois groupes inclut des solutions cristalloïdes pures ou contenant des imperméants et/ou colloïdes (Tableau 12).

Tableau 12 : Compositions des solutions de conservation couramment utilisées transplantation et comparées à la composition du sang.

Solutions	Plasma	Solution de type Intra-cellulaire	Solutions de type Intermediaire					Solutions de type Extracellulaire		
Composition	Plasma	UW (Belzer) (Viaspan)	IGL-1	Polysol	Celsior	Lifor	HTK (Custodiol)	CMRL-1066 + 1% BSA	HBSS +0.5% BSA	SCOT 15
Ions (mM)										
Na^+	140	30	125	120	100	98	15	144	119	118
K^+	5	125	30	15	15	15.8	10	5.3	2.1	5
Mg^{2+}	0.8	5	5		13		4	0.8	1.08	1.20
Ca^{2+}	2.5				0.25	0.17	0.015	1.8	0.9	1.75
Cl^-	104						50	126	3	
Tampons (mM)										
$SO4^{2-}$	1.4	5	5		1,2				1.08	
KH^2PO4	3.2	25	25			+		1	2.16	
HCO3-	25							26	25	25
HEPES				24		+				
Histidine				6.3	30		198	0.12		
Na3PO4				21.7						
Molécules (mM)						?				
Adenosine		5	5	5		0.01				
Allopurinol		1	1							
Alpha-tocopherol				5×10^{-5}						
Ascorbic acid				0.11				0.28		
Cholestérol								0.0005		
Coenzyme A								0.003		
Glucose	7							6	10.8	11
Glutamate					20			0.51		
Glutathion		4	3	5.6	3			0.032		
α-Ketoglutarate							1			
Lactobionate		100	100		80					
Mannitol					60		30			
Potassium gluconate				20						
Pyruvate de Na										
Raffinose		30	30	3.2						
Ribose										
Sodium Gluconate				75						
Tryptophan							2	0.048		
Colloïdes (g/L)						?				
HES		50								
PEG 20 kDa										15
PEG 35 kDa			1	20						
Albumine	42							10	5	
Physico-chimie										
pH	7.4	7.3	7.3	7.4	7.3	7.07	7.2	7.2	7.4	7.3
Viscosité (cSt) à 4°C		5.34	1.92		2.03		1.71	1.64	1.69	3.12
Viscosité (cSt) à 20°C	1.84	3.22	1.19		1.21		1.12	1.06	1.06	1.41
Viscosité (cSt) à 37°C		1.98	0.84		0.82		0.8	0.73	0.72	1.2
Osmolarité (mOsm)	308	327	298		320		310	301	32	337

5.3.2.2 Le Polyéthylène glycol (PEG)

Le Polyéthylène glycol (PEG) est un polymère de polyéther linéaires synthétisé à partir de monomères d'éthylène glycol, et contenant un groupement hydroxyle terminal. Sa formule chimique est la suivante : $HO\text{-}(CH_2CH_2O)_nCH_2\text{-}CH_2\text{-}OH$. Son poids moléculaire dépend du nombre de groupes d'éthylène oxyde. Le PEG est soluble dans l'eau et dans les milieux aqueux. Les chaînes de polymère sont très hydratées et chaque monomère lie 2 à 3 molécules d'H_2O.

Le PEG est une molécule neutre, non immunogène et atoxique [J D.1992] [Fruijtier-Polloth C.2005] [Descorps J.1992], non délétère pour le métabolisme cellulaire [Lee DY.2004] [Hauet T.2002] [Panza JL.2000], assurant même une importante viabilité cellulaire [Killinger WA, Jr.1992]. Le PEG se fixe de façon électrostatique à la membrane cellulaire. Certains travaux suggèrent une fixation des PEG sur les lipides membranaires [Boni LT.1984]. L'adsorption à la membrane cellulaire dépend du poids moléculaire du PEG. La présence de PEG à la surface cellulaire est à l'origine d'un phénomène de structuration des molécules d'eau autour d'elle sur 6 à 8 couches [Greenwald RB.2001]. Il hydrate la membrane, la stabilise et la rend moins perméable aux solutés extracellulaires [Wicomb WN.1990] [Zeng Y.1994]. Il est très clairement établi que le PEG exerce une pression oncotique limitant l'œdème tissulaire, cellulaire et mitochondriale, préservant ainsi le métabolisme et l'intégrité cellulaire durant la conservation [Schiller LR.1988] [Hauet T.2002] [Faure JP.2002] [Bauza G.1996a]. Il permet de conserver à basse température (4°C) le métabolisme cellulairen, l'ultrastructure cellulaire et l'architecture tissulaire [Collins GM.1992] [Hauet T.1998] [Eugene M.1997].

Des propriétés antioxydantes des PEG ont également été observées. Ainsi, dans un modèle de conservation d'hépatocytes de rat, le remplacement de l'HES par des PEG 8 kDa, dans la solution d'UW, permet une diminution de la peroxydation lipidique au cours de la conservation hypothermique des hépatocytes [Mack JE.1991]. Un effet protecteur des PEG 20kDa sur la diminution de péroxydation des lipides après 24 à 48h d'ischémie froide et 90 min de reperfusion, a également été décrit dans un modèle de rein de rat isolé perfusé [Hauet T.2001]. Les capacités antioxydantes propres aux PEG n'étant pas prouvées, nous pouvons suggérer que la diminution du stress oxydant observée en présence de PEG pourrait être liée à la protection apportée par ce colloïde contre les dommages tissulaires induits par la conservation hypothermique et notamment les bénéfices quant à la préservation de l'intégrité de la mitochondrie, un des principaux sites générateurs de ROS.

5.4 PEG et immunoprotection

Un avantage non négligeable des PEG est la diminution du niveau d'expression des marqueurs de l'inflammation et de la réponse immunitaire du receveur vis-à-vis d'un greffon préservé avec une solution contenant des PEG, et particulièrement avec les PEG 20 kDa. La préservation avec des PEG 20kDa a permit la diminution de l'expression des molécules inflammatoires à la surface de l'endothélium rénal, telles que VCAM-1 et E-Selectine, limitant ainsi l'intensité de l'infiltrat des cellules immunitaires, et ceci dès 7 jours après reperfusion et jusqu'à 12 semaines [Hauet T.2002] [Faure JP.2002]. Ces observations pourraient expliquer le prolongement significatif de la durée de survie des greffons cardiaques chez l'homme, après conservation avec 50 g/L de PEG 20kDa versus 50 g/L d'HES [Collins GM.1991]. Les travaux de l'équipe d'Itasaka ont montré, au cours de la transplantation d'intestin chez le rat, que le PEG 20kDa avait un effet immunoprotecteur permettant une prolongation de la durée de survie du greffon [Itasaka H.1994] [Itasaka H.1992].

Cet effet immunoprotecteur pourrait être expliqué par la théorie de l'immunocamouflage proposée par Michel Eugène pour des PEG non réactifs [Eugene M.2004] et par l'équipe de MD Scott pour des PEG réactifs [Scott MD.1997] [Scott MD.1998].

La présence de PEG à la surface cellulaire est à l'origine d'un important phénomène de structuration des molécules d'eau. L'encombrement spatial de cette structuration pourrait expliquer le rôle immunomasquant du PEG, dissimulant ainsi les antigènes de surface en créant un nuage à la surface cellulaire [Eugene M.2004]. Cet effet immunomasquant dépend des propriétés d'adsorption des PEG à la membrane. Les PEG couramment utilisés pour l'agrégation ou la fusion sont des PEG de "petite" taille, inférieure à 8 kDa [Hui SW.1999]. Les PEG de haut poids moléculaires sont eux préférentiellement adsorbés à la membrane cellulaire, par conséquent ils devraient être efficaces pour le masquage antigénique [Eugene M.2004]. La hauteur de la synapse immunologique est estimée à 15 nm [Dustin ML.2002], le PEG 20 kDa lorsqu'il est adsorbé à la membrane cellulaire, crait quant à lui un groupement dont la hauteur est estimée à 20 nm [Eugene M.2004] [Hauet T.2008]. La taille des PEG détermine leur encombrement spatial, proportionnel au masquage des protéines de surface. Le PEG 20 kDa devrait ainsi posséder un pouvoir immunocamouflant plus important que le PEG 8kDa. En effet, l'équipe de Hitasaka a montré dans un modèle de transplantation d'intestin chez le rat que la conservation du greffon avec des PEG 20kDa a nettement augmenté la durée de survie du transplant, immunoprotection non observée avec les PEG 8kDa [Itasaka H.1994].

De plus en adéquation avec leurs propriétés immunomasquantes, les molécules de PEG forment à la surface des cellules, des groupements amphiphiles exerçant une répulsion stérique, repoussant les protéines [Peracchia MT.1999], notamment l'Albumine sérique [Quellec P.1999]. La présence de PEG à la surface des nanoparticules montre, *in vivo*, une réduction d'interaction avec les cellules mononuclées phagocytaires, augmentant la durée de survie des nanoparticules dans la circulation sanguine [Peracchia MT.1999] [Gref R.1997] [Mosqueira VC.1999]. Le nombre important de molécules d'eau liées sur les grandes chaines de PEG contribue à créer un volume d'exclusion pouvant prévenir la fixation de molécules avoisinantes [Eugene M.2004].

Une des limites des PEG est la courte durée de "fixation" à la membrane cellulaire du fait des liaisons électrostatiques. Pour obtenir une liaison covalente, rendant ainsi possible une fixation durable, le PEG peut être rendu "réactif". Pour cela un groupement terminal OH peut être remplacé par un groupement methoxy (mPEG), et le second groupement terminal OH est remplacé par un groupement chimiquement réactif qui vont réagir avec les molécules de la membrane cellulaire et notamment les résidus lysine. Il existe différentes molécules de PEG réactifs en fonction de la nature du groupement organique : le cyanuric chloride mPEG (C-mPEG), le benzotriazole carbonate methoxyPEG (BTC-mPEG), le Succinimidyl propionic acid PEG NHS (SPA-mPEG), le PEG-isocyanate (PEG-ISO), le PEG diisocyanate (PEG-DISO)…

Le PEG réactif rend ainsi possible la fixation de PEG de faible poids moléculaire à la surface cellulaire. Les propriétés immunoprotectrices sont conservées, le PEG formant toujours un encombrement spatial immunomasquant à la surface cellulaire. Les travaux pionniers de l'équipe d'Abuchowski en 1977, ont démontré que la fixation covalente de PEG à la surface d'une protéine soluble permet de réduire significativement son immunogénicité (diminution de la fixation et de la production d'anticorps spécifiques), et ainsi prolonge sa durée de survie dans la circulation vasculaire dans des conditions xenogéniques [Abuchowski A.1977]. Par la suite, plusieurs travaux se sont attachés à valider l'étendue de ces propriétés immunoprotectrices des PEG réactifs, et notamment sur des cellules circulantes. En 1998, l'équipe de Scott et Murad, a d'ailleurs suggéré une théorie sur les propriétés immunomasquantes des PEG réactifs [Scott MD.1998], après avoir constaté la diminution de fixation d'anticorps dirigés contre le groupe ABO à la surface des globules rouges recouvertes de C-mPEG 5kDa, ainsi que la diminution de leur phagocytose par des cellules immunitaires hétérologues [Scott MD.1997]. Ces données ont été confirmées par cette même équipe

[Murad KL.1999b] [Bradley AJ.2002] [Scott MD.2000]. A la suite de ces travaux, l'équipe de Scott a étendu ces recherches à d'autres cellules et tissus. Ils ont constaté ces mêmes propriétés d'immunocamouflage à la surface des leucocytes, des splénocytes et des îlots de Langerhans, prévenant ainsi l'alloreconnaissance par les cellules immunitaires [Scott MD.2004] [Wang D.2011]. De plus ces travaux ont montré que la fixation de PEG réactifs à la surface des îlots pancréatiques permettait d'augmenter la durée de survie de ceux-ci après injection dans le système porte chez le rat, modification n'altérant en rien la fonctionnalité des îlots [Scott MD.2004].

Parallèlement, plusieurs travaux ont montré, *in vitro*, qu'en présence de PEG réactifs sur la paroi vasculaire, l'adhésion des plaquettes à la surface pro-coagulante est diminuée par un phénomène lié au masquage des protéines d'adhésion par le PEG Diisocyanate 3400 Da [Deible CR.1998] [Burchenal JE.2002] [Xu H.2006].

Les capacités immunomasquantes de la synapse immunologique par les PEG réactifs ont, par ailleurs, été clairement mises en évidence par l'importante réduction de l'alloreconnaissance et de la prolifération des lymphocytes T allogéniques en présence de splénocytes irradiés recouverts de C-mPEG 5 kDa [Scott MD.2004]. De plus, la fixation d'anticorps anti CD28 à la surface des PBMC est inhibée en présence de C-mPEG 5 kDa, tout comme la fixation d'anticorps dirigés contre les antigènes du système ABO des globules rouges en présence [Scott MD.2004].

En 2004, l'équipe de Lee a également constaté une diminution significative de l'activation des lymphocytes et des splénocytes vis à vis d'îlots pancréatiques recouverts de mPEG-SPA 5kDa, modification qui pour autant n'empêche pas l'infiltration de molécules cytotoxiques secrétées par les macrophages [Lee DY.2004] [Jang JY.2004].

L'ensemble de ces travaux montre clairement le rôle primordial de la composition d'une solution de conservation et notamment de sa charge ionique et de la nature du colloïde employé, qui, comme le PEG, joue un rôle immunoprotecteur en plus de ses capacités à limiter l'œdème cellulaire et tissulaire.

5.5 La notion de Tolérance

La tolérance désigne la capacité à accepter ce que l'on devrait normalement refuser. En immunologie, la tolérance est la capacité d'un organisme à accepter la présence de corps

étrangers dans son environnement. Cette tolérance a une importance capitale dans le processus de greffes d'organes.

5.5.1 Retard du rejet d'allogreffe : La tolérance immunitaire

Les médicaments immunosuppresseurs utilisés en transplantation ont considérablement réduit le nombre d'épisodes de rejet aigu du greffon, mais demeurent sans effet évident sur le rejet chronique, qui reste la cause la plus importante de perte de fonction des greffons à long terme. Ils imposent néanmoins aux patients la prise permanente de médicaments aux effets secondaires sévères liés à la toxicité des molécules thérapeutiques. Une limite de ces médicaments immunosuppresseurs, administrés de manière chronique, sont leurs effets non spécifique des alloantigènes du greffon. Ces traitements ont donc pour impact d'affaiblir les défenses immunitaires, les patients deviennent légèrement immunocompétents, les rendant plus sensibles aux infections à pathogènes opportunistes. Cette situation est loin d'être idéale, en théorie, envisager une stratégie d'induction de tolérance immunitaire représente la seule issue. Ces raisons justifient la recherche d'alternatives thérapeutiques visant à induire un état de tolérance permanent à l'égard de l'organe transplanté.

La tolérance immunitaire viv à vis d'un tissu transplanté est définie comme l'absence de réponse immunitaire spécifiquement dirigée contre le greffon allogénique, avec maintien des réponses immunitaires aux autres antigènes (état d'immunocompétence). La conséquence thérapeutique est la possibilité d'interrompre l'immunosuppression non spécifique et la conséquence clinique est l'absence de rejet du greffon. Le système immunitaire du receveur spécifiquement tolérant vis-à-vis du greffon ne considère plus ce dernier comme un corps immunologiquement étranger : il y a donc "acceptation" du greffon, sans déficit immunitaire lié aux traitements médicamenteux. Si il y a tolérance, elle doit être "tolérance opérationnelle" à savoir, une situation où l'on constate une survie fonctionnelle du greffon à long terme en l'absence d'immunosuppression chronique tel que l'a décrit Waldmann [Waldmann H.1999]. De plus, il faut trouver le juste équilibre entre réguler le système immunitaire et le maintenir immunocompétent.

Depuis 1953 et les travaux de Billingham [Billingham RE.1953], de nombreux travaux ont permis d'établir, chez l'animal, une tolérance immunitaire durable vis-à-vis d'alloantigènes. Cependant, le transfert à la clinique d'une telle stratégie s'est avéré très compliqué. En pratique, plusieurs pistes sont possibles pour contrôler le système immunitaire et permettre une tolérance des alloantigènes. Elles sont classées en 2 grands groupes, selon

que les mécanismes d'induction aient lieu au niveau du thymus ou de la moelle hématopoïétique (tolérance centrale) [Sykes M.1988] ou au niveau des organes lymphoïdes secondaires (tolérance périphérique) [Qin S.1993].

5.5.2 Tolérance centrale

La tolérance centrale peut être médiée par l'apport de moelle osseuse, de cellules du donneur ou d'antigènes du donneur au niveau des organes lymphoïdes centraux où se déroulent l'ontogenèse et la différenciation des lymphocytes. Chez l'homme, il s'agit de la moelle osseuse pour les lymphocytes B et du thymus pour les lymphocytes T.

Il est possible d'induire un état de macro-chimérisme chez le receveur. Parmi ces différentes stratégies expérimentales, la greffe combinée d'organe et de moelle osseuse ou cellules hématopoïétiques (du même donneur), est une des voies de recherche les plus intéressantes. Cette approche aboutit à la colonisation du receveur par les cellules du donneur. Chez certains cas clinique, encore isolés, cet état permet l'obtention d'un véritable état de tolérance central vis-à-vis de l'organe issu du donneur de cellules hématopoïétiques [Sayegh MH.1991] [Sellers MT.2001]. Les travaux cliniques de Sayegh ont permis en 1991 d'établir un état de tolérance après une allogreffe simultanée moelle osseuse hématopoïétique + rein du même donneur [Sayegh MH.1991]. L'équipe de Saas, a montré dans un modèle murin, que l'injection intraveineuse de cellules apoptotiques du donneur conjointement aux cellules médullaires, favorise l'acceptation du greffon médullaire [Bittencourt MC.2001]. Ces cellules apoptotiques permettent, dans un modèle de greffe combinée organe solide/moelle osseuse, d'induire une tolérance restreinte aux antigènes du donneur de cellules médullaires sans entraîner d'immunisation vis-à-vis d'elles-mêmes ni même de processus auto-immuns [Kleinclauss F.2003]. Cependant ce type de protocole nécessite une double greffe et est restreint à un faible taux de patients. De plus, une greffe combinée est une intervention délicate qui nécessite des besoins particulier chez le receveur afin d'accepter la greffe de moelle osseuse, ajoutant des risques non négligeables de GVHD (Graft-versus-host disease).

La greffe de moelle osseuse concomitante à une injection de cellules allogénique (du même donneur), permet chez des souris jeunes de reprogrammer le système immunitaire de l'hôte. En effet les cellules allogéniques injectées dans le thymus ou migrant vers celui-ci, vont potentialiser cette induction de tolérance centrale. Chez les rongeurs, l'administration intrathymique d'alloantigènes est un bon moyen d'induire une tolérance immunitaire. Une des

premières descriptions du modèle d'inoculation d'îlots pancréatiques dans le thymus chez le rat, a mis en lumière le potentiel de ce modèle d'étude [Posselt AM.1990]. L'inoculation intrathymique d'îlots de Langerhans allogéniques conduit à l'acceptation du greffon à long terme [Inverardi L.2001]. Plusieurs travaux ont montré que l'administration intrathymique chez le receveur de splénocytes irradiés (immuno-incompétents) du donneur, permet l'induction de tolérance à un greffon d'îlots de Langerhans du même donneur, transplanté 7 jours après l'intervention thymique [James T.1993] [Ohajekwe OA.1995] [Oluwole SF.1993]. Il a aussi été démontré que l'inoculation intrathymique d'alloantigènes solubles du donneur (7 jours avant la greffe d'îlots), comme les membranes des cellules spléniques, permet d'induire une tolérance immunitaire vis-à-vis d'un greffon d'îlots pancréatiques du même donneur [Qian T.1995] [Qian T.1993]. De récents travaux chez le rongeur ont montré que l'administration intrathymique de peptides du CMH du donneur (7 jours avant la greffe d'îlots) suffit à induire une tolérance à une greffe d'îlots du donneur [Chowdhury NC.1998]. Ainsi donc, au cours de la différenciation lymphocytaire T intrathymique, les antigènes du donneur vont être présentés lors de la sélection des cellules T et seront reconnus comme des antigènes du "Soi" [Remuzzi G.1995].

Au cours de cette différenciation, les thymocytes doubles positifs migrent dans le cortex thymique, où ils sont mis en contact avec des antigènes peptidiques présentés dans les molécules du CMH des cellules épithéliales du cortex thymique (cTECs). Seuls les thymocytes qui sont capables de se lier à un complexe CMH-peptide avec suffisamment d'affinité reçoivent un signal de survie. Les autres vont mourir par apoptose ("neglect" ou négligence). Ce phénomène est appelé "sélection positive" car les cellules survivantes sont celles qui ont lié une interaction. Selon la nature du CMH que leur TCR a pu lier, les thymocytes doubles positifs perdent l'un des deux marqueurs CD4 ou CD8. Les cellules ayant survécu à la sélection positive vont migrer dans la médulla thymique. Les thymocytes sont mis à nouveau en présence de peptides issus du soi, c'est-à-dire des auto-antigènes présentés par les cellules dendritiques ou les cellules épithéliales médullaires complexés avec les molécules du CMH portées par des cellules épitheliales médullaires (mTECs). Cette fois, ce sont les cellules dont le TCR interagit fortement avec les auto-antigènes qui vont mourir par apoptose, on parle de sélection négative ou délétion clonale [Kisielow P.1988] [Nossal GJ.1994] [Nossal GJ.1983]. C'est ce phénomène qui permet l'élimination précoce de lymphocytes auto-réactifs qui sont la cause de maladies auto-immunes [Xing Y.2012]. La délétion thymique des Lymphocytes T autoréactifs, nécessite l'expression thymique

des antigènes du soi par les TEC, dont certains sont sous la dépendance du facteur de transcription AIRE (Auto-immune regulator) [Anderson MS.2011].

Cependant, le filtre de la sélection négative n'est pas dépourvu de faille, puisque l'on retrouve des lymphocytes T autoréactifs à la périphérie. Ces cellules autoréactives ne peuvent pas théoriquement s'activer. Cependant si une cellule dendritique mature portant des molécules de costimulation et en présence d'agents stimulant des TLR, présente l'antigène à ces lymphocytes T autoréactifs, alors ils s'activent [Lang KS.2005]. Ce phénomène est retrouvé au cours de séquence d'I/R. Néanmoins, il existe des mécanismes que l'on regroupe sous la dénomination de tolérance périphérique, qui permettent de contrôler le potentiel pathogène des effecteurs T autoréactifs ayant échappé à la sélection négative [Bach JF.2001] [Bluestone JA.2003]. Premierement le thymus génère des cellules T régulatrices naturelles (nTreg), c'est le phénomène de "détournement clonale". Ces nTreg sont capables de controler les cellules T auto-réactives. Les nTreg participent donc à la tolérance immunitaire aux antigènes du soi. Les Treg naturels expriment CD4, CD25 et FoxP3 et sont naturellement généré dans le thymus. Ce sont des lymphocytes T dont le récepteur TCR a une forte avidité pour le complexe CMH-peptide du soi présenté par les cellules dendritiques ou les cellules épithéliales thymiques (mTECs). Deuxiemenent en réponse à une autoréactivité, des cellules T regulatrices peuvent etre générées en périphérie, cette induction pourrait être liée à une activation par des cellules dendritiques tolérogènes [Xing Y.2012].

Malheureusement, la transposition des protocoles d'induction de tolérance centrale chez l'homme adulte reste difficile en raison de l'anatomie du thymus adulte. De plus, l'injection des cellules ou antigènes du donneur, doivent avoir lieu préférentiellement avant la greffe pour avoir un réel effet sur l'acceptation du greffon. Ces restrictions limitent l'intérêt d'une telle approche et la réserve à la greffe chez des receveurs jeunes en vue d'une transplantation d'organe issue de donneur vivant.

5.5.3 Tolérance périphérique

Aujourd'hui il semble que la tolérance périphérique soit la plus robuste et la plus réalisable en clinique. Quatre mécanismes principaux sont impliqués dans la tolérance périphérique des lymphocytes T du receveur :

- L'anergie clonale ou "l'inactivation fonctionnelle". C'est un mécanisme non délétionnel qui été mis en évidence *in vitro*. C'est un état réfractaire des lymphocytes T qui, après un premier contact avec un antigène en l'absence de costimulation (second signal), deviennent incapables d'être activés par ce même antigène. Elle est spécifique de l'antigène qui l'a induite. Elle est associée à un défaut de synthèse d'IL-2 par les lymphocytes T.

- La déviation immunitaire Th1 vers Th2. C'est un mécanisme non délétionnel qui résulte en une production de cytokines IL-10 et TGF-β (cytokines de type Th2) et en une inhibition de l'expansion des lymphocytes Th1 et de la synthèse d'IFN-γ et de TNF-α.

- La suppression ou régulation de la réponse immunitaire (mécanisme non délétionnel, actif). Le concept de la suppression de la réponse immune agressive par des lymphocytes T régulateurs a été décrit en 1995 par Sakaguchi qui a décrit le rôle d'une sous-population de lymphocytes T $CD4^+$ exprimant avec une forte intensité la molécule CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) dans le contrôle des réactions auto-immunes de la souris. En effet, lorsque l'on provoque un déficit spécifique en lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+$ chez des rongeurs qui ne développent pas normalement de maladies auto-immunes, un syndrome auto-immun touchant de nombreux organes apparaît [Sakaguchi S.1995]. Certains travaux ont montré que les souris NOD (Non Obese Diabetic) développent un diabète exacerbé par la création d'un déficit en T régulateurs et que l'administration de ces cellules régulatrices, avant l'apparition du diabète, retarde l'expression, voire prévient la maladie [Salomon B.2000]. La pertinence clinique de ces résultats se trouve renforcée par l'observation récente que des patients atteints de diabète auto-immun ont un déficit en lymphocytes T régulateurs [Kukreja A.2002]. Les cellules T régulatrices protègent donc l'intégrité des tissus et des organes contre l'éventuelle activité destructrice des lymphocytes T auto-réactifs.

Depuis les travaux de Sakaguchi, les lymphocytes T régulateurs ont été identifiés par plusieurs groupes, à la fois dans des modèles expérimentaux de tolérance, mais aussi chez des êtres humains tolérant leur greffon [Bach JF.2003] [Wood KJ.2003]. Les lymphocytes T régulateurs, d'origine humaine, sont capables, *in vitro*, de supprimer la réponse proliférative des lymphocytes aux alloantigènes [Jonuleit H.2001]. *In vivo*, les lymphocytes T régulateurs sont capables d'induire une tolérance d'allogreffe et peuvent la transférer à des receveurs naïfs. Cette qualité de tolérance "infectieuse", a été suggérée initialement par Gershon [Gershon RK.1971], et a été mise en évidence chez la souris par l'équipe de Waldman [Cobbold SP.2003] [Graca L.2003]. L'immunorégulation par les lymphocytes nTreg est un

des mécanismes principaux responsables du maintien de l'homéostasie des lymphocytes T et de la tolérance envers des antigènes spécifiques. Ce mécanisme est utilisé, non seulement pour contrôler les réactions auto-immunes, mais aussi pour contrôler les réponses immunes envers des antigènes étrangers, comme dans les cas d'allotransplantation.

- La délétion clonale ou "mort cellulaire induite par activation". Ce mécanisme délétionnel est basé sur la destruction, par apoptose, des lymphocytes T alloréactifs spécifiquement activés contre les antigènes du donneur.

Au cours de notre étude nous nous sommes particulièrement intéressés au mécanisme d'induction de tolérance périphérique par délétion clonale. Notre modèle est basé sur un système d'activation d'un gène suicide HSV1-TK (Thymidine Kinase de l'Herpes Simplex Virus 1) couplé au ganciclovir (GCV) ayant pour conséquence la délétion clonale des cellules en division porteuses du transgène TK.

5.5.4 Modèle de déplétion clonale : système gène suicide HSV1-TK/GCV

L'origine de ce système remonte aux travaux de l'équipe de Elion, sur la mise au point d'analogues nucléosidiques anti-herpétiques [Fyfe JA.1978]. C'est ainsi qu'ont été développés deux analogues de la guanosine qui ne sont pas (ou très peu) phosphorylés par les kinases des cellules eucaryotes : l'aciclovir (ACV ; acycloguanosine ; 9-((2-hydroxyéthoxy)-méthyl)-guanine) et le ganciclovir (GCV ; 2'-nor-2'-désoxyguanosine ; 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxyméthyl)-guanine). En revanche, ces deux analogues nucléosidiques sont très efficacement métabolisés par la thymidine kinase (TK) de l'Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) en un composé monophosphorylé qui est ensuite transformé en métabolite di- puis triphosphate (TP) par les kinases cellulaires. L'activité anti-herpétique de l'ACV-TP et du GCV-TP est fondée en partie sur l'inhibition de la réplication virale ainsi que sur l'induction de la mort des cellules infectées, par incorporation du GCV-TP dans les chaînes d'ADN en cours d'élongation [Oliver S.1985] [St Clair MH.1987]. Ainsi, ces prodrogues initialement inactives, car non métabolisées, deviennent sous l'action de l'enzyme TK des analogues nucléosidiques métabolisables, puissants inhibiteurs de la réplication de l'ADN, bloquant l'élongation du brin néosynthétisé et conduisant alors à la mort des cellules en division par apoptose cellulaire (d'où le terme de "gène suicide") (Figure 17).

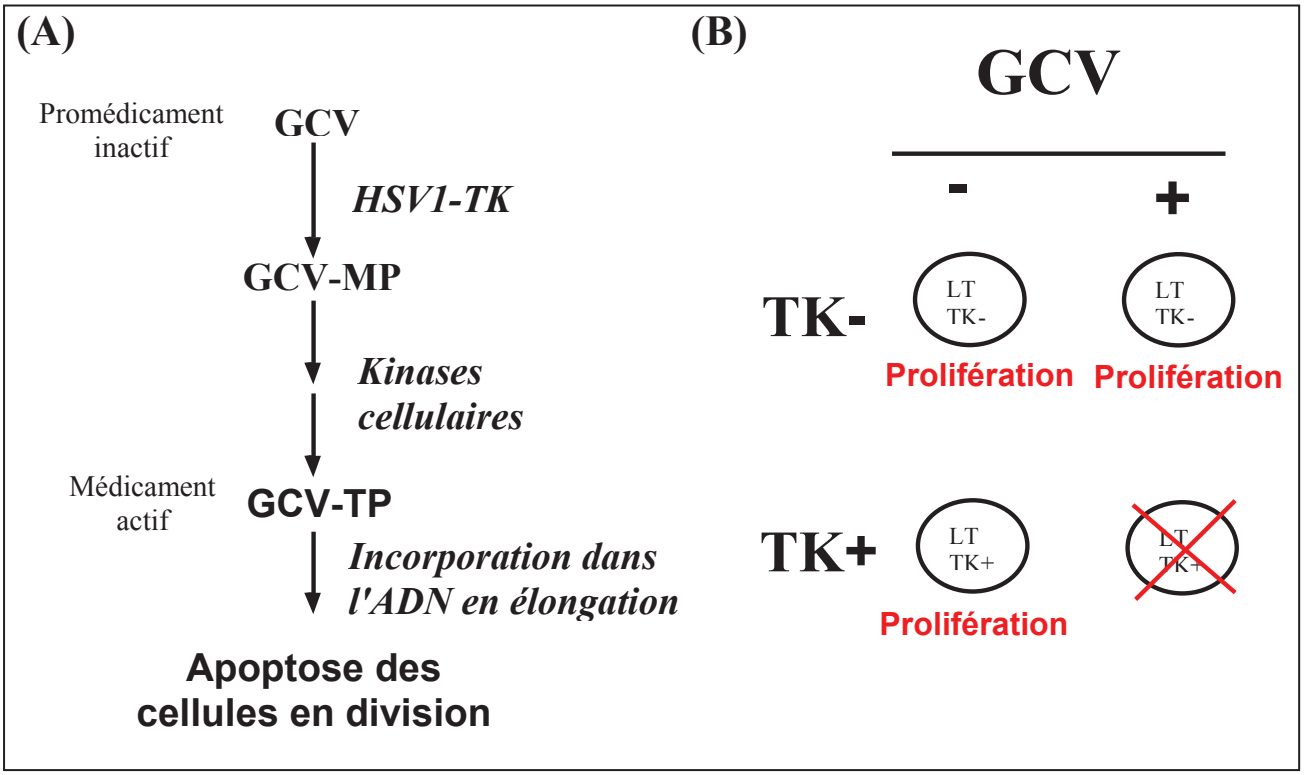


Figure 17 : Principe du système HSV1-TK/GCV (Modèle de destruction conditionnelle et spécifique des Lymphocytes T en division).

(A) Le GCV, promédicament inactif, est phosphorylé en GCV monophosphate (GCV-MP) par HSV1-TK, à la différence des kinases cellulaires qui sont incapables de catalyser cette étape. Le GCV-MP est ensuite métabolisé en GCV di- puis triphosphate (GCV-TP) par des kinases cellulaires. Le GCV-TP est alors incorporé dans l'ADN en élongation, inhibant celle-ci et entraînant la mort des cellules en division. (B) Destruction conditionnelle des Lymphocytes T en division chez les souris transgéniques TK^+. L'expression spécifique du transgène TK dans les seuls Lymphocytes T permet de détruire les Lymphocytes T TK^+ en division, en présence de GCV, alors que les autres cellules, n'exprimant pas le transgène (TK^-) sont préservées. En l'absence de GCV, la division des Lymphocytes T TK^+ est également permise. Figure issue de [Bellier B.2004].

Les cellules en division exprimant l'enzyme TK du virus HSV-1 peuvent être apoptosés *in vitro*, par des concentrations de GCV 100 à 10000 fois inférieures aux concentrations toxiques pour les cellules n'exprimant pas l'enzyme. Cette potentialité est toutefois inférieure en présence d'ACV, ce qui explique que le GCV soit plus couramment utilisé.

Cette approche de destruction ciblée des cellules en division a tout d'abord été orientée vers des stratégies anticancéreuses. De nombreux travaux ont ainsi validé ce système dans différents modèles tumoraux, en utilisant des souris transgéniques développant des tumeurs qui exprimaient le gène TK [Sacco MG.1995] [Moolten FL.1990] ou en transférant le gène TK dans les cellules tumorales au moyen de vecteurs viraux [Ezzeddine ZD.1991] [Culver KW.1994] [Caruso M.1993] [Barba D.1994]. Sur la base de ces études précliniques encourageantes, plusieurs essais thérapeutiques ont déjà eu lieu [Ram Z.1997] [Shand N.1999] [Rainov NG.2000].

L'utilisation du gène TK dans des modèles de souris transgéniques constitue un outil très puissant de déplétion conditionnelle de cellules en division [Caruso M.1992] [Boyer O.2000] [Cohen JL.1999] [Cohen JL.1997] [Contassot E.2000].

Cherchant à éliminer spécifiquement les lymphocytes T en division dans les compartiments lymphoïdes périphériques, l'équipe du Pr D Klatzmann a développé ce système TK+GCV de déplétion conditionnelle à un modèle de souris transgéniques exprimant spécifiquement le transgène dans les Lymphocytes T matures de manière à préserver les autres cellules de la surveillance immunitaire.

Modèle de déplétion conditionnelle des Lymphocytes T chez des souris transgéniques exprimant HSV-TK sous le contrôle d'un promoteur T spécifique.

En plaçant le transgène TK sous contrôle de séquences régulatrices spécifiques des Lymphocytes T matures, il est possible de détruire spécifiquement les lymphocytes T qui se divisent (particulièrement les cellules alloréactives) tout en préservant les cellules quiescentes ainsi que les autres cellules à fort taux de division, telles que les précurseurs lymphoïdes et myéloïdes. Dans les traitements conventionnels, ces cellules précurseurs sont les cibles préférentielles des agents cytostatiques conventionnels, leur destruction est alors responsable en grande partie des leucopénies observées en périphérie. En effet, le traitements immunosuppresseurs utilisés pour la transplantation d'organes allogéniques ne ciblent pas spécifiquement les lymphocytes T alloréactifs et entraînent par conséquent une morbidité et une mortalité importantes.

Dans le but d'obtenir une expression du transgène dans les seuls lymphocytes T matures, les séquences régulatrices spécifiques du gène CD4 ont été retenues, après avoir déterminé leur profil d'expression au moyen du gène rapporteur CD4 humain [Salmon

P.1996]. Il est apparu que l'utilisation du promoteur seul, sous la forme d'un fragment génomique proT4 contenant le site d'initiation de la transcription, n'aboutit pas à une expression détectable du gène rapporteur. Après combinaison du fragment proT4 avec l'enhancer du gène CD4 murin, seul connu au moment où ce travail a été initié [Sawada S.1991], un profil d'expression particulier, différent de celui du CD4 endogène, a été rapporté [Salmon P.1996]. Cette expression est :

- spécifique des lymphocytes T et d'une fraction de cellules NK mais absente des lymphocytes B et des macrophages.

- indépendante du lignage et s'observe dans la totalité des lymphocytes T périphériques $CD4^+$ et $CD8^+$.

- spécifique des lymphocytes T matures et d'une faible fraction des thymocytes $CD4^+$ ou $CD8^+$ simples positifs mais absente des thymocytes doubles positifs et doubles négatifs.

La combinaison enhancer/promoteur CD4 (EpCD4) constitue donc un système d'expression génique sélectif des lymphocytes T matures $CD4^+$ et $CD8^+$. L'extension du profil d'expression aux lymphocytes T $CD8^+$ s'explique par l'absence du répresseur intronique [Boyer O.1997], indispensable à la restriction d'expression au lignage CD4 [Sawada S.1994] [Siu G.1994]. Par ailleurs, l'absence d'expression du gène rapporteur dans les thymocytes double positifs indique l'existence d'un régulateur supplémentaire et différent des éléments connus, nécessaires à l'expression précoce au stade double positif.

Des souris transgéniques EpCD4TK (Lignée 40), dans lesquelles le gène TK du virus HSV-1 est placé sous contrôle des séquences régulatrices EpCD4, ont été créées par micro-injection d'ovocytes de souris FVB/N (haplotype $H\text{-}2^q$), favorables à la transgénèse. L'hypofertilité des mâles transgéniques TK a conduit l'équipe de D. Klatzmann à créer une deuxième lignée de souris utilisant une nouvelle construction du transgène EpCD4ΔTK dans lequel la région située en amont du deuxième codon ATG a été supprimée [Cohen JL.1998]. Cette contraction du gène TK, permet l'élimination des "promoteurs cryptiques" à l'origine d'une synthèse de transcrits courts dans les testicules, conduit à la production d'une protéine ΔTK tronquée en son extrémité N-terminale, mais n'altérant toutefois pas ses propriétés enzymatiques comparables à celles de TK [Cohen JL.1998]. Les souris EpCD4ΔTK (Lignée 2) obtenues sont de fond génétique C57BL/6 (haplotype $H\text{-}2^b$). La fonctionnalité du système TK/GCV est comparable pour ces deux lignées de souris : le gène TK est exprimé dans les lymphocytes matures et dans les thymocytes double-négatifs et double-positifs dans la lignée

40, alors qu'il est exprimé par les lymphocytes T matures et peu ou pas par les thymocytes immature dans la lignée 2.

Chez ces lignées de souris EpCD4TK et EpCD4ΔTK, l'expression de TK permet de transformer la prodrogue Ganciclovir en un analogue nucléosidique, inhibant l'élongation de l'ADN des lymphocytes T transgéniques. Ce système permet l'élimination spécifique des lymphocytes T matures en division au moment de l'administration du GCV [Cohen JL.1997] [Braunberger E.2000a]. Ainsi, les cellules T alloréactives activées par les alloantigènes du greffon peuvent être détruites (par apoptose) au cours d'un traitement de 7 à 14 jours de Ganciclovir contemporain de la greffe [Braunberger E.2000b].

L'intérêt de ce modèle a été démontré dans la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD = Graft Versus Host Disease) [Tiberghien P.1994]. En effet, cette prévention de la GVHD était basée sur la destruction sélective de ces cellules T alloréactives issues du greffon de moelle osseuse des souris EpCD4ΔTK donneuses, après 7 jours de traitement au GCV, tout en conservant l'immunocompétence des autres lymphocytes T [Cohen JL.1997]. Les animaux receveurs possèdent des lymphocytes T d'origine du donneur répondant normalement à la stimulation *in vitro* par des mitogènes ou des alloantigènes tiers, tout en étant également tolérants aux alloantigènes de la souris receveuse [Cohen JL.1997].

Les résultats obtenus par l'équipe du Pr Klatzmann montrent que ce modèle permet de prolonger, chez la souris EpCD4ΔTK, la durée de survie d'une allogreffe de cœur nonvascularisé et d'une allogreffe cardiaque vascularisée [Braunberger E.2000b], ainsi que d'une allogreffe de peau [Braunberger E.2000a] après administration de GCV durant 7 ou 14 jours à partir du jour de la transplantation et sans traitement immunosuppresseur supplémentaire.

Ces études ont constaté une très nette prolongation de la durée de survie des allogreffes, avec maintien de l'immunocompétence des lymphocytes T circulants, capables de rejeter une allogreffe d'un fond génétique tierce [Braunberger E.2000b]. Cependant, les phénomènes responsables du maintien de cette tolérance et de l'immunocompétence, même après la fin du traitement au GCV, n'ont pas été décrits.

Les souris transgéniques EpCD4TK et EpCD4ΔTK constituent donc de judicieux modèle d'allogreffes d'îlots de Langerhans dans le but d'étudier une possible induction de tolérance vis-à-vis du greffon. L'allogreffe est simultanée à l'introduction d'une pompe qui délivre du GCV durant 14 jours.

OBJECTIFS

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Actuellement, en transplantation d'organe et de tissu, il est nécessaire de :

1. réduire les lésions d'ischémie reperfusion afin de préserver l'intégrité cellulaire et tissulaire.
2. réduire l'inflammation ainsi que l'immunogénicité du greffon afin de réduire l'activation du système immunitaire inné au moment de la transplantation.
3. contrôler le rejet d'allogreffe.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'amélioration de la conservation extracorporelle des greffons limite les lésions d'ischémie/reperfusion. Il a été montré que la solution SCOT contenant des PEG limite les lésions d'IR et procure un effet immunoprotecteur dans des modèles de transplantation d'organes vascularisés (rein, cœur, foie et poumon). Dans un premier temps, ce travail de thèse a eu pour but d'évaluer dans un modèle murin d'isolement et de transplantation d'îlots de Langerhans :

1. la capacité de la solution SCOT contenant des PEG 20kDa à limiter les lésions d'ischémie/reperfusion (préserver l'intégrité du greffon et reduire l'activation du sytème immunitaire inné) dans un modèle d'isogreffe vascularisée d'îlots.
2. la capacité des PEG 20kDa de la solution SCOT à établir une immunoprotection précoce du greffon dans un modèle d'allogreffe non vascularisée d'îlots.

Comme nous l'avons vu précédemment le greffon allogénique ayant subi une séquence d'I/R est soumis une réponse immunitaire du receveur amplifiée, aboutissant inévitablement au rejet d'allogreffe. Dans un second temps ce travail a eu pour but d'évaluer une nouvelle stratégie d'induction de tolérance à une allogreffe non vascularisée d'îlots de Langerhans dans un modèle murin transgénique de déplétion transitoire des lymphocytes T activés (gène suicide TK + GCV).

Ces objectifs, réalisés dans un modèle de greffe d'ilots, ont un caractère translationnel car la prévention des lésions d'I/R et le contrôle du rejet de greffe sont des objectifs communs à l'ensemble des transplantations d'organes, de tissus et de cellules.

METHODES

L'ensemble des travaux sont basés sur l'utilisation d'un modèle murin d'isolement et de transplantation d'îlots pancréatiques. Les milieux d'isolement et de culture, ainsi que les souches de souris donneuses et receveuses ont évolué aux cours des expériences afin de pouvoir répondre à nos besoins.

Modèle murin d'isolement et de transplantation d'îlots de Langerhans :

Avant toute intervention les animaux sont analgésiés et anesthésiés par un mélange de Xylasine (Rompoun 2%) et de Kétamine (d'Imalgene 1000). L'injection est réalisée par voie intra-péritonéale (IP) à raison de 4 mg de Xylazine + 80 mg de kétamine par kilogramme.

Induction du diabète insulinodépendant

Les souris receveuses sont rendues diabétiques par une méthode chimique d'injection intra-péritonéale de Streptozotocine (STZ) à raison de 250 mg/kg. La STZ (N-(Méthylnitrosacarbamoryl)-d-glucosamine, $C_8H_{15}N_3O_7$) est un antibiotique qui permet d'induire un diabète artificiel de type I chez la souris. Cette molécule a une action toxique sur les cellules β du pancréas, provoquant chez la souris une hyperglycémie environ 2 jours après le traitement.

L'animal est considéré comme diabétique insulinodépendant lorsque deux glycémies journalières sont supérieures à 300 mg/dL lors de deux prélèvements au hasard, c'est à dire sans que l'animal n'ait été laissé à jeun.

Le modèle nécessite 2 à 3 donneurs de pancréas pour obtenir une masse d'îlots suffisante pour pouvoir corriger le diabète chez la souris receveuse.

Voici les différentes combinaisons donneur/receveur utilisées pour nos expériences (Tableau 13):

Tableau 13 : combinaisons donneur/receveur utilisées au cours de ce travail.

Protocole	Souris donneuses (haplotype)	Souris receveuses (haplotype)	Greffe
Evaluation de la solution SCOT et des PEG			
Isogreffes	Souris sauvages, souche C3H (H-2Kk)	Souris sauvages, souche C3H (H-2Kk)	1000 IEQ
Allogreffes	Souris sauvages, souche C3H (H-2Kk)	Souris sauvages, souche Balb/c (H-2Kd)	1400 IEQ
Confirmation de l'immunoprotection par les PEG	Souris transgéniques InsHA, souche Balb/c (H-2Kd)	Souris transgéniques CL4, souche Balb/c (H-2Kd)	1400 IEQ
Protocole d'induction de tolérance périphérique			
Contrôles négatifs d'induction de tolérance	Souris sauvages, souches C57BL/6 (H-2Kb)	Souris sauvages, souches FVB/N (H-2Kq)	1000 îlots (masse d'îlots équivalente à 2000 IEQ)
Induction de tolérance	Souris sauvages, souches C57BL/6 (H-2Kb)	Souris transgéniques EpCD4TK (lignée 40), souches FVB/N (H-2Kq)	1000 îlots (masse d'îlots équivalente à 2000 IEQ)
Induction de tolérance	Souris sauvages, souche Balb/c (H-2Kd)	Souris transgéniques, EpCD4ΔTK (Lignée 2), C57BL/6 (H-2Kb)	1000 îlots (masse d'îlots équivalente à 2000 IEQ)

Isolement des îlots pancréatiques

Après anesthésie/analgésie, la souris est rasée sur toute la longueur de l'abdomen. Elle est placée en décubitus dorsal sous une loupe binoculaire. Après laparotomie médiane xyphopubienne, la xiphoïde est enlevée, le foie extériorisé et maintenu à l'aide d'une compresse humide. Les vaisseaux courts reliant l'estomac à la rate sont sectionnés.

Le canal cholédoque est ligaturé, à son embouchure dans le duodénum, à l'aide d'un fil fin de type "Mersutures" (Ethicon). Ce fil servira également à la mise en traction du canal. A ce stade, l'animal est sacrifié par exsanguination (sectionnement de l'aorte).

2,5 mL de Libérase à 0,3 mg/mL (reconstituée avec de l'HBSS 1X : Hanks Balanced Salt Solution) sont ensuite injectés dans le canal de Wirsung, via la voie biliaire, avec un microperfuseur Butterfly 27G (Figure 18). L'injection de la Libérase permet de distendre le pancréas (Figure 18).

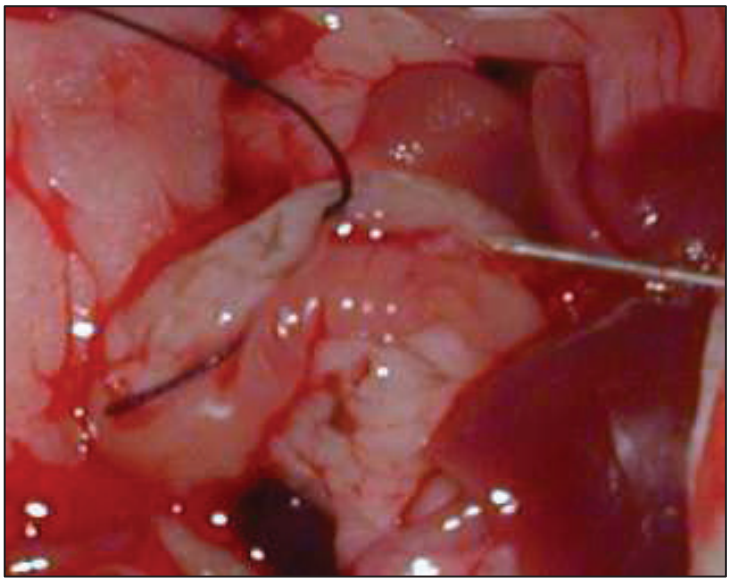


Figure 18 : Injection de libérase via le canal cholédoque, à l'aide d'un butterfly

L'organe prélevé est ensuite détaché de l'estomac, des intestins et de la rate (Figure 19). L'excision du pancréas doit se faire délicatement, et rapidement afin de limiter l'action de la Libérase. Le pancréas est collecté dans un tube contenant 2mL de HBSS 1X + BSA 0,5% (albumine bovine sérique). Le tube est déposé dans la glace pour inhiber les activités enzymatiques endogènes et exogènes.

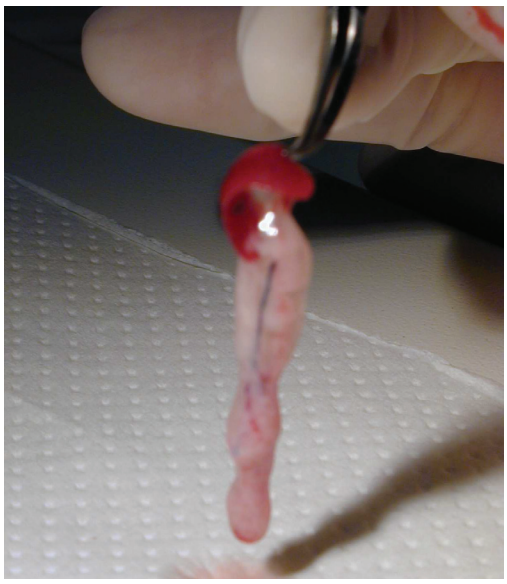


Figure 19 : Pancréas prélevé

Pour obtenir les îlots, une digestion du pancréas est nécessaire. Les tubes contenant les pancréas sont placés dans un bain-marie à 37°C pendant 12 minutes afin de permettre l'activité des collagénases. Ils sont ensuite déposés rapidement dans de la glace, afin de stopper l'action de l'enzyme. Les pancréas sont dissociés par agitation manuelle après ajout de 4 mL de HBSS 1X + BSA 0,5% froid dans chaque tube. Les pancréas dissociés sont jetés sur un tamis de 500 µm. Les tubes et le tamis sont rincés avec 50 mL d'HBSS 1X + BSA 0,5%. Deux lavages de la suspension cellulaire sont effectués en HBSS 1X + BSA 0,5%, par centrifugation de 4 minutes à 1300 rpm à 4°C.

Une purification est indispensable afin de séparer les îlots de la partie exocrine. Celle-ci repose sur une séparation du tissu endocrine et du tissu exocrine par densité sur gradient de Ficoll. Un gradient discontinu de Ficoll à 4 couches est utilisé. Les couches de Ficoll sont obtenues par mélange d'HBSS 1X d'une densité égale à 1,02 et de Ficoll densité 1,116. Le pH de la solution doit être compris entre 7,3 et 7,4.

Le culot sec du lysat pancréatique, obtenu après les lavages, est repris dans 5 mL de Ficoll de densité 1,111. Son homogénéisation doit être parfaite afin d'obtenir une bonne séparation des cellules. 5 mL de Ficoll de densité 1,094 - 1,068 et 1,034 sont ensuite successivement ajoutés délicatement pour ne pas mélanger les différentes couches formées. Le gradient est alors centrifugé 12 minutes à 2200 rpm à 4°C. Les îlots se retrouvent majoritairement à l'interface entre les densités 1,094 et 1,068 (Figure 20). On en retrouve toutefois en moindre proportion à l'interface entre les densités 1,111 et 1,094.

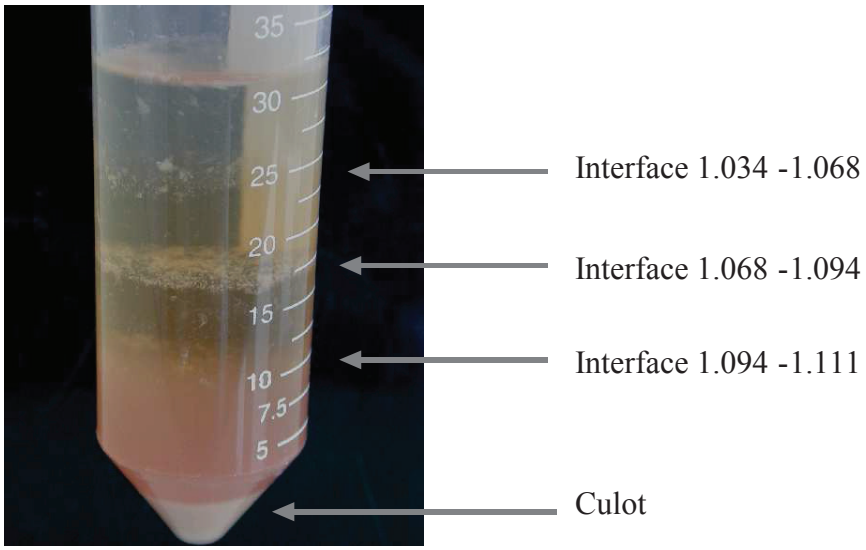


Figure 20 : Séparation des îlots de Langerhans sur gradient de Ficoll à 4 couches

Les couches prélevées sont lavées, par centrifugation, deux fois dans 40 mL d'HBSS-BSA 0,5%, pendant 6 minutes à 1500 rpm à 4°C. Les îlots sont repris dans 7 mL de milieu de culture RPMI 1640 additionné de SVF 10% (Sérum de veau fœtal) + Antibiotiques 1% + Hepes 1% + Glutamine 1% + Acides aminés non essentiels 1% (RPMI complet).

La pureté des îlots ainsi obtenue n'est pas parfaite, elle devient proche de 100% (Figure 21) après Hand-Picking. Cette technique consiste à récupérer les îlots, un à un, et à éliminer le tissu exocrine, à l'aide d'une seringue type Hamilton, sous microscope.

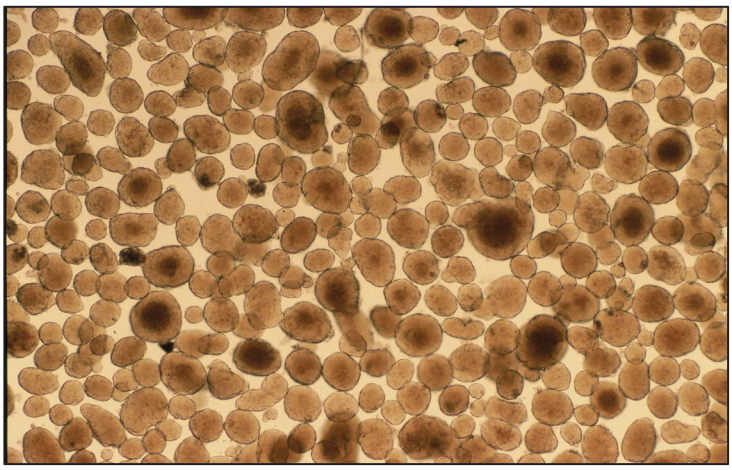


Figure 21 : Ilots de Langerhans purifiés après Hand-Picking (grossissement x40)

Les îlots sont ensuite transférés dans une nouvelle boîte de pétrie dans du milieu RPMI complet. La numération et la mesure du diamètre des îlots est effectué en prélevant un à un les îlots lors de ce transfert, à l'aide d'une seringue type Hamilton, sous microscope comprenant un objectif gradué. La masse d'îlots est ensuite convertie en IEQ selon la table ci-dessous (Tableau 14).

Tableau 14 : Table permettant la conversion de la masse d'îlots en IEQ [Ricordi C.1990].

Diamètre des îlots (µm)	Nb îlots (n)	Conversion (facteur de conversion IEQ)
50-100	…	n/6
100-150	…	n/1,50
150-200	…	n x 1,7
200-250	…	n x 3,5
250-300	…	n x 6,3
300-350	…	n x 10,4
> 350	…	n x 15,8

Culture des îlots

Une fois comptés, les îlots sont cultivés dans du RPMI complet à 37°C sous atmosphère 21% O_2 + 5% CO_2 durant 20h. Ce comptage est re-évalué en fin de culture afin de préparer la masse IEQ nécessaire d'îlots à greffer.

Greffe sous la capsule rénale

La masse d'îlots nécessaires à la greffe est introduit dans une tubulure siliconée (0,5 mm de diamètre). L'ensemble est clampé à l'extrémité inférieure et centrifugé 1min20 à 1200 rpm à 4°C. L'extrémité de la tubulure est coupée en biseau pour faciliter son insertion délicate sous la capsule rénale.

La souris receveuse diabétique est anesthésiée/analgésiée, puis rasée en région lombaire. L'animal est installé en décubitus latéral droit sous le microscope. Afin d'exposer le rein gauche, une lombotomie courte est réalisée jusqu'à l'espace péri-rénal. Le rein est extériorisé et la capsule rénale est irriguée régulièrement avec du sérum physiologique pour éviter son dessèchement. Une petite ouverture dans la capsule rénale, faite de façon tangentielle au niveau de sa convexité inférieure, permet l'introduction de la tubulure siliconée contenant les îlots. Les îlots sont injectés sous la capsule grâce à une seringue Hamilton reliée à la tubulure (Figure 22). Après injection, la capsule est fermée par cautérisation à l'aide d'un cauter ophtalmologique pour éviter la fuite du greffon.



Figure 22: Greffon d'îlots placé dans un tube siliconé, puis introduit sous la capsule rénale de l'animal receveur.

Dans le cas du protocole d'induction de tolérance, une pompe osmotique délivrant le GCV est placée sous la peau du dos (pompe qui délivre la prodrogue à raison de 50 mg/kg/jours durant 14 jours). Cette introduction de la pompe est contemporaine à la greffe d'îlots.

Le muscle puis la peau sont refermés par surjet à l'aide d'un fil monocryl 5/0 résorbable. Après l'opération, la souris est placée dans sa cage sous une couverture et une lumière chaude afin de corriger l'hypothermie, jusqu'à son réveil.

Dans les cas où nous voulons évaluer une solution de conservation, celle-ci remplace l'HBSS 1X - 0,5% BSA à toutes les étapes du protocole décrit ci-dessus. Dans le cas de la première étude d'évaluation de la solution SCOT, le PEG 20 kDa à 30g/L est ajouté au milieu RPMI complet durant la culture des îlots avant transplantation.

Suivi de la greffe

La survie du greffon est déterminée par des contrôles régulièrs de la glycémie témoignant de sa fonctionnalité. Théoriquement, la normoglycémie (glycémie <100 mg/dL) doit être obtenue environ 4 à 6 heures après la greffe. Le rejet du greffon est défini par une hyperglycémie supérieure à 200 mg/dL, mesurée à deux reprises consécutives sur un animal non à jeun.

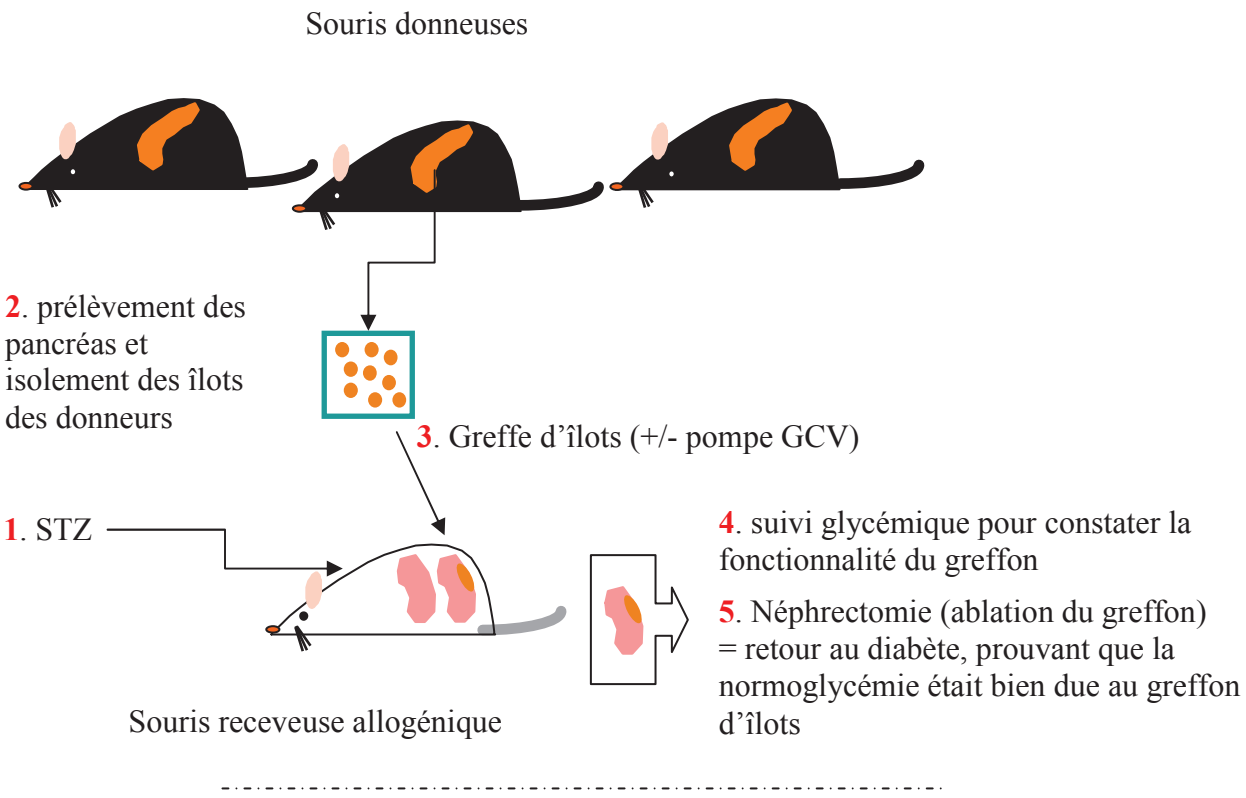
Ablation du greffon par néphrectomie

Dans le but de déterminer si la normoglycémie observée est bien due au greffon d'îlots, une néphrectomie du rein porteur de la greffe est réalisée. L'animal anesthésié/ analgésié est installé en décubitus latéral droit sous le microscope. Afin d'exposer le rein gauche, une lombotomie courte est réalisée jusqu'à l'espace péri rénal. Le rein est extériorisé, le pédicule rénal est ligaturé, une section des vaisseaux sanguins est réalisée au-dessus de la ligature et le rein est retiré. Le muscle puis la peau sont refermés par surjet à l'aide d'un fil monocryl 5/0 résorbable. Après l'opération, la souris est placée dans sa cage sous une couverture et une lumière chaude afin de corriger l'hypothermie, jusqu'à son réveil.

Après ablation du rein portant le greffon, si l'animal devient hyperglycémique, cela signifie que la normoglycémie antérieure était bien due au greffon fonctionnel. Dans ce cas, lors d'un protocole d'induction de tolérance nous considérons que la tolérance immunitaire vis-à-vis du greffon était bien établie. Si l'animal reste normoglycémique, alors c'est qu'il y a eu une reconstitution du pancréas natif ou une action transitoire de la STZ, nous ne pouvons

conclure sur la fonctionnalité du greffon que par des études immunohistochimiques anti insuline.

L'ensemble du processus est schématisé dans la Figure 23.



1. Diabète induit par injection intrapéritonéale de Streptozotocine (250mg/kg)
2. Prélèvement des pancréas des donneurs et isolement des îlots de Langerhans.
3. Greffe d'îlots des donneurs sous la capsule rénale du receveur diabétique (+ introduction d'une pompe osmotique délivrant le GCV, seulement dans le cas du modèle d'induction de tolérance)
4. Suivi de la glycémie = fonctionnalité du greffon / survie du greffon
5. Néphrectomie = confirmation de la fonctionnalité du greffon (si retour au diabète alors le greffon était fonctionnel)

Figure 23 : Modèle expérimental de greffe d'îlots pancréatiques allogéniques chez une souris receveuse diabétique

Dans le cas du protocole d'induction de tolérance avec le "gène suicide HSV-TK", les souris receveuses sont des souris transgéniques porteuses du gène TK. L'introduction d'une pompe osmotique délivrant le GCV est comtemporaine à la greffe.

Transfert de tolérance

Une souris HSV-TK$^+$ tolérante vis-à-vis du greffon d'îlots allogéniques, doit posséder des cellules immunitaires "porteuses" de cette tolérance. Des transferts de tolérance sont effectués dans le but de vérifier si les cellules tolérantes peuvent contrôler les lymphocytes T alloréactifs.

Chez une souris sauvage diabétique irradiée de même fond génétique que la souris tolérante, sont réalisées simultanément: une allogreffe d'îlots de même fond génétique que la greffe d'ilots tolérée et une injection de splénocytes provenant de la souris tolérante.

Modèle :

Receveurs : Souris FVB d'haplotype H-2^q receveuses d'îlots C57BL/6 et de cellules spléniques immunocompétentes provenant de souris FVB EpCD4TK (lignée 40) d'haplotype H-2^q tolérantes aux îlots C57BL/6.

Les souris receveuses sont préalablement rendues diabétiques par injection intra-péritonéale de STZ à raison de 250 mg/kg.

Irradiation des souris receveuses diabétiques

Les souris receveuses du transfert de tolérance sont irradiées à une dose sublétale (2 Gy ou 200 rad) 24h avant la greffe. Cette irradiation permet de préserver les fonctions immunes du receveur et de faciliter l'implantation des splénocytes injectés. Des manipulations préliminaires ont permis d'affirmer que cette irradiation sublétale, seule, n'induisait pas une prolongation de survie du greffon.

Isolement des splénocytes des souris tolérantes aux îlots

Les souris FVB EpCD4TK Lignée 40 tolérantes aux îlots B6 sont splénectomisées. Les splénocytes sont ensuite obtenus par dilacération mécanique de la rate dans du PBS 1X + 3% SVF. Les globules rouges sont ensuite lysés avec 2mL/rate de tampon de lyse (NH_4Cl à 155mM + KHCO3 à 10mM + EDTA à 0.1mM) pendant 5 min à 4°C. Un lavage est réalisé en PBS 1X puis un autre en RPMI complet + β Mercaptoethanol (5.10^5 M), molécule essentiel pour la division des cellules murines. Les splénocytes sont ensuite comptés en cellule de Malassez à l'aide d'un colorant vital, le bleu trypan.

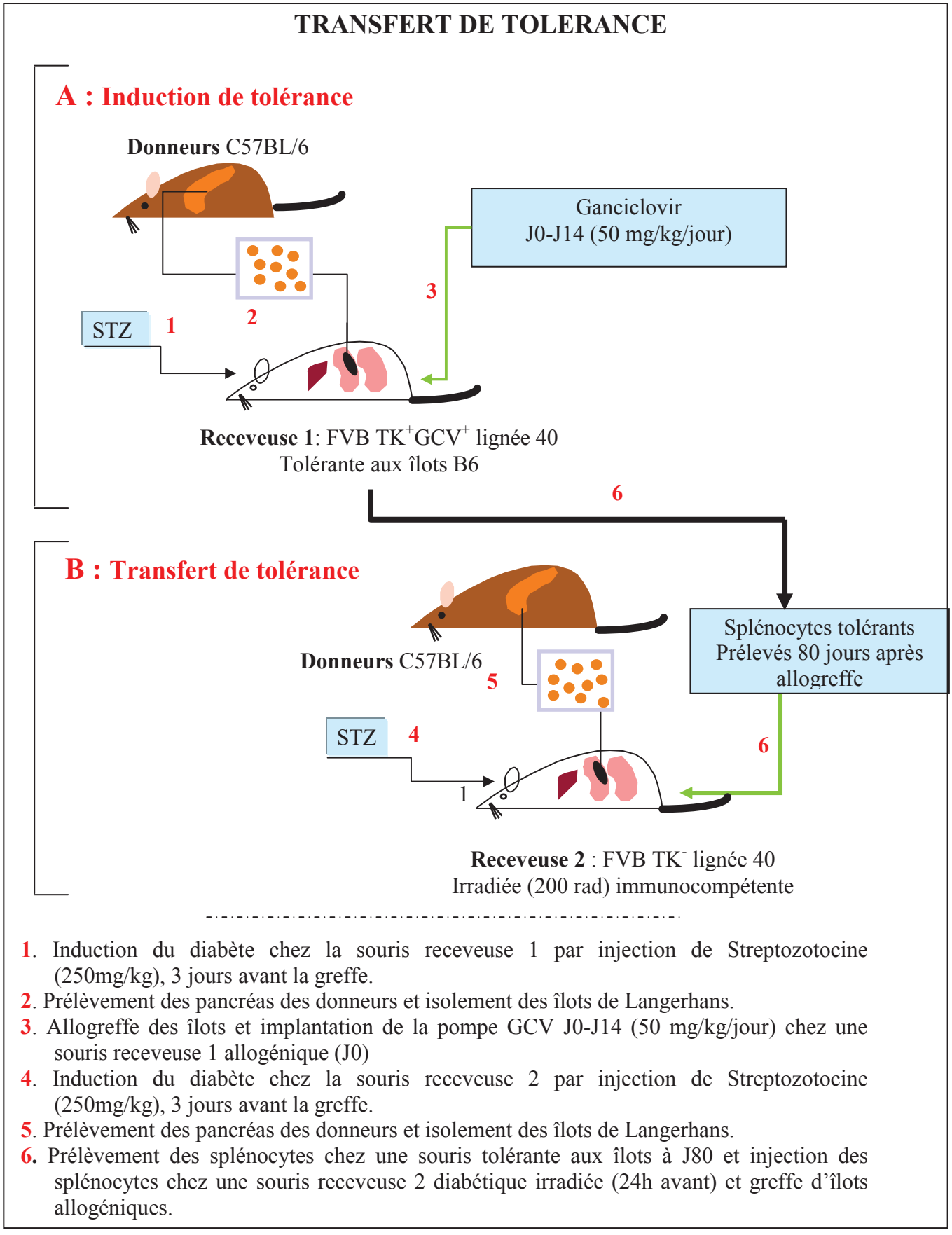
Injection de splénocytes et greffe sous la capsule rénale

60 x 10^6 splénocytes de souris tolérante dans 0.2 ml de PBS 1X sont injectés par voie intraveineuse chez la souris FVB receveuse diabétique irradiée. Puis, le même jour, 1000 îlots C57BL/6 sont greffés sous la capsule rénale de la souris receveuse diabétique.

Suivi de la greffe

La survie du greffon est déterminée par des contrôles régulièrs de la glycémie témoignant de sa fonctionnalité. Une néphrectomie du rein porteur du greffon est réalisée dans le but de savoir si le greffon était fonctionnel.

La Figure 24 illustre le modèle murin de transfert de tolérance.



1. Induction du diabète chez la souris receveuse 1 par injection de Streptozotocine (250mg/kg), 3 jours avant la greffe.
2. Prélèvement des pancréas des donneurs et isolement des îlots de Langerhans.
3. Allogreffe des îlots et implantation de la pompe GCV J0-J14 (50 mg/kg/jour) chez une souris receveuse 1 allogénique (J0)
4. Induction du diabète chez la souris receveuse 2 par injection de Streptozotocine (250mg/kg), 3 jours avant la greffe.
5. Prélèvement des pancréas des donneurs et isolement des îlots de Langerhans.
6. Prélèvement des splénocytes chez une souris tolérante aux îlots à J80 et injection des splénocytes chez une souris receveuse 2 diabétique irradiée (24h avant) et greffe d'îlots allogéniques.

Figure 24 : Transfert de tolérance à une allogreffe d'îlots pancréatiques illustré dans la combinaison C57BL/6 / FVB L40.

Propriétés physico-chimiques des solutions de préservation

L'osmolarité est mesurée à l'aide d'un osmomètre (Hermann Roebling Messtechnik, Allemagne). La viscosité est mesurée à l'aide d'un tube viscosimètre de type "Cannon Fensk type viscometer 1634" (Rheotec, France). Cette méthode permet de mesurée la viscosité cinématique en centistokes (cSt ou mm2/s) qui est égale au temps d'écoulement du fluide entre 2 points multiplié par le facteur "constance" du tube (K = 0,007097cSt/s). La viscosité dynamique en mPa.s est obtenue par l'équation : viscosité cinématique x densité (ou masse volumique en g/cm3) de la solution.

Viabilité cellulaire (activité du complexe II mitochondriale)

La viabilité cellulaire est déterminée par mesure de l'activité mitochondriale avec le test MTT (3,(4,5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium bromide). Ce test est basé sur le clivage du sel de tetrazolium jaune en cristaux de formazan via l'activité de la succinate deshydrogénase (complexe II de la mitochondrie). Les cristaux de formazan formés produisent une coloration détectable par spectrophotométrie à 560 nm. La densité optique détectée est directement proportionnelle à l'activité de la succinate déshydrogénase, enzyme uniquement présente dans les cellules vivantes.

Evaluation des capacités d'insulino-sécrétion des îlots

Les îlots sont repris dans 40 mL de Krebs basal (albumine à 5g/L + NaCl à 118,5mM + $CaCl_2$ $2H_2O$ à 2,54 mM + KH_2PO_4 à 1,19 mM + KCl_4 à 74 mM + $NaHCO_3$ à 25 mM + $MgSO_4$ $7H_2O$ à 1,19 mM) et centrifugés 5 min à 1500 tours/min, afin de bien rincer les cellules pour éliminer l'insuline relarguée durant la culture. Les îlots sont placés dans du Krebs basal 30 min à 37°C. Puis 10 îlots de tailles identiques sont incubés 1h à 37°C soit avec du Krebs basal (contenant du glucose à 5 mM/L), soit avec du Krebs stimulant (glucose à 20 mM/L). Apres 1 heure d'incubation, 500 µL de surnageant sont prélevés pour chaque condition et congelés à -20°C afin de doser l'insuline sécrétée. Le dosage de l'insuline contenue dans les surnageants de culture se fait par dosage immunoradioactif à l'iode 125 ou par méthode ELISA.

Détection des antigènes membranaires

L'évaluation des capacités immunomasquantes des PEG a été réalisée par immunomarquage du CMH à la surface cellulaire. Des îlots cultivés avec ou sans PEG

20kDa 30g/L sont incubés en présence d'anticorps couplés au FITC dirigés contre l'antigène H-2Kk (CMH de classe I murin C3H) durant 20h sur une lame de microscopie recouverte de polylysine. Après lavage les lames sont placées sous un microscope et l'émission de fluorescence est photographiée. Parallèlement d'autres îlots sont dissociés à l'aide d'une enzyme de digestion, la dispase à raison de 1 mg/100 ilots durant 15 min à 37°C. Les cellules sont ensuite cultivées avec ou sans PEG 20kDa 30g/L en présence d'anticorps anti H-2Kk couplés au FITC. Après deux lavages en PBS 1X + 3% SVF, l'analyse quantitative de la fluorescence émise est évaluée en cytométrie de flux (FACS).

Tests d'alloreconnaissance

Les tests d'alloreconnaissance sont réalisés par coculture de $2x10^5$ splénocytes Balb/c en présence de 50 ilots C3H préparés avec HBSS ou SCOT + PEG. Les cellules sont cultivées 3 jours à 37°C dans du milieu de culture RPMI 1640 + 10 % SVF + 2 mM glutamine + 5×10^{-5} M de 2 β mercaptoethanol. Au troisième jour de coculture, la [3H]-d thymidine (1 μCuri**e**) est ajoutée durant 18h. L'agent radioactif s'incorpore au brin d'ADN néo-synthétisé au cours de la division cellulaire. Le taux d'incorporation permet d'évaluer la prolifération lymphocytaire conséquente à l'alloreconnaissance antigénique. La prolifération est mesurée par radioactivité sur compteur β. La Concanavaline A (ConA) est utilisée comme contrôle interne de prolifération à raison de 2 μg/mL.

Real Time PCR.

Les ARN sont extraits des îlots par la méthode de Trizol. L'ADN génomique est digéré à l'aide d'un kit DNA-free (Applied Biosystems). Puis une rétrotranscription des ARN est réalisée. L'analyse de l'expression des transcrits est effectuée par PCR en temps réel sur un appareil ABI Prism 7300 (Applied). L'analyse des variations d'expression des transcrits est basée sur l'approche comparative des Ct (Cycle treshold) en normalisant chacun des gènes cibles avec un gène de ménage (Ribosomal Protein 18S (18S)). La condition contrôle sont les îlots préparés avec la solution de référence CMRL-1% BSA sans ischémie chaude. La méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a été utilisée pour l'analyse des résultats de PCR [Schmittgen TD.2008].

$2^{-\Delta\Delta Ct} = [(C_T$ *gène d'intérêt* $- C_T$ *contrôle interne) échantillon A* $- (C_T$ *gène d'intérêt* $- C_T$ *contrôle interne) échantillon B]*

Analyses immunohistologiques

Pour les analyses immunohistologiques, des coupes de 8 µm sont réalisées sur cryostat à partir des tissus congelés. Après préparations des coupes sur lames de microscopie, un immunomarquage est réalisé à l'aide d'anticorps anti CD4 ou anti CD8. Une détection de la coloration liée à la réaction enzymatique (enzyme peroxydase couplée à l'anticorps) est ensuite visualisée sous microscope.

Analyse des cellules infiltrées dans le greffon

Une partie du greffon est séparé du rein et une suspension cellulaire est obtenue par digestion à 37°C durant 30 minutes avec de la collagénase de type IV à 1.6 mg/ml et de la DNase I à 200 µg /ml. Puis, $2x10^6$ cellules sont incubées durant 20 min à 4°C en PBS 1X + 3% SVF avec des anticorps monoclonaux anti CD4, anti CD8, anti CD25, anti CD62L ou anti CD45.1 couplés à un fluorochrome. Les immunomarquages intracellulaires anti Foxp3 sont réalisés avec le kit Cytofix/Cytoperm Plus Pharmingen. Après deux lavages en PBS 1X + 3% SVF, l'analyse quantitative de la fluorescence émise est évaluée en cytométrie de flux.

Tests de prolifération des lymphocytes

Les splénocytes des souris receveuses sont cultivées 3 jours à 37°C dans du milieu de culture RPMI 1640 + 10 % SVF + 2 mM glutamine + 5×10^{-5} M de 2 β mercaptoethanol. Les contrôles des tests d'alloreconnaissance sont réalisés par coculture de 4×10^5 cellules spléniques allogéniques du receveur en présence de 4×10^5 splénocytes du donneur irradiées (20 Gy). Au troisième jour de coculture, la [3H]-d thymidine (1 µCurie) est ajoutée durant 18h. L'agent radioactif s'incorpore au brin d'ADN néo-synthétisé au cours de la division cellulaire. Le taux d'incorporation permet d'évaluer la prolifération lymphocytaire conséquente à l'alloreconnaissance antigénique. La prolifération est mesurée par radioactivité sur compteur β. La Concanavaline A (ConA) est utilisée comme contrôle interne de prolifération à raison de 2 µg/mL

Tests de cytotoxicité des lymphocytes

Pour les tests de cytotoxicité, les splénocytes des souris receveuses (H-2Kq) sont cultivées 5 jours en présence de cellules allogéniques EL-4 (H-2b) chargées en Chrome 51 (51Cr). La cytotoxicité est mesurée par la quantification de la décharge de 51Cr dans le surnageant de culture.

PARTIE I:

I. Préservation du greffon et Immunoprotection du greffon

1 Article 1:

Giraud S, Claire B, Eugene M, Debre P, Richard F, Barrou B. A new preservation solution increases islet yield and reduces graft immunogenicity in pancreatic islet transplantation. Transplantation. May 27; 83(10):1397-400.2007.

1.1 Rappel des objectifs et hypothèses

L'objectif était d'évaluer l'intérêt de la solution SCOT de type extracellulaire et contenant du PEG 20kDa 30g/L, tant au niveau de la préservation de l'intégrité des îlots que de l'immunoprotection du greffon dans un modèle d'isolement et de transplantation d'îlots de Langerhans murins.

On suppose que cette solution pourrait améliorer la conservation du métabolisme cellulaire et participer à une meilleure reprise de fonction du greffon.

On suppose que les PEG contenus dans la solution SCOT permettraient une immunoprotection transitoire en empêchant la reconnaissance des alloantigènes par le système immunitaire du receveur.

1.2 Données non publiées

L'objectif était d'évaluer l'impact de la solution SCOT et des PEG sur la préservation de l'intégrité et de la fonctionnalité des îlots dans un contexte isogénique dépourvu de réactions allogéniques.

Les îlots ont été isolés avec la solution SCOT ou la solution HBSS + 0,5% BSA et cultivés durant 12 jours à 37°C sous 5% CO_2 et 21% O_2 en milieu de culture RPMI + 5% SVF additionné ou non de PEG 20kDa 30g/L. L'analyse morphologique a été réalisée afin d'évaluer la préservation de l'intégrité des îlots après 12 jours de culture (Figure 25).

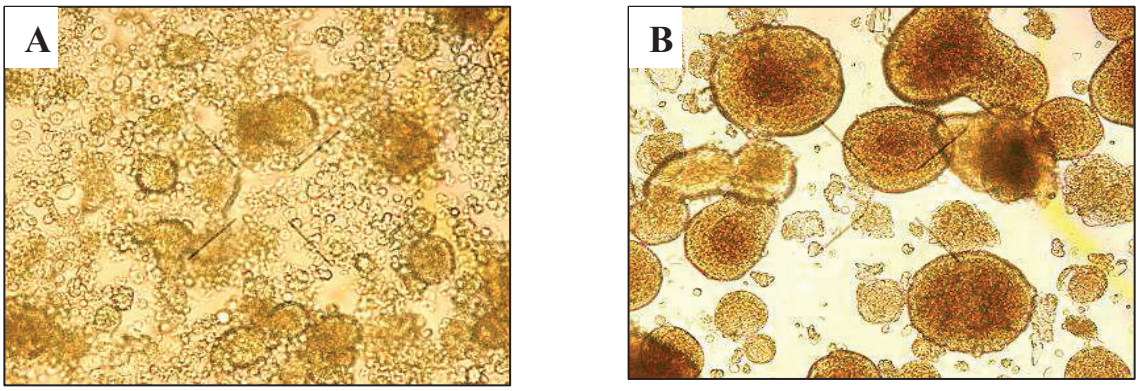


Figure 25 : Culture prolongée des îlots durant 12 jours (Grossissement X100).
Les îlots isolés en HBSS +0,5% BSA puis cultivés en RPMI + 5% SVF sans PEG ont perdu leur intégrité cellulaire après 12 jours de culture (A), alors que les îlots isolés en SCOT et cultivés en RPMI + 5% SVF + 30g/L de PEG 20 kDa ont conservé, pour la plupart, leur intégrité cellulaire (B).

Afin d'évaluer la préservation de la fonction insulinosécrétrice des îlots, nous avons procédé à un test de stimulation au glucose. Après 24 heures ou 12 jours de culture, les îlots ont été incubés dans des conditions basales ou de stimulation (Figure 26). La condition basale (Krebs + glucose 5 mM) permet d'évaluer la sécrétion insulinique des îlots dans des conditions non stimulantes. L'ajout de glucose 20 mM permet d'évaluer la sécrétion insulinique des îlots dans des conditions stimulantes.

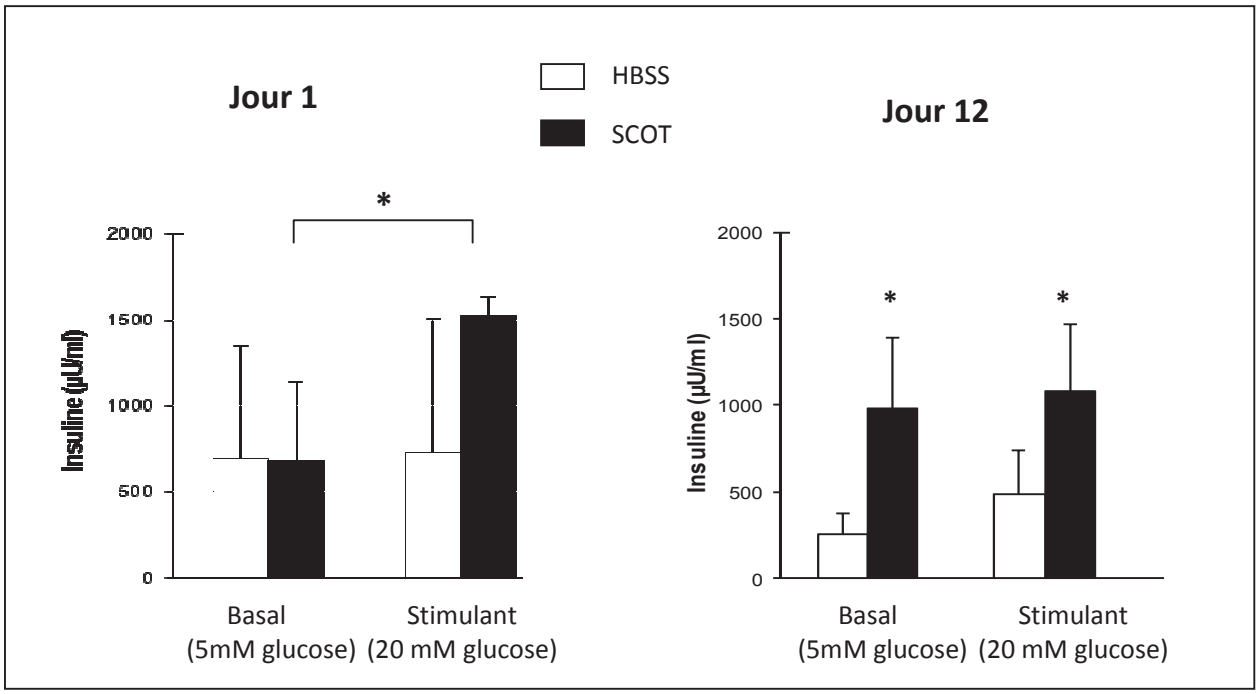


Figure 26 : Evaluation des conditions de préservation de la fonction insulinosécrétrice des îlots après 1 jour ou 12 jours de culture.

*Dosages d'insulines sécrétées après stimulation des îlots isolés en HBSS + 0,5% BSA et cultivés en RPMI + 5% SVF et des îlots isolés en SCOT et cultivés en RPMI + 5% SVF + 30g/L de PEG 20 kDa (cultures 24h et 12 jours) (Test de comparaison 2 à 2 avec la correction de Bonferroni, *p<0,05).*

Ces résultats montrent que la solution SCOT et l'ajout de PEG 20kDa à 30g/L durant la culture, permet de préserver l'intégrité des îlots, la viabilité cellulaire ainsi que la fonction insulinosécrétrice des cellules β, après 24h comme 12 jours de culture *in vitro*. Après stimulation au glucose 1 jour après isolement, les îlots isolés avec la solution HBSS + 0,5% BSA puis cultivés en RPMI + 5% SVF sécretent significativement moins d'insuline (729 ± 778 µU/mL équivalent à 4379 ± 4669 pmol/L) par rapport aux îlots isolés en SCOT puis cultivés en RPMI + 5% SVF + 30g/L de PEG 20 kDa (1528 ± 110 µU/mL équivalent à 9172 ± 664 pmol/L). Après 12 jours de culture les îlots isolés en HBSS + 0,5% BSA puis cultivés en RPMI + 5% SVF sécretent significativement moins d'insuline (483 ± 260 µU/mL équivalent à 2900 ± 1564 pmol/L) par rapport aux îlots isolés en SCOT puis cultivés en RPMI + 5% SVF + 30g/L de PEG 20 kDa (1083 ± 383 µU/mL équivalent à 6501 ± 2303 pmol/L).

Nous avons ensuite voulu savoir si cette amélioration des conditions de préservation, permettait d'améliorer la reprise de fonction du greffon. Pour cela, nous avons réalisé des greffes isogéniques chez des souris diabétiques, de 1000 IEQ isolés avec HBSS + 0,5% BSA ou avec SCOT et cultivés 24h en milieu de culture additionné ou non de PEG 20kDa 30 g/L (n=7). Nous avons quantifié le taux de Non Fonction Primaire (NFP), définie par l'absence de normalisation de la glycémie durant la première semaine post-greffe (Tableau 15). La survie du greffon fonctionnel a été vérifiée par néphrectomie du rein porteur du greffon.

Tableau 15 : Tableau récapitulatif du taux de NFP obtenus pour les isogreffes d'îlots préparés avec HBSS + 0,5% BSA ou avec SCOT.

Isogreffes de 1000 IEQ	HBSS	SCOT	p
Nombre d'animaux	7	7	
% de Non Fonction Primaire	28%	0%	<0.01

Les NFP sont significativement plus fréquentes dans le groupe HBSS + 0,5% BSA (28%) et inexistantes dans le groupe SCOT ($p< 0,001$). La fonctionnalité des îlots est donc mieux préservée avec la solution SCOT qu'avec l'HBSS, permettant ainsi une meilleure reprise de fonction des greffons.

1.3 Publication

A New Preservation Solution Increases Islet Yield and Reduces Graft Immunogenicity in Pancreatic Islet Transplantation

Giraud Sebastien,[1] Claire Blandine,[1] Eugene Michel,[2] Debre Patrice,[1] Richard François,[3] and Barrou Benoit[1,3,4]

The aim of the study was to test a new preservation solution containing polyethylene glycol (S.C.O.T. solution) as pancreatic islet isolation medium both to increase the islet yield and to prolong the allograft survival. In a model of islet transplantation in diabetic mouse, islets were isolated with S.C.O.T. in experimental groups and with Hank's balanced salt solution (HBSS) in control groups. The use of S.C.O.T. solution improved the islet yield (596±27 IEQ/pancreas) as compared to HBSS (456±11 IEQ/pancreas) ($P<0.001$). Allograft survival was prolonged in experimental group (17.3±4.3 days) versus controls (7.3±3.6 days) in a full mismatch combination ($P<0.001$) and in absence of recipient immunosuppression. The same prolongation (10 days) was also found in a strongly alloreactive transgenic combination. It is hypothesized that a transitory phenomenon of immunocamouflage of the graft surface antigens occurs, as shown by immunofluorescence studies. The use of this new solution could improve the results of islet transplantation in humans.

Keywords: Transplantation, Islets of Langerhans, Preservation solutions, Polyethyleneglycol.

(*Transplantation* 2007;83: 1397–1400)

Despite major improvements during the last years, the results of islet transplantation are not satisfactory enough to make this approach a routine treatment for type I diabetes (*1*, *2*). Two reasons for this regard the early phase of graft preparation and engraftment: 1) islet isolation is difficult and the cell yield is usually around 40%, and 2) islets are subjected to both nonspecific (inflammation) and specific (allorecognition) injuries during engraftment resulting in islet loss. The aim of the study was to address these two issues by using a new organ preservation solution as medium during the isolation-purification process. This solution, called S.C.O.T. (*Solution de Conservation d'Organes et de Tissus*), has two main characteristics: 1) a low K^+ concentration to avoid cell membrane depolarization and adenosine triphosphate (ATP) depletion, and 2) the presence of polyethylene glycol (PEG) 20kDa. This polymer acts as a colloid maintaining H_2O molecules in the extracellular compartment but also as a shield temporarily masking the cell surface antigens. PEG binds to membrane phospholipids and polarizes H_2O molecules in six to eight layers, resulting in the formation of a "cloud" surrounding the cells. The beneficial effect of S.C.O.T. has been established in a model of isolated perfused pig kidney and pig kidney autotransplantion (*3*–*6*) where it decreased ischemia-reperfusion injuries. Moreover, a recent work has shown that S.C.O.T. was the most efficient commercial solution to preserved cell viability and confirmed PEG antioxidative properties (*7*). S.C.O.T. composition is as follows: 118.0 mM Na^+, 5.00 mM K^+, 1.20 mM $Mg2^+$, 1.75 mM $Ca2^+$, 11.00 mM glucose, and 30.00 g/L PEG 20kDa. The aim of the study was to determine whether S.C.O.T. could improve the islet yield and have some immunoprotective effects on a murine pancreatic islet allograft model.

Animal experimentations were performed according to the European Economic Community guidelines. In control groups (Hank's balanced salt solution [HBSS]), pancreas were distended in situ by injection through the biliary duct of a solution of HBSS-1X (Gibco-BRL, Cergy-Pontoise, France) +0.5% bovine serum albumin (BSA; Sigma, Saint-Quentin, France) containing 0.33 mg/mL of Liberase RI (Roche-diagnostics, Meylan, France). The gland was then incubated in HBSS-1X+0.5% BSA at 37°C for 12 min without mechanical disruption (stationary digestion). Vials were then shacked. Islets were then purified on a discontinuous density gradient, obtained by mixing Ficoll (Amersham, Orsay, France) and Eurocollins (UFCH, Libourne, France). Islets were then washed, handpicked to obtain 100% purity and counted according to the islet equivalent (IEQ) method (*8*). Islets were then cultured overnight in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Sigma) culture medium containing 10% Fetal Calf Serum (Gibco-BRL) at 37°C in 5% CO_2. HBSS-1X+0.5% BSA was used to wash the cells at all steps in control groups. In the S.C.O.T. groups, islets were isolated with the same procedure but HBSS-1X+0.5% BSA was replaced by S.C.O.T. (Macopharma, Tourcoing, France), and PEG 20 kDa (30 g/L) (Merck, Hohenbrunn, Germany) was added to RPMI for overnight culture. Recipients were rendered diabetic by intraperitoneal injection of streptozotocin (Sigma; 250 mg/kg). Only recipients with two consecutive blood glucose determinations >350 mg/dL at an interval of 72 hr were eligible. Anesthesia was induced with ketamine (80 mg/kg) and xyla-

This work was supported by grants from MacoPharma France, Académie de Médecine, Université Pierre et Marie Curie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and Assistance-Publique des Hôpitaux de Paris.

[1] Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR S543, Pitié Salpetrière, 75013 Paris, France; INSERM, UMR S543 Paris, 75013 France.
[2] CHU Poitiers, Service de Physiologie; UNIV Poitiers 86000 Poitiers France.
[3] AR-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service d'Urologie, 75013 Paris France.
[4] Address correspondence to: Benoît Barrou, M.D., Ph.D., Service d'Urologie, Unité de Transplantation Rénale et Pancréatique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpetriere, 83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.
E-mail: benoit.barrou@psl.aphp.fr

Received 20 July 2006. Revision requested 19 January 2007.
Accepted 9 February 2007.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/07/8310-1397
DOI: 10.1097/01.tp.0000261636.16197.45

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

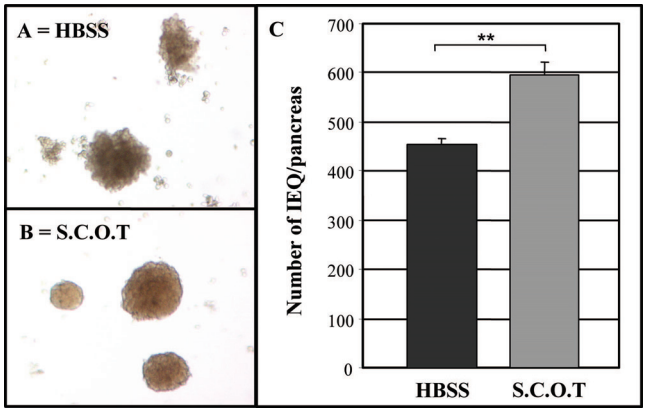


FIGURE 1. Islet morphology and islet yield 1 hour after isolation. (A) The majority of islets isolated with HBSS were dissociated. (B) The majority of islets isolated with S.C.O.T. kept their initial morphology (magnification ×60). (C) Islet yield. A mean of 456±11 IEQ/pancreas were obtained in the HBSS group (n=20) vs. 596±27 IEQ/pancreas in the S.C.O.T. group (n=21). Results are expressed as mean±SD (Student's *t* test, $P<0.001$).

zine (4 mg/kg). To reach normoglycemia within the first hours (to assess early events posttransplant), 550 islets were grafted under the left kidney capsule (*9*). As expected, normoglycemia (<150 mg/dL) was reached within 6 hr. No immunosuppressive medication was administered to recipients. Blood glucose determinations were performed using a glucometer (Bayer-Diagnostics, Puteaux, France) every other day. Rejection was defined by two successive blood glucose determinations >200 mg/dL. Control and experimental groups were performed simultaneously.

Islets either isolated with HBSS or S.C.O.T. were compared in light microscopy. Islet morphology (observed 1h after isolation) was better preserved with S.C.O.T. than HBSS (Fig. 1). A mean of 456±11 IEQ/pancreas were obtained in the HBSS group (n=20) versus 596±27 IEQ/pancreas in the S.C.O.T. group (n=21; Student's *t* test, $P<0.001$). To assess the putative immunoprotective properties of S.C.O.T., a full mismatch allograft model was used (donors C3H and recipients Balb/c). In the S.C.O.T. group, mean allograft survival was prolonged (17.3±4.3 days), as compared to the HBSS group (7.3±3.6 days; log-rank test, $P=0.0008$; Fig. 2A). To further confirm the immunological effects of S.C.O.T., a model of strong acute rejection was used. Donors Balb/c (InsHA) expressed the peptide hemagglutinin-A (HA) of the virus influenzae on β cells (*10*). Recipients Balb/c (CL4) expressed a transgenic H-2K^d-restricted T-cell receptors (TCRs; Vα10; Vβ8.2) specific for HA on CD8$^+$ T cells (*11*). The repertoire of these recipients was highly skewed, as 70 to 98% of CD8$^+$ T cells expressed this transgenic TCR, leading to an early and very strong graft rejection when HA is expressed on the graft. As expected, in the InsHA to CL4 combination, graft rejection occurred early in the HBSS group (2.4±0.4 days) and was significantly prolonged in the S.C.O.T. group to 12.5±0.5 days (log-rank test, $P=0.03$; Fig. 2B). To further understand the mechanism of graft prolongation, immunofluorescence studies were performed either on islet cells after islet dissociation and on whole islets. Islets were dissociated with Dispase (Roche Diagnostics; 1 mg/100 islets, 15 min, 37°C) and cells were incubated overnight at 37°C in 5% CO_2 in RPMI±PEG 20 kDa and then stained with an anti-H-2K^k biotylined monoclonal antibody (Tebu-Bio, Le Perray, France) and Streptavidin-Phycoerythrin (BD Bioscience, Erembodegem, Belgium). Whole islets were fixed on polylysine slides (Dutscher, Brumath, France) and cultured overnight in RPMI± PEG 20kDa. Islets were then incubated with an anti-H-2K^k biotylined monoclonal antibody, with streptavidine-horseradish peroxidase and with tyramide/fluorescein isothiocyanate (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). In both experiments (Fig. 3A and B), Major histocompatibility complex (MHC) class I molecules were almost undetectable on islet cells prepared with S.C.O.T. but were clearly detectable on islet cells prepared with HBSS, suggesting that the S.C.O.T. was responsible for an immunocamouflage phenomenon. To demonstrate the effects of the S.C.O.T. solution on the islet antigens allorecognition, a coculture of 2×10^5 Balb/c spleno-

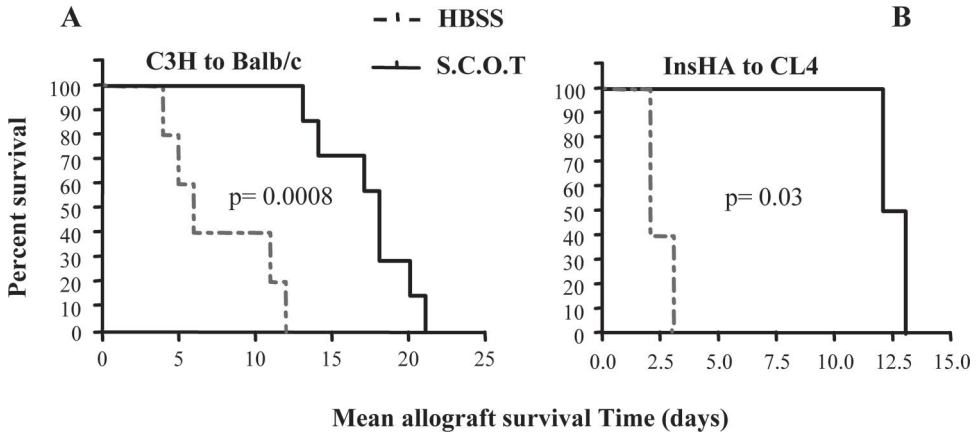


FIGURE 2. Islet allograft survival time. (A) C3H to Balb/c model: in the S.C.O.T. group (n=7), mean allograft survival was significantly prolonged to 17.3±4.3 days, as compared to 7.3±3.6 days in the HBSS group (n=6). Results are expressed as mean±SD (log-rank Test, $P<0.001$). (B) InsHA to CL4 model: the mean graft survival was significantly prolonged to 12.5±0.5 days with S.C.O.T. prepared islets (n=2) as compared to 2.4±0.4 days with HBSS prepared islets (n=5). Results are expressed as mean±SD (log-rank Test, $P=0.03$).

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

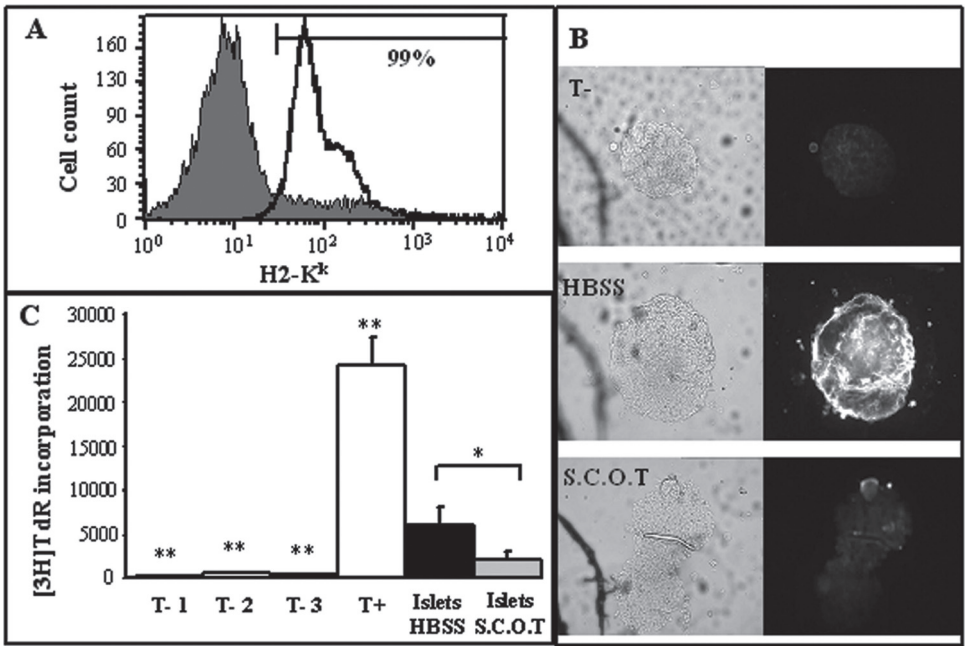


FIGURE 3. (A) MHC class I detection at the surface of islet cells. When islet cells were prepared with HBSS and cultured in RPMI (open curve), 99% of islet cells expressing class I (H-2K^k) molecules were detected on cytometry analysis. Only 11% of islet cells expressing class I molecules were detected, when islet cells were prepared with S.C.O.T. and cultured overnight in RPMI+30g/L PEG 20 kDa (close curve). (B) Immunofluorescence study on whole islets. Islets were stained with an anti-H-2K^k monoclonal antibody. Negative controls (T-) consisted of irrelevant antibody. MHC class I molecules were almost undetectable on islets prepared with S.C.O.T. and cultured in RPMI+30 g/L PEG 20 kDa, but were clearly detectable on islets prepared with HBSS and cultured in RPMI (magnification ×400). (C) Proliferation of 2×10^5 Balb/c lymphocyte in presence of 50 allogenic islets was measured by [^{3}H]-d Thymidine incorporation. Negative control T-1 consisted of unstimulated Balb/c splenocytes. Negative control T-2 consisted of Balb/c spleen cells with Balb/c islets and negative control T-3 consisted of C3H spleen cells with C3H islets. Positive controls (T+: black bar) consisted of Balb/c splenocytes pulsed with 2 μg/mL of Concanavalin A. Lymphocyte proliferation with HBSS islets (gray bar) was significantly higher (6005±2070 cpm) than with S.C.O.T. islets (white bar; 2188±768 cpm). Results are expressed as means±SD (Student's *t* test, $P<0.05$).

cytes/well with 50 C3H islets prepared with HBSS or S.C.O.T. was performed in 96-well plate at 37°C in RPMI. On day 3, [^{3}H]-d thymidine (1 μCi/well) was added for 18 hr. Incorporation was measured in a liquid scintillation counter. Islets isolated with S.C.O.T. were weak stimulators as compared to islet isolated with HBSS (Student's *t* test, $P<0.05$; Fig. 3C), suggesting that cell surface antigens could have been masked by S.C.O.T.

In our hands, S.C.O.T. improved islet morphology and consequently islet yield. The mechanism is not fully understood. Previous studies have suggested that it could be related to the osmotic and/or oncotic and/or reactive oxygen species scavenger properties of PEG (*12*, *13*). In addition, PEG preserves ATP content resulting in the reduction of cellular necrosis and preservation of cellular integrity in vivo (*6*) and in vitro (*7*). To date, most of the cases of insulin independence in the clinical setting have been obtained with several donors for one single recipient and the relatively low islet yield remains one of the reasons. Attempts to reach a 1:1 donor-to-recipient ratio are of importance and the use of S.C.O.T. could be of great help in this regard. Using a full mismatch donor-recipient combination, we demonstrated that S.C.O.T. prolonged allograft survival by 10 days. The mechanism of prolongation is not completely understood. It has been hypothesized that a phenomenon of immunocamouflage could occur (*14*, *15*). We thus assessed the expression of MHC class I molecules on islet cells by cytofluorometry and on whole islets by immunofluorescence. In both experiments, the percentage of MHC class I positive cells was markedly reduced when islets were prepared with S.C.O.T. and cultured with PEG (Fig. 3A and B). Another evidence of immunomasking properties of S.C.O.T. comes from the results of the mixed lymphocyte islet coculture experiment as S.C.O.T. prepared islets were weak stimulators (Fig. 3C). In accordance with the immunocamouflage theory, we raised the hypothesis that the same allograft survival prolongation should be obtained no matter the number of recipient immune effectors able to reject the graft. We used two different effector frequencies and interestingly we obtained the same prolongation (10 days). The adsorption of PEG molecules at the membrane surface depends on its molecular weight. It as been shown that PEG 20 kDa is adsorbed at the surface of an antigen-presenting cell (APC) in a mushroom-like shape with a height of about 15–20 nm. This is in the same range as the size of the immunological synapse between TCR and MHC (*15*). Physically speaking, PEG 20 kDa has the potential to mask MHC molecules, thus to deeply interfere with antigen presentation. The effects of adsorbed PEG are inevitably limited in time because of their spontaneous clearance within days after transplantation.

The question of the long-term effect of a transitory camouflage of cell surface antigens has to be raised. Accord-

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

ing to the Danger Signal Theory (*16*), ischemia-reperfusion injury strongly triggers the recipient immune system (both innate and adaptive). This acute, short lasting situation has deleterious long-term effects (*17*). It is possible that a transient reduction of antigen presentation (as shown in our results) and a decrease of inflammatory phenomena (*6*) at a critical step of allorecognition could minimize the effects of the "danger signal" and its long-term consequences. This has now to be investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank I. Rodde-Astier (Macopharma) for providing the S.C.O.T. solution; S. Lecourt, C. Duros, and A. Aribi, for technical help; and Bayer Diagnostics and Roche France for kindly providing some of the reagents used.

REFERENCES

1. Bertuzzi F, Marzorati S, Secchi A. Islet cell transplantation. *Curr Mol Med* 2006; 6: 369.
2. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006; 355: 1318.
3. Eugene M, Hauet T, Mothes D, et al. Beneficial effects of a low-potassium+ and polyethylene glycol solution on renal function and structure during 48-hour cold storage preservation. *Transplant Proc* 1997; 29: 2360.
4. Faure JP, Petit I, Zhang K, et al. Protective roles of polyethylene glycol and trimetazidine against cold ischemia and reperfusion injuries of pig kidney graft. *Am J Transplant* 2004; 4: 495.
5. Hauet T, Baumert H, Amor IB, et al. Protection of autotransplanted pig kidneys from ischemia-reperfusion injury by polyethyleneglycol. *Transplantation* 2000; 70: 1569.
6. Hauet T, Goujon JM, Baumert H, et al. Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotransplanted pig kidneys. *Kidney Int* 2002; 62: 654.
7. Dutheil D, Rioja-Pastor I, Tallineau C, et al. Protective effect of PEG 35,000 Da on renal cells: paradoxical activation of JNK signaling pathway during cold storage. *Am J Transplant* 2006; 6: 1529.
8. Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, et al. Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat* 1990; 27: 185.
9. Barrou B, Bertry-Coussot L, Morin S, et al. Prolonged islet allograft survival by adenovirus-mediated transfer of sICAM-1/Ig immunoadhesin gene. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1441.
10. Lo D, Freedman J, Hesse S, et al. Peripheral tolerance to an islet cell-specific hemagglutinin transgene affects both CD4+ and CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1013.
11. Vizler C, Bercovici N, Heurtier A, et al. Relative diabetogenic properties of islet-specific Tc1 and Tc2 cells in immunocompetent hosts. *J Immunol* 2000; 165: 6314.
12. Marsh DC, Lindell SL, Fox LE, et al. Hypothermic preservation of hepatocytes. I. Role of cell swelling. *Cryobiology* 1989; 26: 524.
13. Mack JE, Kerr JA, Vreugdenhil PK, et al. Effect of polyethylene glycol on lipid peroxidation in cold-stored rat hepatocytes. *Cryobiology* 1991; 28: 1.
14. Collins GM, Wicomb WN, Levin BS, et al. Heart preservation solution containing polyethyleneglycol: An immunosuppressive effect? *Lancet* 1991; 338: 890.
15. Eugene M. Polyethyleneglycols and immunocamouflage of the cells tissues and organs for transplantation. *Cell Mol Biol* 2004; 50: 209.
16. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 114.
17. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004; 364: 1814.

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

1.4 Synthèse

Le but de ces travaux a été d'évaluer les effets d'une nouvelle solution de conservation d'organes et de tissus (solution SCOT) sur la préservation de l'intégrite cellulaire et sur l'immunoprotection du greffon. La solution de conservation SCOT de type extracellulaire contenant 30g/L de PEG 20kDa a été utlisée à toutes les étapes de l'isolement des îlots en comparaison avec la solution HBSS + 0,5% BSA. Chez la souris, après injection de Libérase dans le canal de Wirsung via le collédoque, le pancréas a été explanté. Nous avons isolé les îlots pancréatiques murins par gradient de ficoll. La masse d'îlot obtenue fut quantifiée et les îlots ont ensuite été "cultivés" en milieu de cuture supplémenté ou non avec du PEG 20kDa 30g/L durant 1 ou 12 jours à 37°C sous 21% O_2 5% CO_2.

L'obtention des îlots avec la solution SCOT a permis de significativement augmenter le rendement d'îlots en fin d'isolement (596 ± 27 IEQ/pancreas) comparé à la solution HBSS + 0,5% BSA (456 ± 11 IEQ/pancreas) ($p<0.001$). L'utilisation de la solution SCOT durant l'isolement couplée à l'ajout de 30g/L de PEG 20kDa durant la culture, a également permis de mieux préserver l'intégrité cellulaire et la fonctionnalité des îlots après 1 jour et 12 jours de culture à 37°C. En effet après stimulation au glucose, 1 jour après isolement, les îlots isolés avec la solution HBSS + 0,5% BSA puis cultivés en RPMI + 5% SVF sécretent significativement moins d'insuline (4379 ± 4669 pmol/L) par rapport aux îlots isolés en SCOT puis cultivés en RPMI + 5% SVF + 30g/L de PEG 20 kDa (9172 ± 664 pmol/L). Après 12 jours de culture les îlots isolés en HBSS + 0,5% BSA puis cultivés en RPMI + 5% SVF sécretent significativement moins d'insuline (2900 ± 1564 pmol/L) par rapport aux îlots isolés en SCOT puis cultivés en RPMI + 5% SVF + 30g/L de PEG 20 kDa (6501 ± 2303 pmol/L).

Après transplantation des îlots chez la souris diabétique, les bénéfices de cette solution et des PEG ont permis une reprise de fonction immédiate de 100% des isogreffes, comparé aux îlots isolés avec HBSS + 0,5% BSA dont le taux de non fonction primaire était de 28%. La survie des allogreffes d'îlots SCOT a significativement été prolongée dans un modèle allogénique. Cette prolongation semble due à un immunomasquage des alloantigènes de surface du greffon conservé avec des PEG 20kDa. En effet des tests d'évaluation de l'immunodétection des molécules du CMH à la surface des cellules β et des îlots, ont révélé une inhibition de l'immunodetection d'environ 89% des antigènes de surface sur des cellules traitées avec SCOT et des PEG 20kDa 30g/L. Ces propriétés immunoprotectrices ont été

confirmées *in vivo* dans un modèle transgénique de rejet suraigu d'ilots pancréatiques, dans lequel la durée de prolongation de survie fut de 10 jours comme dans le modèle de rejet aigu, suggérant un rôle immunomasquant des PEG d'environ 10 jours.

L'utilisation d'une solution de conservation de type extracellulaire contenant des PEG PEG 20kDa 30g/L permet une meilleure préservation de l'intégrité cellulaire, une meilleure reprise de fonction et une immunoprotection transitoire évidente sur la durée de survie de l'allogreffe.

II. Variation des longueurs de chaines et des concentrations des PEG

2 Article 2 :

Giraud S, Bon D, Neuzillet Y, Thuillier R, Eugene M, Hauet T, Barrou B. Concentration and chain length of Polyethylene Glycol in islet isolation solution, evaluation in a pancreatic islet transplantation model. Cell Transplant. 2012;21(9):2079-88.

2.1 Rappel des objectifs et hypothèses

Dans le but de pallier aux problèmes de rinçage du foie avec la solution SCOT contenant 30g/L de PEG 20kDa, observés en clinique, nous avons souhaité optimiser les PEG contenus dans cette solution.

L'objectif de notre groupe de travail était de définir la meilleure longueur de chaine de PEG et la meilleure concentration. Pour cela, nous avons comparé les effets des PEG 20 et 35 kDa à différentes concentrations. Nous avons choisi une comparaison avec le PEG 35 kDa, car cette taille de PEG est utilisée dans la solution IGL-1. Cette étude a été menée dans 2 modèles expérimentaux : notre modèle murin d'isolement et de transplantation d'îlots (travaux présentés dans ce manuscrit), et en parallèle dans un modèle préclinique de conservation et transplantation de rein chez le porc, au sein de l'unité Inserm du Pr Thierry Hauet (travaux auxquels j'ai collaboré).

Ces travaux sur le modèle porcin ont abouti à 2 publications :

Thuillier R, Giraud S, Favreau F, Goujon JM, Desurmont T, Eugene M, Barrou B, Hauet T. Improving long-term outcome in allograft transplantation: role of ionic composition and polyethylene glycol. Transplantation. 2011 Mar 27;91(6):605-14.

Thuillier R, Giraud S, Manguy E, Barrou B, Vallagier A, Puichaud A, Eugene M, Hauet T. Finding the optimal PEG to use in kidney graft preservation: a preclinical porcine study. (Manuscrit en cours de soumission).

2.2 Publication

Cell Transplantation, Vol. 21, pp. 2079–2088, 2012
Printed in the USA. All rights reserved.
Copyright © 2012 Cognizant Comm. Corp.

0963-6897/12 $90.00 + .00
DOI: http://dx.doi.org/10.3727/096368912X638928
E-ISSN 1555-3892
www.cognizantcommunication.com

Concentration and Chain Length of Polyethylene Glycol in Islet Isolation Solution: Evaluation in a Pancreatic Islet Transplantation Model

S. Giraud,*†‡ D. Bon,*‡ Y. Neuzillet,§¶ R. Thuillier,*†‡
M. Eugene,*†‡ T. Hauet,*†‡ and B. Barrou*#**

*INSERM U1082, Poitiers, France
†Service de Biochimie, CHU Poitiers, Poitiers, France
‡Université de Poitiers, Faculté de Médicine et de Pharmacie, Poitiers, France
§Service d'urologie et transplantation rénale, Hôpital Foch, Suresnes, France
¶Faculté de médecine Paris-Ile de France ouest, UVSQ, Versailles, France
#Service d'Urologie, GH Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris, France
**UPMC Université Paris VI, Paris, France

To improve graft preservation and consequently reduce conservation injuries, the composition of preservation solution is of outmost importance. It was demonstrated that the colloid polyethylene glycol (PEG), used in SCOT solution, has protective effects on cell membranes and immunocamouflage properties. The aim of this study was to optimize the concentration and chain length of PEG to improve pancreatic islet preservation and outcome. In a model of murine islet allotransplantation, islets were isolated with SCOT containing various concentrations of PEG 20 kDa or 35 kDa. Better islet yield (IEQ) was obtained with SCOT + PEG at 15–30 g/L versus other PEG concentrations and control CMRL-1066 + 1% BSA solution ($p < 0.05$). Allograft survival was better prolonged (up to 20 days) in the groups SCOT + PEG 20 kDa 10–30 g/L compared to PEG 35 kDa (less than 17.8 days) and to control solutions (less than 17.5 days). In terms of graft function recovery, the use of PEG 20 kDa 15–30 g/L induced no primary nonfunction and delayed graft function contrary to CMRL-1066 and other PEG solutions. The use of the extracellular-type solution SCOT containing PEG 20 kDa 15 g/L as colloid could be a new way to optimize graft integrity preservation and allograft outcome.

Keys words: Ischemia reperfusion injury; Preservation solution; Polyethelene glycol (PEG); Graft preservation; Graft outcome

INTRODUCTION

During the transplantation procedure, the graft is exposed to an extracorporeal conservation sequence from tissue procurement until transplantation in recipient, inducing metabolism and integrity graft disorders. Typically, the resulting conservation injury causes graft primary nonfunction (PNF) or delayed graft function (DGF), which play a major role in graft loss and development of chronic graft failure (47,50). In addition, the shortage of donors has led transplant centers to accept extended criteria donors, whose organs are more prone to graft conservation injury, resulting in increased PNF and DGF rates. This emphasizes the importance of organ preservation (25,40).

Islet transplantation provides a promising alternative to whole pancreas transplantation for type I diabetes treatment because of a reduced morbidity rate and decreased invasiveness of the surgical procedure (54). However, despite major improvements during the last years (10), islet transplants are associated with significantly lower engraftment efficiencies than whole pancreas transplants. One major reason for the poor functional islet yield obtention is that islet isolation is difficult, with important islet integrity and function disorders, variations from group to group and from pancreas to pancreas. As a consequence, many transplants are performed with a donor/recipient ratio of at least 2:1. Hence, the optimization of islet preservation/isolation method is of paramount importance (1,12,14,41,44,46,48,56).

To improve graft preservation and consequently reduce injury, the composition of preservation solution is

Received November 3, 2010; final acceptance November 18, 2011. Online prepub date April 10, 2012.
Address correspondence to Pr. Benoît Barrou, Service d'Urologie, Unité de Transplantation Rénale et Pancréatique, GH Pitié-Salpetriere, 83 Boulevard de L'Hôpital, 75013 Paris, France. Tel: +33-1-42-17-71-14; Fax: +33 1 42 17 71 93; E-mail: benoit.barrou@psl.aphp.fr

critical (2,25,57). Several solutions, such as University of Wisconsin (UW) solution, present a high potassium content, which induces a depolarization of the cellular membrane, an adenosine triphosphate (ATP) depletion, and consequently a cellular acidosis (2,17,25,35). Current solutions, such as the current gold standard CMRL-1066 (Connaught Medical Research Laboratories-1066), are based on extracellular ionic balance (low potassium, high sodium), which is more appropriate for graft preservation (2,17,25,35).

Other elements of preservation are impermeants and colloids. Impermeants are predominantly effective at the level of cell membranes and at the interstitial compartment, while colloids are used for cell membranes and intravascular compartment (40). For long preservation times, the presence of a colloid appears important to maintain organ viability (55). However, it is important to select the right colloid. Indeed, it has been shown that HES (hydroxyethyl starch) induces side effects such as renal macrophage infiltration (31), tubular damages (11,31), renal cell vacuolization (31), and red blood cells aggregation (42,51). Other colloids, such as albumin, are used (e.g., in CMRL-1066); however, the production process is long and expensive. These elements initiated a search for other colloids, such as polyethylene-glycol (PEG) (5,7,9), an inexpensive polymer. The neutral and nontoxic PEG polymer acts as a colloid promoting cellular membrane stabilization by long-lasting hydrogen bonds, limiting cellular edema, and masking cell surface antigens (4,8,16,22,32,34,39,43,53,58,61,63). PEG binds to the membrane and polarizes H_2O molecules in six to eight layers, resulting in the formation of a "water cloud" surrounding the cells (8,16).

The first study reporting the effects of PEG containing solution was from Collins et al. in 1991 (13). They introduced PEG 20 kDa (50 g/L) in a modified UW solution (Cardiosol®) to replace the HES and used it for human heart transplantation. Unexpectedly, the rate of acute rejection in recipients who received modified solution-preserved donor hearts was decreased (50% at 1 year versus 78% in all other heart transplant recipients). They suggested a direct suppressing effect of the PEG on the immune reaction. Several experimental studies confirmed the preservation efficacy and immunosuppressive property of PEG for preservation of liver (4,58) as well as for kidney (17,18,23,24,27), pancreas (63), pancreatic islets (22,59,60), small bowel (32), lung (35), and red blood cells (8,43,53).

The necessity to use a low K^+ solution ("extracellular type" composition) with a nontoxic colloid such as PEG to prevent cell edema is now well established (2,25,57). Our group designed an initial preservation solution, named SCOT (Solution de Conservation des Organes et des Tissus) (17,22), with two main characteristics: (i) an extracellular K^+ concentration (5 mM K^+) to avoid cell membrane depolarization and ATP depletion and (ii) the presence of 30 g/L of PEG 20 kDa. The benefits of SCOT were established in models of isolated perfused pig kidney and pig kidney autotransplantation (23,26,28) where SCOT decreased ischemia/reperfusion injuries and immune cell infiltration (27). Jayle et al. in 2003 showed better vascular resistance and reduction of cellular and mitochondrial edema in a pig lung preservation model with SCOT (35). Moreover, a recent in vitro study has shown that SCOT was the most efficient commercial solution to preserve cell viability and confirmed PEG antioxidative properties (15). In our experience, the use of the initial SCOT solution (containing 30 g/L of PEG 20 kDa) as an isolation medium prolonged graft survival significantly in two models of allograft rejection, including a transgenic model in which >90% of the recipient CD8 TCR was specific for an antigen expressed on the graft islet β cells (22).

Different chain lengths (i.e., molecular weight) and concentrations of PEG can be used. Indeed, a study showed that IGL-1 solution (containing 1 g/L of PEG 35 kDa) demonstrated similar islet isolation results as the UW solution, making the PEG-containing solution a promising alternative (62). It appears that the optimal concentration and chain length of PEG remains to be determined. The goal of the present work is to complete our previous study (22,45) by testing several PEG chain lengths (20 and 35 kDa) and several concentrations of PEG in SCOT during murine pancreatic islet isolation and investigate its impact on allotransplantation.

MATERIALS AND METHODS

Groups

To optimize the PEG properties in the SCOT solution (Macopharma, France), different concentrations and molecular weight (MW) of PEG (Sigma Aldrich, France) were added to SCOT and compared to control solutions: SCOT without PEG (Macopharma), UW (Bristol Meyers Squibb, France) standard preservation solution, Hank's balanced salt solution 1× (HBSS) (Gibco-BRL, France) +0.5% bovine serum albumin (BSA) (Sigma), and CMRL-1066 (Gibco BRL) + 1% BSA currently used in islet preservation (29,37,38).

Groups consisted of allograft with islets isolated with the different solutions: SCOT without PEG, HBSS + 0.5% BSA, CMRL-1066 + 1% BSA, UW, SCOT + PEG 20 kDa at 0.5, 10, 15, 20, and 30 g/L or PEG 35 kDa 1, 5, 15, 20, 52 g/L ($n = 5-8$).

Osmolarity and Viscosity

Osmolarity was measured by freezing point depression, with an osmometer (Hermann Roebling Messtechnik,

Berlin, Germany). Viscosity was measured at room temperature using a Cannon Fensk type viscometer 1634 (Rheotec, France). The Cannon Fenske tube measures kinematic viscosity in units of centistokes (cSt) and equates to time of flow multiplied by tube constant (size 75 according to viscosity).

Animals

Male mice were purchased from Charles River (France) and housed in a small animal facility. Mice were kept under specific pathogen-free conditions and manipulated according to European Council Directive 86/609/EEC, defining the protection guidelines of animals used for experimental and other scientific purposes. A full mismatch allograft model was used, donors were C3H (H-2K^k) mice, and recipients were Balb/c (H-2K^d) mice (6 weeks old). In all experiments, experimental groups were performed by the same operator.

Islet Isolation

Briefly, pancreas was distended in situ by injection through the biliary duct and the Wirsung duct of Hank's solution (Gibco BRL) + 0.33 mg/ml Liberase RI (Roche Diagnostics, France). The gland was then recovered and incubated in the tested solution at 37°C for 12 min without mechanical disruption (stationary digestion). Then vials were vigorously shaken, and the cell suspension was filtered through a 500-μm nylon mesh. Islets were then washed in the tested solution, purified on a discontinuous density Ficoll gradient (Amersham, France), washed in the tested solution, handpicked to obtain 100% purity, counted according to the islet equivalent (IEQ) method (49), and then cultured overnight at 37°C + 5% CO_2 in CMRL-1066 + 1% BSA.

Islet Morphology

At the end of the isolation process, islets isolated with the different solutions were compared using light microscopy, evaluating islet size and integrity (dissociated or not).

Islet Transplantation

Diabetes was induced by an intraperitoneal injection of 250 mg/kg streptozotocin (STZ) (Sigma) in the recipient mice (21,22). Only recipients with two consecutive blood glucose determinations >350 mg/dl after 48 h of STZ administration were eligible. General anesthesia was induced by intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (4 mg/kg) (Sigma). To reach normoglycemia as soon as possible—allowing early posttransplant events assessment—1400 IEQ were grafted under the left kidney capsule as described previously (21,22). No immunosuppressive medication was administered. Grafts lost due to surgical failure were excluded.

Assessment of Graft Outcome

Blood glucose determinations were performed using a glucometer (Bayer Diagnostics, France) at 24 and 48 h after transplantation and every other day. Allograft functionality was determined by normoglycemia (<100 mg/dl), and allograft rejection was defined by two successive blood glucose >200 mg/dl. Primary nonfunction (PNF) was defined as a glycemia never returning below 200 mg/dl. Delayed graft function (DGF) was defined by the no return to normoglycemia within the first 48 h after transplantation.

Statistical Analysis

All data are expressed as means ± SEM. Statistics were performed with GraphPad and NCSS software. Statistics to islet yield data were performed using the ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test. Statistics to allograft survival time (primary nonfunction were excluded) were performed with ANOVA and log-rank test. Statistics to graft outcome (including PNF + DGF + allograft survival time), represented by "area under the curve" (area unit), were performed with ANOVA and Dunn's test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Viscosity and Osmolarity

Plasma viscosity was 1.84 cSt (centistock). UW, SCOT + PEG 35 kDa 20 g/L, and SCOT + PEG 35 kDa 52 g/L had higher viscosities (3.22, 2.49, and 7.35 cSt, respectively), while all other solutions had physiological viscosity (Fig. 1).

The osmolarity of plasma was 308 mOsm/L; normal physiologic osmolarity range is 290–320 mOsm/L. Solutions SCOT + PEG 20 and 35 kDa 10–30 g/L have an osmolarity ranging from 293 to 307 mOsm/L. UW solution (327 mOsm/L) and solution SCOT + PEG 35 kDa 52 g/L (322 mOsm/L) have osmolarity above to the acceptable range (Fig. 1). HBSS + 0.5% BSA osmolarity was 32 mOsm/L (does not appear in Fig. 1).

Islet Morphology

Microscopy studies (Fig. 2) showed that the islet morphology was better preserved (normal size and better integrity) when islets were isolated with solutions of SCOT containing PEG and CMRL-1066 compared to other solutions: UW, HBSS + 0.5% BSA, and SCOT without PEG, where islets were more dissociated.

Islet Yield

Islet yields (IEQ/pancreas), calculated at the end of the isolation process, are represented in Figure 3. In association with the islet morphology, the islet yield was significantly improved with SCOT + PEG >5 g/L (up

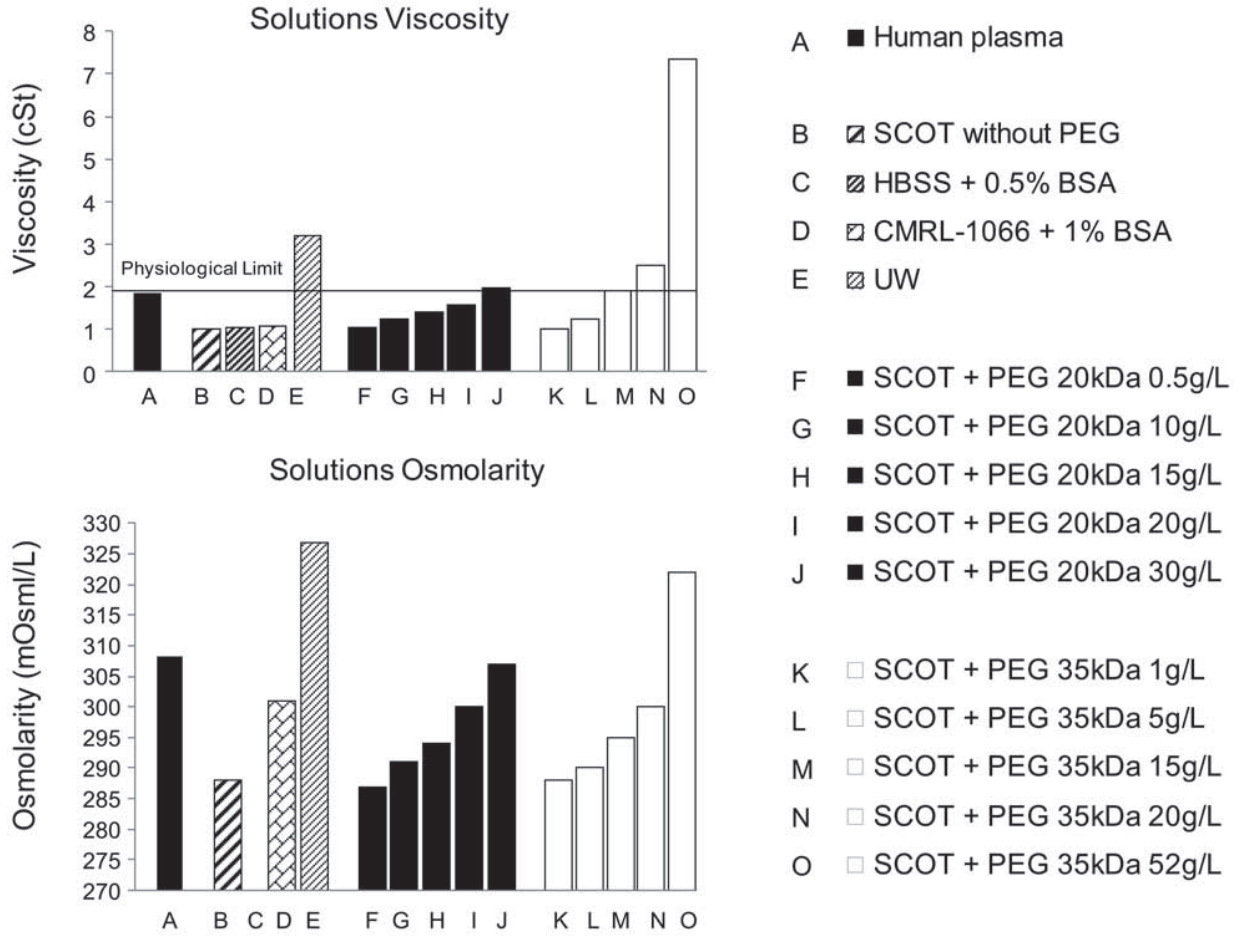


Figure 1. Top: Viscosity in centistoke (cSt) of solutions compared to the human plasma corresponding to the physiological limit (1.84 cSt). Bottom: Osmolarity in mOsm/L of solutions compared to the human plasma.

to 527 IEQ/pancreas) compared to controls solutions ($p<0.001$): UW (371±11 IEQ/pancreas), SCOT without PEG (432±19 IEQ/pancreas), HBSS+0.5% BSA (448±9 IEQ/pancreas), and CMRL-1066+1% BSA (494±24 IEQ/pancreas). Islet yield was significantly increased with the use of SCOT+PEG 20 kDa at 15, 20 and 30 g/L compared to SCOT+PEG 35 kDa at 1 and 52 g/L and to SCOT+PEG 20 kDa at 0.5 g/L ($p<0.01$).

Allograft Outcome

Allograft outcome, including PNF, DGF, and allograft survival time, are represented in Table 1 (grafts lost due to surgical failure were excluded). No PNF was observed in the groups SCOT+PEG 20 and 35 kDa 5–30 g/L. In contrast, the rate of PNF was 14% in the CMRL-1066+1% BSA, 17% in HBSS+0.5% BSA, 25% in SCOT without PEG, and 28% in UW group. Regarding the risk of DGF, SCOT+PEG 20 kDa >10 g/L led to rapid function recovery compared to a DGF rate ranging from 14% to 42% in controls and SCOT+PEG 35 kDa groups.

Longer graft survivals were obtained with SCOT+PEG 20 kDa ≥10 g/L, resulting in a mean survival of up to 20 days, better than CMRL-1066+1% BSA (17.5±1 days, £$p<0.05$), UW solution (17.2±0.4 days, #$p<0.05$), SCOT solution without PEG (14±0.9 days, **$p<0.01$), and HBSS+0.5% BSA solution (14±0.7 days, $$$p<0.01$) (Table 1). Graft survivals appeared improved when islets were isolated with SCOT+PEG 20 kDa at 10–30 g/L compared to SCOT+PEG 35 kDa at any concentration (Table 1).

Percentages of normoglycemic mice per groups from allotransplantation at day 0 to rejection are represented in Figure 4 (grafts lost due to surgical failure were excluded). Area under the curve data showed a significantly better allograft outcome (function recovery and allograft survival) in the SCOT+PEG 20 kDa >10 g/L compared

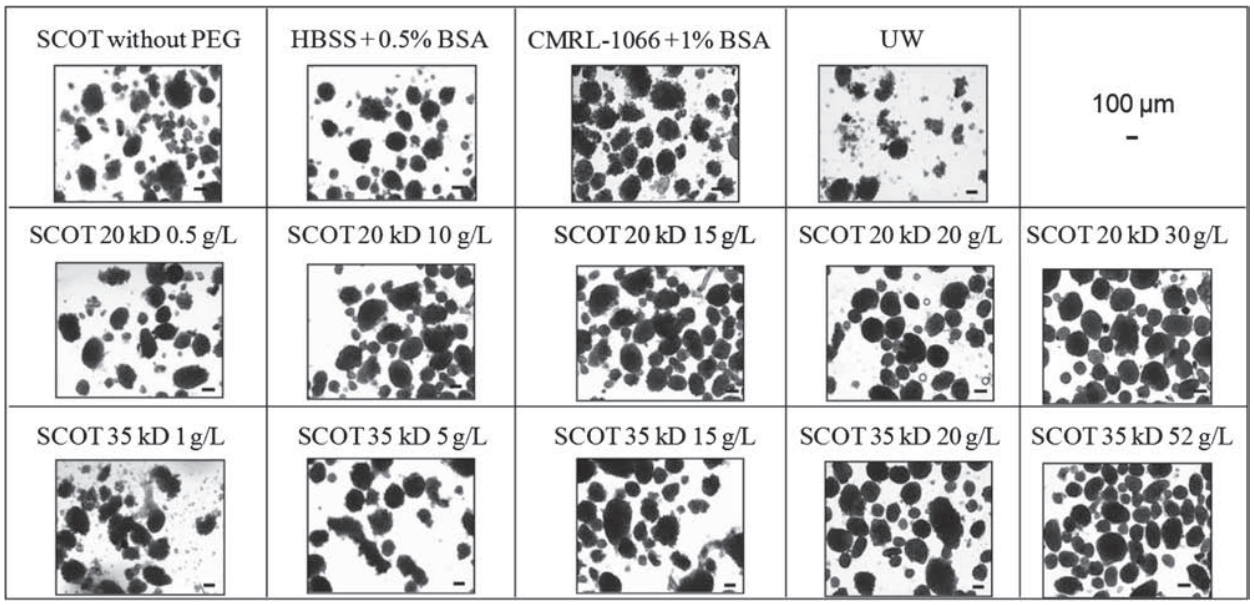


Figure 2. Islet morphology at the end of the isolation process with the different solutions. Original magnification: 40×. The majority of islets were dissociated after isolation with control solutions (SCOT without PEG, HBSS + 0.5% BSA, and UW), compared to the initial integrity islet preserved with the use of CMRL-1066 + 1% BSA and SCOT + PEG solutions. Scale bars: 100 µm, included at the bottom right of each picture.

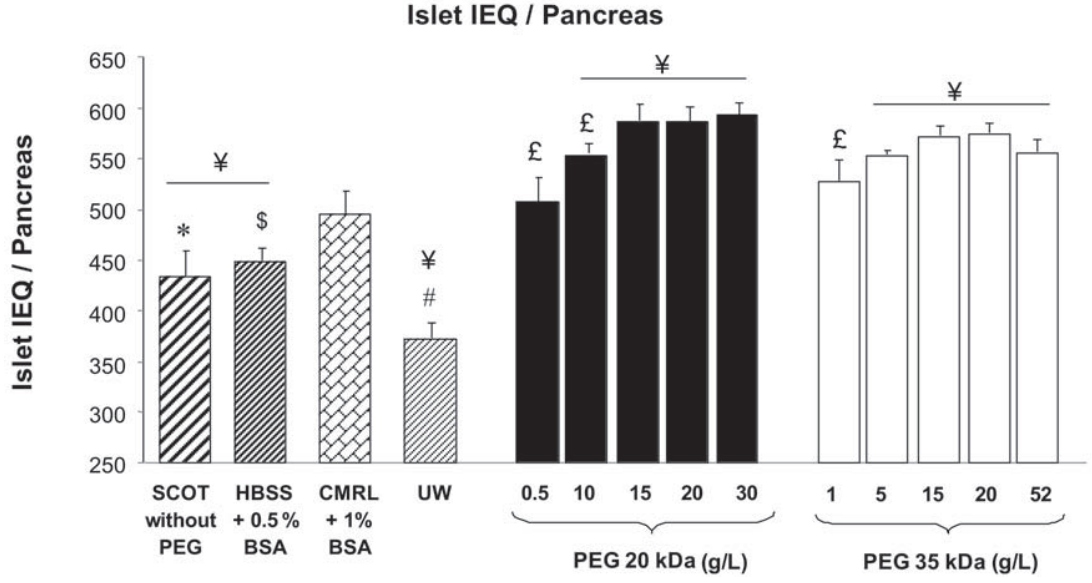


Figure 3. Islet yield (IEQ/pancreas) obtained at the end of the isolation process with different solutions. Results are expressed as mean ± SEM ($n = 7$). ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test (significant values of different PEG concentration in a same chain length group are represented by £$p < 0.05$; significant values of groups vs. CMRL-1066 + 1% BSA are represented by ¥$p < 0.001$; UW vs. other groups is represented by #$p < 0.001$; SCOT without PEG vs. other groups is represented by *$p < 0.001$; and HBSS − 0.5% BSA vs. other groups is represented by \$$p < 0.001$).

Table 1. Allograft Outcome Representation

Solutions ± PEG(g/L)	SCOT Without PEG	HBSS + 0.5% BSA	CMRL-1066 + 1% BSA	UW	SCOT PEG 20 kDa					SCOT PEG 35 kDa				
End Points	0	0	0	0	0.5	10	15	20	30	1	5	15	20	52
PNF rate (%)	2/8 (25%)	1/6 (17%)	1/7 (14%)	2/7 (28%)	1/7 (14%)	0/5 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	1/6 (17%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	2/7 (28%)
Allograft survival ± SEM (days)	14±0.9 £	14±0.7 £	17.5±1 $	17.2±0.4 *$	17.3±1.5 **$	20±1.3 **$$	20.3±1.1 ***$$$ ##	20.2±1.8 ***$$$ #	21.3±0.9 ***$$$ ##£	17.2±1.7 *$	17.1±0.5 *$	17.8±1.9 *$	17.1±1.1 *$	15.2±0.6 £
% DGF	25%	33%	28%	14%	14%	14%	0%	0%	0%	28%	16%	17%	17%	42%
Day of graft function recovery	1.6±0.4	2.8±1.1	1.8±0.7	2.0±1.0	1.5±1.0	1.8±0.8	1.0±0	1.0±0.1	1.0±0.1	3.6±1.6	1.5±0.5	2±1	1.5±0.5	3.4±1

Statistics to allograft survival time (primary nonfunction were excluded) were performed with ANOVA and log-rank test (significant values of $p<0.05$ represented by * to SCOT without PEG, $ to HBSS + 0.5% BSA, £ to CMRL-1066 + 1% BSA, or # to UW; $p<0.01$ represented by **, $$, or ##; $p<0.001$ represented by ***, $$$, or ###). PNF, primary nonfunction; DGF, delayed graft function, in the different groups solutions used.

to CMRL-1066 + 1% BSA, to SCOT without PEG, to HBSS + 0.5% BSA, and to UW groups ($p<0.05$). Allograft outcome of SCOT + PEG 35 kDa was not significantly different to the control CMRL-1066 + 1% BSA group.

DISCUSSION

The goal of this study was to optimize chain lengths and concentrations of the PEG colloid to improve islet preservation and allograft outcome. Currently, two preservation solutions containing PEG are used in clinical settings: SCOT solution containing (for the initial solution) 30 g/L of PEG 20 kDa (30) and IGL-1 solution containing 1 g/L of PEG 35 kDa (62). In the current study, we compared PEG 35 kDa 1 g/L to 20 kDa 0.5 g/L of a similar molarity than IGL-1 and groups PEG 20 kDa 30 g/L to 35 kDa 52 g/L of a similar molarity than SCOT. Intermediary groups with PEG concentration between 5 and 20 g/L were added to obtain better determination of chain length effect.

Itasaka and Bradley, in 2002, suggested that small PEG molecular weights are not optimal for transplantation (10). In fact, Itasaka reported that only PEG 20 kDa, compared to 8 kDa, appears to significantly increase the survival of the small bowel allograft (32). Bradley showed that only PEG 20 kDa induced normal in vivo survival of "PEGylated" red blood cells in mice at immunoprotective concentrations (up to 2 mM) compared to PEG 5 kDa (8). A previous study tried to elucidate the biophysical effects of PEG polymer size, density, and linker chemistry on immunocamouflage propriety and found that the PEG 20 kDa can camouflage cellular membrane antigens to 13.8 nm compared to 6 nm with the use of a PEG 5 kDa (8). For these reasons and in accordance with our previous study (45), we compared only intermediate PEG molecular weights 20 and 35 kDa in our model of mouse islet pancreatic transplantation.

This islet model is interesting for the study of the effect of preservation solution, as it presents the opportunity to evaluate the preservation effect with regards to islet morphology and islet yield after the isolation process. Indeed, in the clinic, the functional islet yield obtained at the end of the isolation process remains a problem (1,6,48), and the preservation quality determines a successful islet transplantation (6,36). Furthermore, evaluation of graft outcome in a diabetic recipient mouse is based on a simple glycemia control for the judgement of the graft insulin secretion functionality. Use of islet pancreatic tissue as graft is a perfect model at the junction of whole organ and cell transplantation.

In order to determine which solutions might correspond to physiological conditions, viscosity and osmolarity of the different solutions tested were determined. It is recommended in the clinic to use a "blood-like" preservation solution. Blood viscosity, principally determined by the colloid presence, is 1.84 cSt. In order to

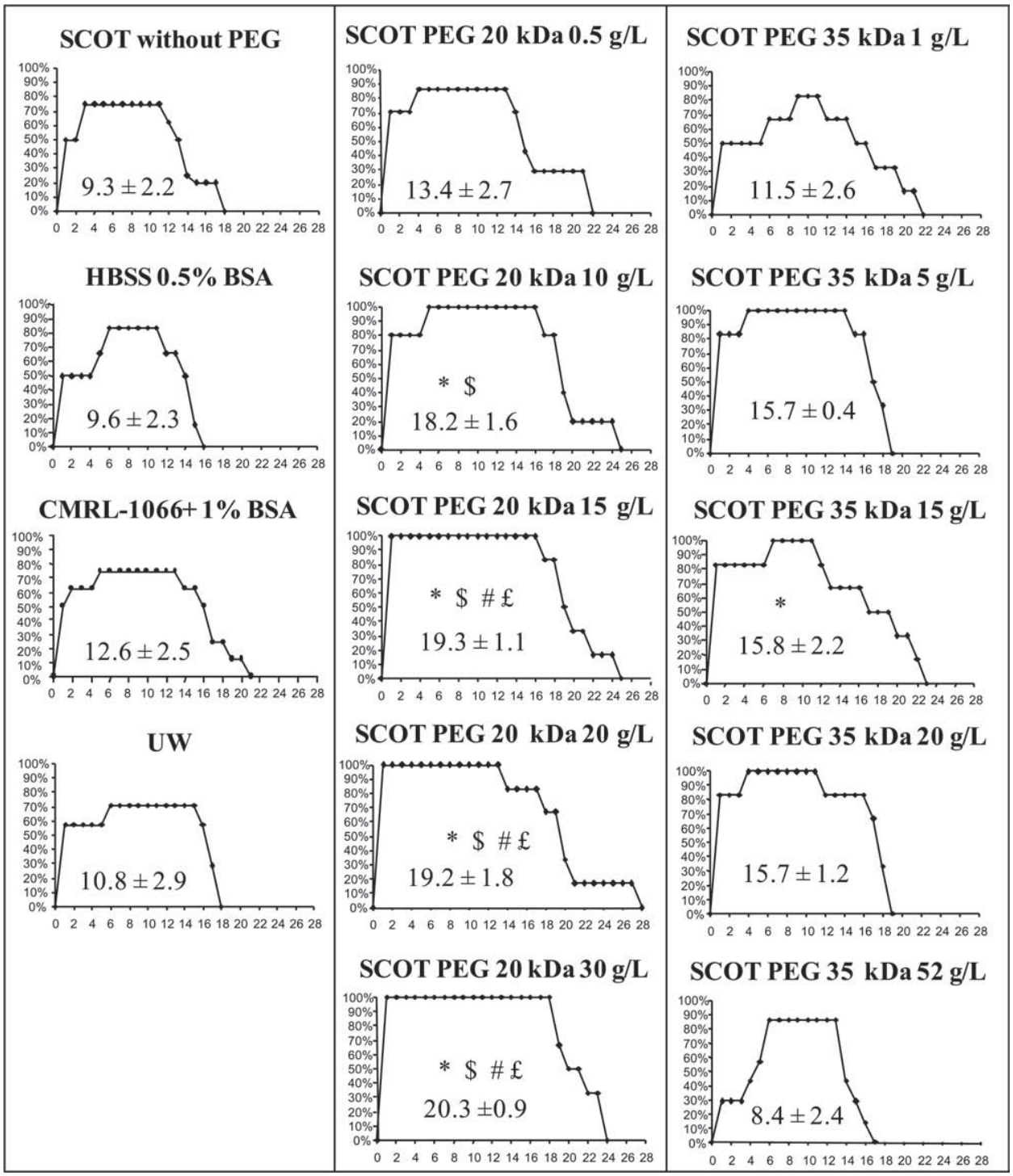


Figure 4. Percentages of normoglycemic mice per groups after allotransplantation per day ($n = 5-8$, grafts lost due to surgical failure were excluded). Statistics to graft outcome (including PNF + DGF + allograft survival time), represented by area under the curve (area unit), were performed with ANOVA and Dunn's test (significant values $p < 0.05$ are represented by * vs. SCOT without PEG, $ vs. HBSS, # vs. UW, and £ vs. CMRL-1066).

limit intracellular or extracellular water movement, solution osmolarity must be between 290 and 320 mOsm/L. Our results showed that the solutions SCOT + PEG 20 or 35 kDa between 0.5 and 30 g/L have physiological viscosity and osmolarity.

Pancreatic islet transplantation could be a precious therapy for type I diabetes (54); however, the processes of isolation and preservation culture disturb islet function and integrity (56). In order to remediate this, one of the major goals is to improve the islet yield (islet integrity) after islet isolation. Importantly, herein, we show that SCOT + PEG at 15–30 g/L significantly improved the IEQ (up to 527 IEQ/pancreas), while the current gold standard CMRL-1066 does not permit a better islet yield (494 ± 24 IEQ/pancreas) as the SCOT without PEG (432 ± 19 IEQ/pancreas). These last data show the importance of the colloid presence in a preservation solution to improve the tissue integrity.

In the current study, too low or too high PEG concentration resulted in a suboptimal allograft function recovery (14–28% of PNF) in contrast of no PNF observed in PEG 20 and 35 kDa used between 5 and 30 g/L. Regarding the risk of DGF, PEG 20 kDa > 10 g/L led to immediate function recovery compared to a DGF rate ranging from 14% to 42% in PEG 35 kDa groups. This significant graft recovery is linked to the use of PEG colloid since the use of SCOT without PEG resulted in significantly more PNF (25%) and DGF (42%). Hence, the right choice of colloid size and concentration can provide superior protection to the graft, increasing quality above the level of the standard solution CMRL-1066 (14% PNF and 28% DGF).

Our results showed that use of PEG 20 kDa at 10–30 g/L significantly prolonged islet allograft survival up to 20 days compared to PEG 35 kDa ($p < 0.05$), SCOT without PEG ($p < 0.01$), and CMRL-1066 ($p < 0.05$ vs. PEG 20 kDa 30 g/L). This significant prolongation of the allograft survival time is linked to the use of PEG as the use of SCOT without PEG resulted in lower allograft survival (14 ± 1.7 days, $p < 0.01$).

Allograft outcome data, determined as percentages of normoglycemic mice per groups from allotransplantation at day 0 to rejection, showed significantly better outcome with the use of SCOT + PEG 20 kDa >10 g/L compared to CMRL-1066 group and to other control groups ($p < 0.05$). In turn, allograft outcome with use of SCOT + PEG 35 kDa were not significantly better to CMRL-1066 and other control groups.

In summary, our results showed that better graft function recovery and allograft survival are associated with a better cellular preservation, according to the islet yield and to the graft outcome curve. This significant improvement in graft outcome is associated with the use of preservation solution containing PEG as colloid, compared to no colloid control solution (SCOT without PEG) and to BSA or HES colloid. Indeed, SCOT containing PEG 20 kDa at 15–30 g/L significantly increased islet yield and graft function recovery with no PNF, no DGF, and significantly prolonged the allograft survival time. These results are in accordance with a study by Hubert et al., reporting that better organ conservation was associated with graft survival prolongation and better metabolic control after islet transplantation (30).

Current practice is to collect the pancreas with one solution such as UW, Celsior, or histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) (3,19,33) and CMRL-1066 for isolation. As SCOT + PEG 20 kDa 15 g/L is compatible with other abdominal organs like kidney and liver (52) due to its better circulation in the organs vascular network, it presents an interesting alternative to the standard method. Use of SCOT + PEG 20 kDa 15 g/L from pancreas procurement to islet isolation would simplify this process and improve both quality and yield.

Perico et al. explained, in 2004, that the preservation modalities affect the graft functionality and the recipient immune system reaction, thus influencing graft outcome (47). If the graft is badly preserved, there are increased injuries (necroses, cellular integrity damages, inflammation, etc.), strongly activating the immune system at transplantation (47), a phenomenon called "Danger Signal" (20). This acute, short-lasting situation has deleterious long-term effects. A better graft integrity preservation, hence a likely transient reduction of antigen presentation and thus decreased inflammation through the use of SCOT with PEG 20 kDa 15–30 g/L during preservation, could reduce the "Danger Signal" to improve the graft outcome and decrease the long-term consequences of recipient immune reactivity.

ACKNOWLEDGMENTS: We thank I Rodde-Astier (Macopharma, France) for providing the SCOT solution; L. Lagorce, J. Decocq, M. Jacquard, S. Tillet, and I. Khalifeh, for technical help; and Bayer Diagnostics and Roche France for kindly providing some of the reagents used. We particularly thank Dr. N. Chatauret for precious help in the preparation of this manuscript. This work was supported by grants from MacoPharma France, Association Française des Diabétiques (AFD), Agence de BioMedecine (ABM), Fondation pour la Recherche Medicale (FRM), and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Anazawa, T.; Balamurugan, A. N.; Matsumoto, S.; Lafreniere, S. A.; O'Brien, T. D.; Sutherland, D. E.; Hering, B. J. Rapid quantitative assessment of the pig pancreas biopsy predicts islet yield. Transplant. Proc. 42:2036–2039; 2009.
2. Badet, L.; Eugene, M.; Hauet, T.; Barrou, B. [The use of preservation solutions in renal transplantation]. Prog. Urol. 16:25–31; 2006.
3. Baertschiger, R. M.; Berney, T.; Morel, P. Organ preservation in pancreas and islet transplantation. Curr. Opin. Organ Transplant. 13:59–66; 2008.

4. Ben Abdennebi, H.; El Rassi, Z.; Steghens, J. P.; Scoazec, J. Y.; Ramella-Virieux, S.; Boillot, O. Effective pig liver preservation with an extracellular-like UW solution containing the oncotic agent polyethylene glycol: A preliminary study. Transplant. Proc. 34:762–763; 2002.
5. Ben Abdennebi, H.; Steghens, J. P.; Hadj-Aissa, A.; Barbieux, A.; Ramella-Virieux, S.; Gharib, C.; Boillot, O. A preservation solution with polyethylene glycol and calcium: A possible multiorgan liquid. Transpl. Int. 15:348–354; 2002.
6. Bertuzzi, F.; Marzorati, S.; Secchi, A. Islet cell transplantation. Curr. Mol. Med. 6:369–374; 2006.
7. Bessems, M.; Doorschodt, B. M.; Hooijschuur, O.; van Vliet, A. K.; van Gulik, T. M. Optimization of a new preservation solution for machine perfusion of the liver: Which is the preferred colloid? Transplant. Proc. 37:329–331; 2005.
8. Bradley, A. J.; Murad, K. L.; Regan, K. L.; Scott, M. D. Biophysical consequences of linker chemistry and polymer size on stealth erythrocytes: Size does matter. Biochim. Biophys. Acta 1561:147–158; 2002.
9. Candinas, D.; Largiader, F.; Binswanger, U.; Sutherland, D. E.; Schlumpf, R. A novel dextran 40-based preservation solution. Transpl. Int. 9:32–37; 1996.
10. CITR Research Group. 2007 update on allogeneic islet transplantation from the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR). Cell Transplant. 18:753–767; 2009.
11. Cittanova, M. L.; Leblanc, I.; Legendre, C.; Mouquet, C.; Riou, B.; Coriat, P. Effect of hydroxyethylstarch in brain-dead kidney donors on renal function in kidney-transplant recipients. Lancet 348:1620–1622; 1996.
12. Clayton, H. A.; London, N. J. Survival and function of islets during culture. Cell Transplant. 5:1–12; discussion 13–19; 1996.
13. Collins, G. M.; Wicomb, W. N.; Levin, B. S.; Verma, S.; Avery, J.; Hill, J. D. Heart preservation solution containing polyethyleneglycol: An immunosuppressive effect? Lancet 338:890–891; 1991.
14. Daoud, J.; Rosenberg, L.; Tabrizian, M. Pancreatic islet culture and preservation strategies: Advances, challenges, and future outlook. Cell Transplant. 19:1523–1535; 2010.
15. Dutheil, D.; Rioja-Pastor, I.; Tallineau, C.; Goujon, J. M.; Hauet, T.; Mauco, G.; Petit-Paris, I. Protective effect of PEG 35,000 Da on renal cells: Paradoxical activation of JNK signaling pathway during cold storage. Am. J. Transplant. 6:1529–1540; 2006.
16. Eugene, M. Polyethyleneglycols and immunocamouflage of the cells tissues and organs for transplantation. Cell. Mol. Biol. 50:209–215; 2004.
17. Eugene, M.; Hauet, T.; Mothes, D.; Goujon, J. M.; Le Moyec, L.; Carretier, M.; Caritez, J. C. Beneficial effects of a low-potassium$^+$ and polyethylene glycol solution on renal function and structure during 48-hour cold storage preservation. Transplant. Proc. 29:2360–2362; 1997.
18. Faure, J. P.; Petit, I.; Zhang, K.; Dutheil, D.; Doucet, C.; Favreau, F.; Eugene, M.; Goujon, J. M.; Tillement, J. P.; Mauco, G.; Vandewalle, A.; Hauet, T. Protective roles of polyethylene glycol and trimetazidine against cold ischemia and reperfusion injuries of pig kidney graft. Am. J. Transplant. 4:495–504; 2004.
19. Fridell, J. A.; Mangus, R. S.; Powelson, J. A. Organ preservation solutions for whole organ pancreas transplantation. Curr. Opin. Organ Transplant. 16:116–122; 2011.
20. Gallucci, S.; Matzinger, P. Danger signals: SOS to the immune system. Curr. Opin. Immunol. 13:114–119; 2001.
21. Giraud, S.; Barrou, B.; Sebillaud, S.; Debre, P.; Klatzmann, D.; Thomas-Vaslin, V. Transient depletion of dividing T lymphocytes in mice induces the emergence of regulatory T cells and dominant tolerance to islet allografts. Am. J. Transplant. 8:942–953; 2008.
22. Giraud, S.; Claire, B.; Eugene, M.; Debre, P.; Richard, F.; Barrou, B. A new preservation solution increases islet yield and reduces graft immunogenicity in pancreatic islet transplantation. Transplantation 83:1397–1400; 2007.
23. Hauet, T.; Baumert, H.; Amor, I. B.; Goujon, J. M.; Gibelin, H.; Godart, C.; Vandewalle, A.; Carretier, M.; Eugene, M. Protection of autotransplanted pig kidneys from ischemia–reperfusion injury by polyethylene glycol. Transplantation 70:1569–1575; 2000.
24. Hauet, T.; Baumert, H.; Faure, J. P.; Bardou, A.; Beguinot, S.; Gibelin, H.; Ben Amor, I.; Germonville, T.; Caritez, J. C.; Carretier, M.; Eugene, M. Beneficial effects of low-potassium and polyethylene glycol solution on renal lipid peroxidation during 48-hour cold storage and normothermic reperfusion. Transplant. Proc. 30:2798–2799; 1998.
25. Hauet, T.; Eugene, M. A new approach in organ preservation: Potential role of new polymers. Kidney Int. 74:998–1003; 2008.
26. Hauet, T.; Faure, J. P.; Baumert, H.; Bardou, A.; Gibelin, H.; Beguinot, S.; Germonville, T.; Hebrard, W.; Choulet, P.; Carretier, M.; Eugene, M. Influence of different colloids on hemodynamic and renal functions: Comparative study in an isolated perfused pig kidney model. Transplant. Proc. 30:2796–2797; 1998.
27. Hauet, T.; Goujon, J. M.; Baumert, H.; Petit, I.; Carretier, M.; Eugene, M.; Vandewalle, A. Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotransplanted pig kidneys. Kidney Int. 62:654–667; 2002.
28. Hauet, T.; Mothes, D.; Goujon, J. M.; Carretier, M.; Eugene, M. Protective effect of polyethylene glycol against prolonged cold ischemia and reperfusion injury: Study in the isolated perfused rat kidney. J. Pharmacol. Exp. Ther. 297:946–952; 2001.
29. Holmes, M. A.; Clayton, H. A.; Chadwick, D. R.; Bell, P. R.; London, N. J.; James, R. F. Functional studies of rat, porcine, and human pancreatic islets cultured in ten commercially available media. Transplantation 60:854–860; 1995.
30. Hubert, T.; Gmyr, V.; Arnalsteen, L.; Jany, T.; Triponez, F.; Caiazzo, R.; Vandewalle, B.; Vantyghem, M. C.; Kerr-Conte, J.; Pattou, F. Influence of preservation solution on human islet isolation outcome. Transplantation 83:270–276; 2007.
31. Huter, L.; Simon, T. P.; Weinmann, L.; Schuerholz, T.; Reinhart, K.; Wolf, G.; Amann, K. U.; Marx, G. Hydroxyethylstarch impairs renal function and induces interstitial proliferation, macrophage infiltration and tubular damage in an isolated renal perfusion model. Crit. Care 13:R23; 2009.
32. Itasaka, H.; Burns, W.; Wicomb, W. N.; Egawa, H.; Collins, G.; Esquivel, C. O. Modification of rejection by polyethylene glycol in small bowel transplantation. Transplantation 57:645–648; 1994.
33. Iwanaga, Y.; Sutherland, D. E.; Harmon, J. V.; Papas, K. K. Pancreas preservation for pancreas and islet transplantation. Curr. Opin. Organ Transplant. 13:445–451; 2008.
34. Jang, J. Y.; Lee, D. Y.; Park, S. J.; Byun, Y. Immune reactions of lymphocytes and macrophages against PEG-grafted pancreatic islets. Biomaterials 25:3663–3669; 2004.
35. Jayle, C.; Corbi, P.; Eugene, M.; Carretier, M.; Hebrard, W.; Menet, E.; Hauet, T. Beneficial effect of polyethylene

glycol in lung preservation: Early evaluation by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Ann. Thorac. Surg. 76:896–902; 2003.
36. Kaddis, J. S.; Danobeitia, J. S.; Niland, J. C.; Stiller, T.; Fernandez, L. A. Multicenter analysis of novel and established variables associated with successful human islet isolation outcomes. Am. J. Transplant. 10:646–656; 2010.
37. Kerr-Conte, J.; Vandewalle, B.; Moerman, E.; Lukowiak, B.; Gmyr, V.; Arnalsteen, L.; Caiazzo, R.; Sterkers, A.; Hubert, T.; Vantyghem, M. C.; Pattou, F. Upgrading pretransplant human islet culture technology requires human serum combined with media renewal. Transplantation 89:1154–1160; 2010.
38. Kuhtreiber, W. M.; Ho, L. T.; Kamireddy, A.; Yacoub, J. A.; Scharp, D. W. Islet isolation from human pancreas with extended cold ischemia time. Transplant. Proc. 42:2027–2031; 2010.
39. Le, Y.; Scott, M. D. Immunocamouflage: The biophysical basis of immunoprotection by grafted methoxypoly(ethylene glycol) (mPEG). Acta Biomater. 6:2631–2641; 2010.
40. Maathuis, M. H.; Leuvenink, H. G.; Ploeg, R. J. Perspectives in organ preservation. Transplantation 83:1289–1298; 2007.
41. Miki, A.; Ricordi, C.; Messinger, S.; Yamamoto, T.; Mita, A.; Barker, S.; Haetter, R.; Khan, A.; Alejandro, R.; Ichii, H. Toward improving human islet isolation from younger donors: Rescue purification is efficient for trapped islets. Cell Transplant. 18:13–22; 2009.
42. Morariu, A. M.; Vd Plaats, A.; V Oeveren, W.; 'T Hart, N. A.; Leuvenink, H. G.; Graaff, R.; Ploeg, R. J.; Rakhorst, G. Hyperaggregating effect of hydroxyethyl starch components and University of Wisconsin solution on human red blood cells: A risk of impaired graft perfusion in organ procurement? Transplantation 76:37–43; 2003.
43. Murad, K. L.; Gosselin, E. J.; Eaton, J. W.; Scott, M. D. Stealth cells: Prevention of major histocompatibility complex class II-mediated T-cell activation by cell surface modification. Blood 94:2135–2141; 1999.
44. Murdoch, T. B.; McGhee-Wilson, D.; Shapiro, A. M.; Lakey, J. R. Methods of human islet culture for transplantation. Cell Transplant. 13:605–617; 2004.
45. Neuzillet, Y.; Giraud, S.; Lagorce, L.; Eugene, M.; Debre, P.; Richard, F.; Barrou, B. Effects of the molecular weight of peg molecules (8, 20 and 35 kDa) on cell function and allograft survival prolongation in pancreatic islets transplantation. Transplant. Proc. 38:2354–2355; 2006.
46. Noguchi, H.; Naziruddin, B.; Onaca, N.; Jackson, A.; Shimoda, M.; Ikemoto, T.; Fujita, Y.; Kobayashi, N.; Levy, M. F.; Matsumoto, S. Comparison of modified Celsior solution and m-kyoto solution for pancreas preservation in human islet isolation. Cell Transplant. 19:751–758; 2010.
47. Perico, N.; Cattaneo, D.; Sayegh, M. H.; Remuzzi, G. Delayed graft function in kidney transplantation. Lancet 364:1814–1827; 2004.
48. Qi, M.; Barbaro, B.; Wang, S.; Wang, Y.; Hansen, M.; Oberholzer, J. Human pancreatic islet isolation: Part II. Purification and culture of human islets. J. Vis. Exp. 27:1343; 2009.
49. Ricordi, C.; Gray, D. W.; Hering, B. J.; Kaufman, D. B.; Warnock, G. L.; Kneteman, N. M.; Lake, S. P.; London, N. J.; Socci, C.; Alejandro, R.; Zeng, Y.; Scharp, D. W.; Viviani, G.; Falqui, L.; Tzakis, A.; Bretzel, R. G.; Federlin, K.; Pozza, G.; James, R. F. L.; Rajotte, R. V.; Di Carlo, V.; Morris, P. J.; Sutherland, D. E. R.; Starzl, T. E.; Mintz, D. H.; Lacy, P. E. Islet isolation assessment in man and large animals. Acta Diabetol. Lat. 27:185–195; 1990.
50. Salahudeen, A. K. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: New insights from experimental studies. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 287:F181–F187; 2004.
51. Salat, A.; Mueller, M. R.; Boehm, D.; Stangl, P.; Pulaki, S.; Laengle, F. Influence of UW solution on in vitro platelet aggregability. Transpl. Int. 9 Suppl 1:S429–S431; 1996.
52. Savier, E.; Kitajima, K.; Eyraud, D.; Siksik, J. M.; Vaillant, J. C.; Hannoun, L. La preservation des foies avec du SCOT 15 augmente la cytolyse de reperfusion mais diminue la cholestase à long terme. Societe Francophone de Transplantation. Geneve; 2010.
53. Scott, M. D.; Murad, K. L.; Koumpouras, F.; Talbot, M.; Eaton, J. W. Chemical camouflage of antigenic determinants: Stealth erythrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7566–7571; 1997.
54. Shapiro, A. M.; Ricordi, C.; Hering, B. J.; Auchincloss, H.; Lindblad, R.; Robertson, R. P.; Secchi, A.; Brendel, M. D.; Berney, T.; Brennan, D. C.; Cagliero, E.; Alejandro, R.; Ryan, E. A.; DiMercurio, B.; Morel, P.; Polonsky, K. S.; Reems, J. A.; Bretzel, R. G.; Bertuzzi, F.; Froud, T.; Kandaswamy, R.; Sutherland, D. E.; Eisenbarth, G.; Segal, M.; Preiksaitis, J.; Korbutt, G. S.; Barton, F. B.; Viviano, L.; Seyfert-Margolis, V.; Bluestone, J.; Lakey, J. R. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. N. Engl. J. Med. 355:1318–1330; 2006.
55. Southard, J. H.; van Gulik, T. M.; Ametani, M. S.; Vreugdenhil, P. K.; Lindell, S. L.; Pienaar, B. L.; Belzer, F. O. Important components of the UW solution. Transplantation 49:251–257; 1990.
56. Stendahl, J. C.; Kaufman, D. B.; Stupp, S. I. Extracellular matrix in pancreatic islets: Relevance to scaffold design and transplantation. Cell Transplant. 18:1–12; 2009.
57. Hart, N. A.; Leuvenink, H. G.; Ploeg, R. J. New solutions in organ preservation. Transplant. Rev. 16:131–141; 2002.
58. Tokunaga, Y.; Wicomb, W. N.; Garcia-Kennedy, R.; Esquivel, C. O.; Collins, G. M. The immunosuppressive effect of polyethylene glycol in a flush solution for rat liver transplantation. Transplantation 54:756–758; 1992.
59. Weber, L. M.; Cheung, C. Y.; Anseth, K. S. Multifunctional pancreatic islet encapsulation barriers achieved via multilayer PEG hydrogels. Cell Transplant. 16:1049–1057; 2008.
60. Wee, Y. M.; Lim, D. G.; Kim, Y. H.; Kim, J. H.; Kim, S. C.; Yu, E.; Park, M. O.; Choi, M. Y.; Park, Y. H.; Jang, H. J.; Cho, E. Y.; Cho, M. H.; Han, D. J. Cell surface modification by activated polyethylene glycol prevents allosensitization after islet transplantation. Cell Transplant. 17:1257–1269; 2008.
61. Wicomb, W. N.; Hill, J. D.; Avery, J.; Collins, G. M. Optimal cardioplegia and 24-hour heart storage with simplified UW solution containing polyethylene glycol. Transplantation 49:261–264; 1990.
62. Wojtusciszyn, A.; Bosco, D.; Morel, P.; Baertschiger, R.; Armanet, M.; Kempf, M. C.; Badet, L.; Toso, C.; Berney, T. A comparison of cold storage solutions for pancreas preservation prior to islet isolation. Transplant. Proc. 37:3396–3397; 2005.
63. Zheng, T. L.; Lanza, R. P.; Soon-Shiong, P. Prolonged pancreas preservation using a simplified UW solution containing polyethylene glycol. Transplantation 51:63–66; 1991.

2.3 Synthèse:

L'utilisation de la solution de conservation SCOT permet d'améliorer la préservation cellulaire et réduit l'immunogénicité du greffon via un effet d'immunomasquage par les PEG 20kDa. Afin d'optimiser les effets de cette solution et de corriger les problèmes rhéologiques rencontrés avec cette solution nous nous sommes attachés à redéfinir la composition en PEG de la solution.

Nous avons donc évalué différentes concentrations et tailles de PEG dans cette solution, dans notre modèle de transplantation d'ilots pancréatiques murins. Nous avons isolé des îlots avec les solutions: SCOT sans PEG, HBSS + 0.5% BSA, CMRL-1066 + 1% BSA, UW, SCOT + PEG 20kDa à 0.5, 10, 15, 20 et 30g/L ou SCOT + PEG 35kDa à 1, 5, 15, 20 et 52 g/L.

Les solutions contenant des PEG ne doivent pas excéder la viscosité du sang, comme tel est le cas pour une solution contenant des PEG 20kDa ou 35kDa supérieurs à 30g/L. Un meilleur rendement d'îlots a été obtenu avec les solutions SCOT + PEG compris entre 10 et 30g/L. En terme de prolongement de la durée de survie d'une allogreffe, seules les solutions SCOT + PEG 20kDa 10g/L à 30g/L permettent une durée de survie supérieure à 20 jours. Ces mêmes solutions garantissent également dans notre modèle une reprise de fonction optimale du greffon sans retard de reprise de fonction, ni NFP par rapport aux autre solutions.

L'utilisation d'une solution SCOT contenant 15g/L de PEG 20kDa semble répondre aux problématiques majeures de la transplantation d'îlots. Ces résultats corrèlent avec les données obtenues par notre groupe dans un modèle de transplantation de rein chez le porc.

III. Préservation des greffons ayant subi une ischémie chaude

3 Article 3 :

Giraud S, Hauet T, Eugene M, Mauco G, Barrou B. "A New Preservation Solution (SCOT 15) Improves the islet Isolation process from pancreata of Non-Heart-Beating Donors: A Murine Model." Transplant. Proc. 41(8): 3293-3295. 2009

3.1 Rappel des objectifs et hypothèses

Depuis 2007, en France, la loi autorise le prélèvement sur des donneurs décédés après arrêt cardiaque. Les greffons provenant de cette "nouvelle" source de dons, subissent une période d'ischémie chaude qui précède le prélèvement de l'organe. Cette période ischémie chaude est délétère pour l'organe, en clinique ne doit pas excéder 30 minutes. Elle prédispose le greffon à des lésions métaboliques majeures. Le rôle des solutions de conservation est de pallier aux lésions d'ischémie et de préparer le greffon à affronter les lésions de reperfusion. Cependant les solutions actuellement utilisées peuvent-elles répondre aux lésions d'ischémie chaude?

Nous avons évalué, dans notre modèle murin d'isolement et de transplantation d'îlots, les capacités de la solution SCOT "optimisée" (contenant 15 g/L de PEG 20kDa), à contribuer à la conservation de la viabilité cellulaire après une séquence d'ischémie chaude.

3.2 Publication

ELSEVIER

A New Preservation Solution (SCOT 15) Improves the Islet Isolation Process From Pancreata of Non–Heart-Beating Donors: A Murine Model

S. Giraud, T. Hauet, M. Eugene, G. Mauco, and B. Barrou

ABSTRACT

Introduction. Due to the organ shortage, there is increased use of organs harvested from non–heart-beating donors (NHBD). These organs have been subjected to a period of warm ischemia that is most deleterious to functional recovery. We have designed a new preservation solution, "Solution de Conservation des Organes et des Tissus" (SCOT 15; Macopharma, Tourcoing, France) which contains an extracellular ionic composition including PEG 20 kD (15 g/L) as a colloid.

Methods. Our objective was to compare SCOT 15 with University of Wisconsin (UW) solution or islet culture medium CMRL 1066 + 1% of Bovine Serum Albumin (BSA), as the working and preservation solution for islet isolation from pancreata subjected to warm ischemia using a murine model.

Results. Warm ischemia decreased the islet yield and cellular viability regardless of the preservation solution. Either when the pancreas was or was not subjected to warm ischemia, the best islet yield was obtained with SCOT 15 ($P < .05$ vs UW or CMRL 1066). The same results were observed for islet viability as assessed using the 3,(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) test; namely, better viability with SCOT 15 as compared with UW or CMRL 1066 ($P < .01$).

Conclusion. In a murine model SCOT 15 was a better preservation solution for islet isolation than UW solution or culture medium (CMRL 1066).

ISLET transplantation has become a feasible treatment option for patients with type 1 diabetes,[1,2] but one of the major limitations is the decreased ratio of graft supply to demand. Currently, in France, the majority of pancreata are harvested from brain-dead donors; however, the recent launch of the non–heart-beating donor (NHBD) program has raised the question of the suitability of islets isolated from pancreata subjected to a warm ischemia period. Currently the most often used solutions are the University of Wisconsin (UW) solution and the culture medium CMRL 1066. We have designed a new preservation solution, "Solution de Conservation d'Organes et de Tissue" (SCOT 15; Macopharma, Tourcoing, France), which is approved for organ preservation.[3] SCOT 15 has 2 main characteristics: (1) a low K^+ concentration to avoid cell membrane depolarization and adenosine triphosphate (ATP) depletion, and (2) the presence of 15 g/L of polyethyleneglycol (PEG) 20 kd as colloid that has some immunoprotective effects as previously shown by our group.[4,5] The beneficial effect of SCOT 15 has been established in models of isolated perfused pig kidneys and their autotransplantation[6,7]; it decreased the ischemia-reperfusion injuries. In addition, in our model of murine islet transplantation, SCOT 15 significantly improved the islet yield, pro-

From Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U927 (S.G., T.H., M.E., G.M., B.B.), Centre Hospitalier Universitaire, Poitiers, Faculté de Médecine, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI (B.B.), and Service d'Urologie, GH Pitié-Salpétrière (B.B.), Paris, France.

This work was supported by grants from Fondation pour la Recherche Médicale, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Poitiers, France.

Address reprint requests to Benoit Barrou, MD, PhD, Service d'Urologie, Unite de Transplantation Rénale et Pancréatique, Groupe Hospitalier Pitie-Salpétrière, 83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. E-mail: benoit.barrou@psl.aphp.fr

© 2009 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

0041-1345/09/$–see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2009.08.042

Table 1. Human Versus Murine Warm Ischemia Time Equivalence

$$\frac{\text{Human heart beat/min} \times 30 \text{ min warm ischemia}}{\text{Murine heart beat/min}} = (70 \times 30)/600 = 3.5 \text{ min}$$

$$\frac{\text{Human } O^2 \text{ consumption} \times 30 \text{ min warm ischemia}}{\text{Murine } O^2 \text{ consumption}} = (200 \times 30)/1680 = 3.5 \text{ min}$$

Note: Calculations to find an equivalence between human and mice in warm ischemia time. According to this hypothesis, 30 minutes of no flow in humans is equivalent to 3.5 minutes in mice.

vided immunoprotection, and consequently increased islet allograft survival in the absence of recipient immunosuppression ($P < .05$). In addition, it achieved a decreased rate of primary nonfunction.[5] The aim of our study was to determine whether SCOT 15 could improve the islet isolation process from pancreata subjected to a warm ischemia period, as is the case among NHBD.

MATERIALS AND METHODS

C3H (H-2^k) mice obtained from Charles River France (L'arbresle, France) were used at 6 weeks of age. Mice were kept under specific pathogen-free conditions and manipulated according to European council directive 86/609/EEC. Islets were isolated as previously described[5–8] using stationary digestion with Liberase RI (Roche Diagnostics, Meylan, France) after in situ distension of the pancreas. Islets purified on a discontinuous Ficoll gradient were handpicked to obtain about 100% purity. Islets were isolated from C3H donor pancreata subjected to 3.5 minutes of warm ischemia or not (3.5 minutes in mice is equivalent to 30 minutes in humans, (Table 1). Isolated islets were preserved using 3 solutions: (1) UW solution as the standard preservation solution; (2) CMRL 1066 + 1% bovine serum albumin (BSA), as used in clinical islet isolation, or (3) SCOT 15. After isolation, islets were counted according to the islet equivalent (IEQ) method[9] to determine yield (n = 5 for each condition). Cellular viability was determined using the 3,(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide (MTT) test, based on the cleavage of the yellow tetrazolium salt MTT to a purple formazan crystal by metabolically active cells. The formazan was then solubilized, and its concentration determined by optical density at 570 nm (n = 3 for each condition).

All data are expressed as mean values ± SEM. Statistical analyses were performed using analysis of variance (ANOVA) followed by Kruskal-Wallis test with $P < .05$ considered significant.

RESULTS

Islet yield from pancreata after warm ischemia was better with SCOT 15 solution (328 ± 23 IEQ) compared with CMRL (256 ± 8 IEQ; $P < .05$) or UW (98 ± 10 IEQ; $P < .01$) (Figure 1). Similar results were observed with pancreata harvested without warm ischemia; the islet yield was better with SCOT 15 (593 ± 8 IEQ) as compared with CMRL (494 ± 16 IEQ; $P < .05$) or UW solution (356 ± 32 IEQ; $P < .01$). In terms of cellular viability, islets from the warm ischemia pancreata were better preserved with SCOT 15 solution (0.146 ± 0.02 absorbance) than UW (0.093 ± 0.01 absorbance; $P < .01$) or CMRL (0.130 ± 0.01 absorbance; $P < .01$), as islet viability from pancreata without warm ischemia were better with SCOT 15 (0.219 ± 0.01 absorbance) than UW (0.138 ± 0.02 absorbance; $P < .01$) or CMRL (0.136 ± 0.01 absorbance; $P < .01$).

DISCUSSION

This study showed that warm ischemia decreased the islet yield and cellular viability regardless of the solution. Concordant observations have been reported by other workers.[10–12]

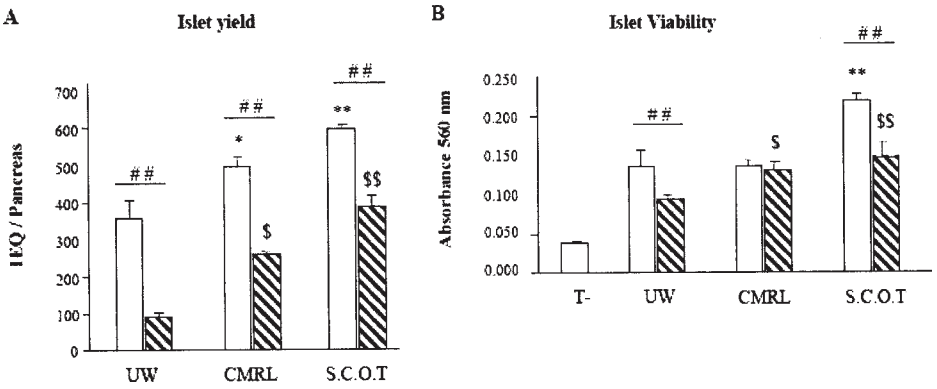


Fig 1. Yield and viability of islet preserved with different solutions after warm ischemia or not. (**A**) Islet yield expressed in IEQ/pancreas obtained after isolation in different conditions (n = 5 for each condition). (**B**) Cellular viability of islet 1 hour after isolation in different conditions (n = 3 for each condition). In white □, islet obtained without warm ischemia; in black stripe ▨, islet obtained after 3.5 minutes of warm ischemia. *$P < .05$ (vs UW without warm ischemia). $P < .05$ (vs UW + warm ischemia). #$P < .05$ (warm ischemia vs not).

The use of SCOT 15 improved both the islet yield and the viability when compared with other solutions. These findings could make it possible to use pancreata harvested from NHBD as suggested by other investigators.[13]

REFERENCES

1. Merani S, Shapiro AM: Current status of pancreatic islet transplantation. Clin Sci (Lond) 110:611, 2006

2. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, et al: International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. N Engl J Med 355:1318, 2006

3. Badet L, Eugène M, Hauet T, et al: L'utilisation des liquides de conservations en transplantation rénale. Progrès Urol 16:25, 2006

4. Eugene M: Polyethyleneglycols and immunocamouflage of the cells tissues and organs for transplantation. Cell Mol Biol 50:209, 2004

5. Giraud S, Claire B, Eugene M, et al: A new preservation solution increases islet yield and reduces graft immunogenicity in pancreatic islet transplantation. Transplantation 83:1397, 2007 Erratum in: Transplantation 84:561, 2007

6. Hauet T, Goujon JM, Baumert H, et al: Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotransplanted pig kidneys. Kidney Int 62:654, 2002

7. Eugene M, Hauet T, Mothes D, et al: Beneficial effects of a low potassium and polyethylene glycol solution on renal function and structure during 48-hour cold storage preservation. Transplant Proc 29:2360, 1997

8. Giraud S, Barrou B, Sebillaud S, et al: Transient depletion of dividing T lymphocytes in mice induces the emergence of regulatory T cells and dominant tolerance to islet allografts. Am J Transplant 8:942, 2008

9. Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, et al: Islet isolation assessment in man and large animals. Acta Diabetol Lat 27:185, 1990

10. Brandhorst D, Iken M, Bretzel RG, et al: Pancreas storage in oxygenated perfluorodecalin does not restore post-transplant function of isolated pig islets pre-damaged by warm ischemia. Xenotransplantation 13:465, 2006

11. Tanaka T, Suzuki Y, Tanioka Y, et al: Possibility of islet transplantation from a nonheartbeating donor pancreas resuscitated by the two-layer method. Transplantation 80:738, 2005

12. Solowiej E, Solowiej J, Kasprzycka-Guttman T, et al: Application of sulforaphane—does it lead to improvement of islet graft survival after warm and/or cold ischemia. Ann Transplant 9:68, 2004

13. Clayton HA, Swift WM, Turner JM, et al: Non-heart-beating organ donors: a potential source of islets for transplantation? Transplantation 69:2094, 2000

3.3 Données supplémentaires non publiées

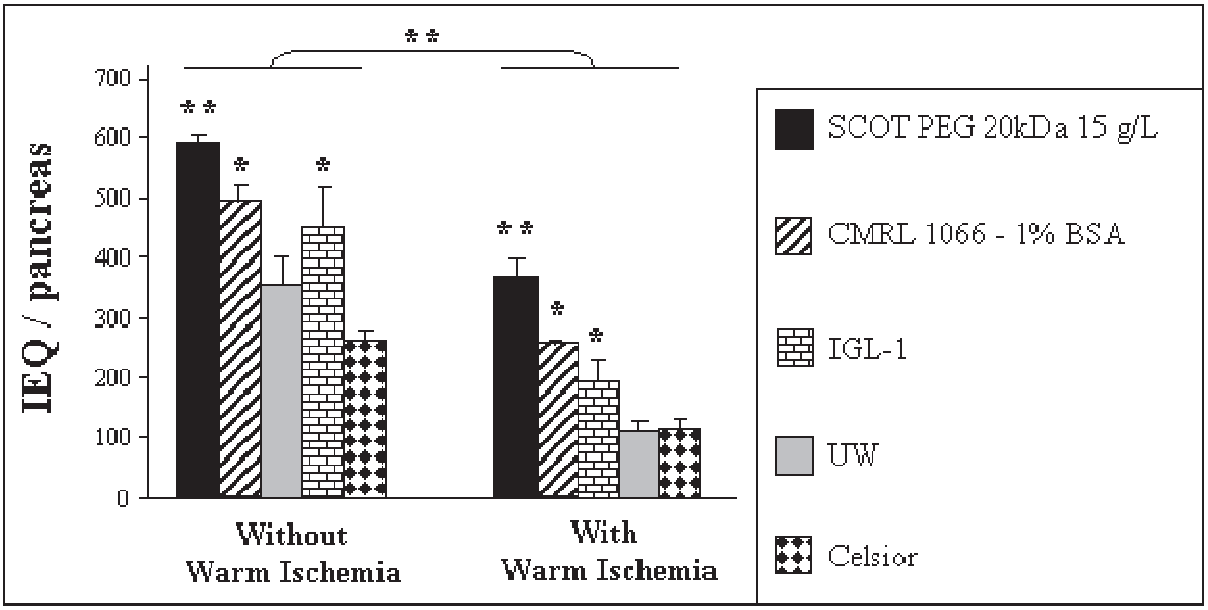


Figure 27 : With or without warm ischemia, islet yield (IEQ/pancreas) obtained 1h after isolation with the different preservation solutions.

*Results are expressed as mean ± SEM (n = 7). ANOVA and test for multiple comparison (significant values versus UW solution are represented by * p<0.05 and **p<0.01), (significant values of Warm ischemia versus none for each solution is represented by **p<0.01).*

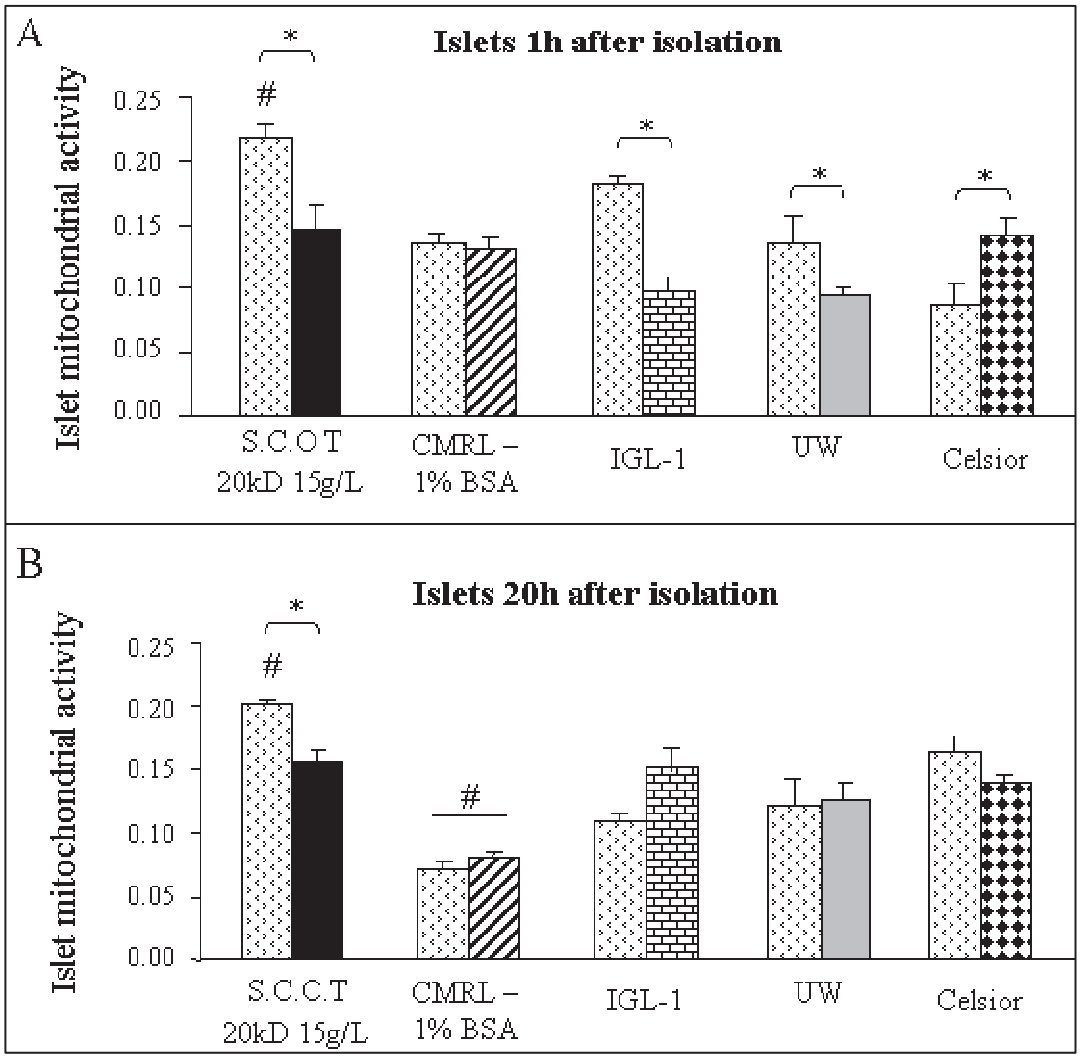


Figure 28 : With or without warm ischemia, mitochondrial activity (relative to cell viability) of islet isolated with different preservation solution and cultured 1h or 20h.

*Data are represented as colorimetric absorbance relative to mitochondrial complexe II activity (Succinate dehydrogenase). Panel A: islet mitochondrial activity 1h after isolation process, islet isolated without warm ischemia (left histogram for each solution), and islet isolated with warm ischemia (right histogram for each solution). Panel B: islet mitochondrial activity 20h after isolation process (culture period), islet isolated without warm ischemia (left histogram for each solution), islet isolated with warm ischemia (right histogram for each solution). * p< 0.05 to IC versus none and # p< 0.05 to SCOT versus others solutions or CMRL-1066 + 1% BSA versus other solutions.*

In these same condtions after warm ischemia or not, different preservation solutions used, and after 1h or 20h culture, data of insulin secretion are not all generated yet.

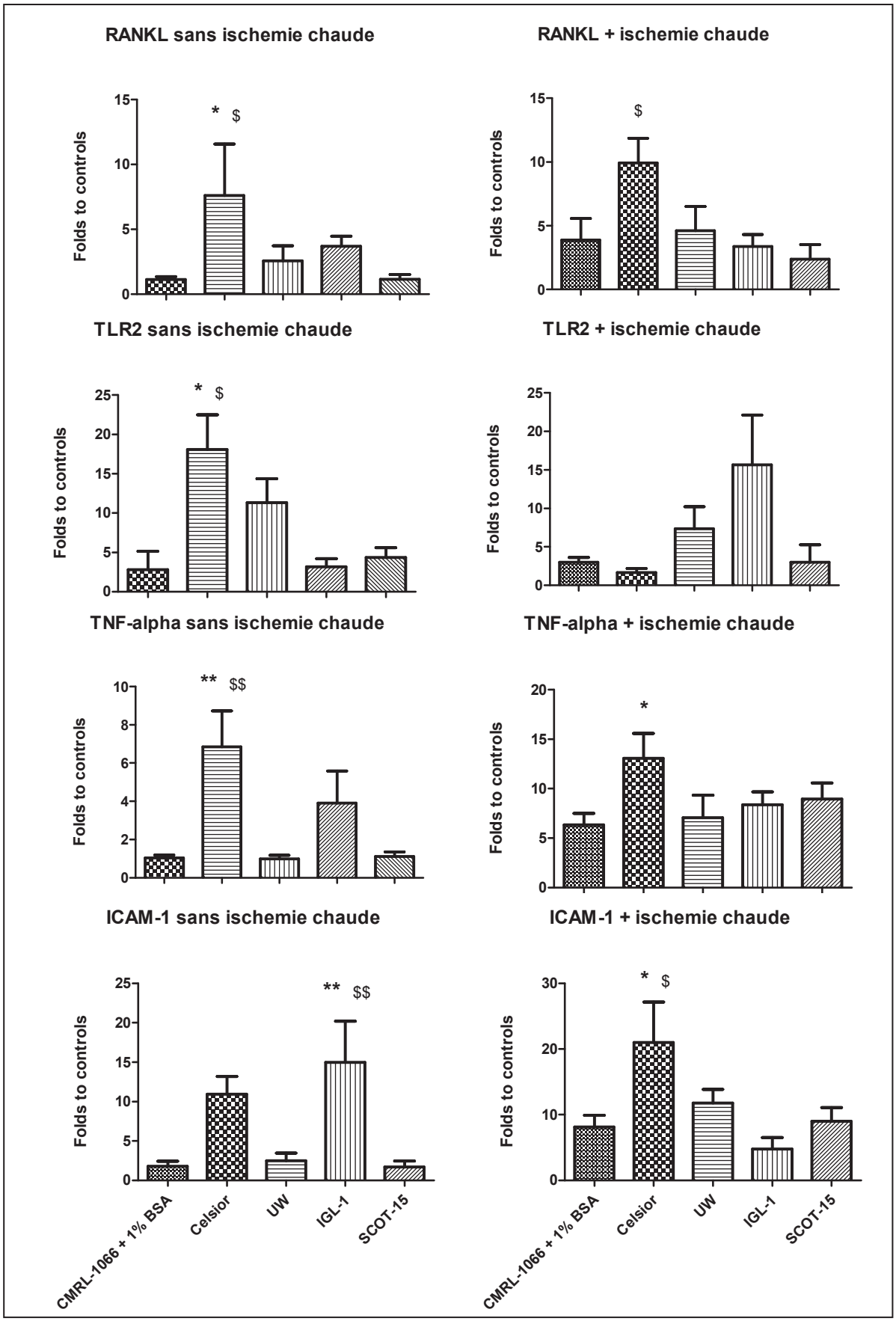


Figure 29 : With or without warm ischemia, transcriptional analyses of islets 1h after isolation.

*Expression level was obtained with the 2(-ΔΔCt) Method, 18S was used as internal control gene and control islets were CMRL-1% BSA condition without warm ischemia. We analysed RNA expression pro-inflammatory markers as TLR-2 (Toll Like Receptor-2), RANKL (TNF-related activation-induced cytokine) factor which can induce expression of ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) or TNF-α (Tumor necrosis factor-alpha). * p< 0.05 to CMRL-1066 + 1% BSA and $ p< 0.05 to SCOT-15 versus others solutions (** or $$ p<0.01).*

The transcriptional analyses of islets 20h after isolation, with or without warm ischemia, are not all generated yet.

3.4 Synthèse:

L'amélioration des conditions de préservation des greffons suscite un intérêt grandissant quant à l'utilisation de greffons provenant de donneurs décédés après arrêt cardiaque. L'utilisation de la solution SCOT contenant 15g/L de PEG 20kDa permet d'améliorer significativement la conservation de la fonctionnalité et la survie du greffon d'îlots pancréatiques dans un modèle murin en l'absence d'ischémie chaude. L'objectif était de comparer le potentiel des différentes solutions de conservation quant à la préservation du métabolisme des îlots pancréatiques prélevés après ischémie chaude.

Nous avons comparé les solutions UW, CMRL-1066 + 1% BSA, Celsior, IGL-1 et SCOT + PEG 20kDa à 15g/L. Nous avons comparé la morphologie et la masse d'îlots équivalents (IEQ) obtenus après isolement. La viabilité cellulaire (test d'activité mitochondriale) et l'expression de transcrits inflammatoires ont été étudiés 1h et 24h après culture à 37°C.

Nos résultats montrent que l'utilisation de la solution SCOT + PEG 20kDa à 15g/L a permis d'obtenir un meilleur rendement d'îlots IEQ par rapport aux autres solutions ($p<0,05$) lors des prélèvements avec ou sans ischémie chaude. Cette solution a permis aussi de mieux préserver la viabilité des îlots conservés 1h ou 24h après prélèvement avec ou sans ischémie

chaude. L'expression des transcrits de RANKL, TLR-2, TNF-a, et ICAM-1 est plus réduite pour des îlots isolés avec la solution SCOT + PEG 20kDa à 15g/L, notamment par rapport à la solution Celsior, avec ou sans ischémie chaude.

La solution SCOT contenant des PEG 20kDa à 15g/L, permet d'obtenir de meilleurs résultats en terme de préservation du métabolisme pour des îlots ayant subi une ischémie chaude. Cette solution semble donc répondre à l'utilisation de greffons provenant de donneur décédés après arrêt cardiaque.

PARTIE II:

I. Induction de tolérance immunitaire à une allogreffe d'îlots

4 Article 4 :

Giraud S, Barrou B, Sebillaud S, Debré P, Klatzmann D, Thomas-Vaslin V. Transient depletion of dividing T lymphocytes in mice induces the emergence of regulatory T cells and dominant tolerance to islet allografts. Am J Transplant. 2008 May;8(5):942-53.

Ce projet a été mené en collaboration avec le Dr Véronique Thomas-Vaslin, laboratoire de biologie et thérapeutique des pathologies immunitaires, UPMC/CNRS UMR 7087.

4.1 Rappel des objectifs et hypothèses

La prévention du rejet de greffes allogéniques repose actuellement sur des traitements immunosuppresseurs responsables d'une morbidité et d'une mortalité importante [Inverardi L.2001]. Un des buts majeurs en transplantation est d'induire une tolérance spécifique à une allogreffe, sans aucune manipulation durable du système immunitaire du receveur. L'une des stratégies éligibles est l'induction d'une tolérance périphérique par déplétion et/ou contrôle des lymphocytes T alloréactifs responsables du rejet d'allogreffe, et ainsi préserver les autres lymphocytes responsables de la surveillance immunitaire. Nos travaux se sont appuyés sur l'emploi du modèle murin de transplantation d'îlots pancréatiques allogéniques permettant de répondre à cet objectif. Nous avons utilisé un modèle de souris transgéniques, exprimant le gène suicide TK (thymidine kinase du virus HSV-1) dans le répertoire lymphocytaire T du receveur d'allogreffe. L'intérêt de ce modèle porte sur les capacités de l'enzyme TK qui, en présence de Ganciclovir (GCV), induit l'apoptose des cellules T en division. En partant du principe que les cellules T en division sont majoritairement les lymphocytes T alloréactifs, nous suggérons que ce protocole permettrait de contrôler le rejet de l'allogreffe tout en préservant les autres cellules du système immunitaire.

4.2 Publication

American Journal of Transplantation 2008; 8: 1–12
Blackwell Munksgaard

© 2008 The Authors
Journal compilation © 2008 The American Society of
Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons

doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02195.x

Transient Depletion of Dividing T Lymphocytes in Mice Induces the Emergence of Regulatory T Cells and Dominant Tolerance to Islet Allografts

S. Giraud[a,b,e], B. Barrou[a,b,e,f], S. Sebillaud[a,b,e], P. Debré[a,b,e], D. Klatzmann[c,d,e] and V. Thomas-Vaslin[c,d,e,*]

[a] *UPMC Univ Paris 06, U543, Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Tissulaire, Paris F-75013 France*
[b] *INSERM, U 543, Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Tissulaire, F-75013 Paris, France*
[c] *UPMC Univ Paris 06, UMR7087, Biologie et Thérapeutique des Pathologies Immunitaires, F-75013 Paris, France*
[d] *CNRS, UMR7087, Biologie et Thérapeutique des Pathologies Immunitaires F-75013 Paris, France*
[e] *IFR113, Pitié-Salpétrière, F-75013 Paris, France*
[f] *AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service d'Urologie, F-75013 Paris, France*
[*] *Corresponding author: Véronique Thomas-Vaslin, veronique.thomas-vaslin@chups.jussieu.fr*

We previously showed that transient depletion of dividing T cells at the time of an allogeneic transplantation induces long-term tolerance to the allograft. Here we investigated the role of homeostatic perturbation and regulatory T cells (Treg) in such tolerance. Transient depletion of dividing T cells was induced at the time of an allogeneic pancreatic islets graft, by administration of ganciclovir for 14 days, into diabetic transgenic mice expressing a thymidine kinase (TK) conditional suicide gene in T cells. Allograft tolerance was obtained in 63% of treated mice. It was not due to global immunosuppression, permanent deletion or anergy of donor-alloantigens specific T cells but to a dominant tolerance process since lymphocytes from tolerant mice could transfer tolerance to naïve allografted recipients. The transient depletion of dividing T cells induces a 2- to 3-fold increase in the proportion of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg, within 3 weeks that persisted only in allograft-bearing mice but not in nongrafted mice. Tolerance with similar increased proportion of Treg cells was also obtained after a cytostatic hydroxyurea treatment in normal mice. Thus, the transient depletion of dividing T cells represents a novel means of immuno-intervention based on disturbance of T-cell homeostasis and subsequent increase in Treg proportion.

S. Giraud and B. Barrou contributed equally.

Key words: Diabetes, rodent, T cells, tolerance/suppression, transplantation

Abbreviations: B6, C57Bl/6; GCV, Ganciclovir; LN, lymph nodes; TK, HSV1-Thymidine Kinase transgene; TK+GCV+, mouse transgenic for TK treated with GCV; STZ, streptozotocine; Treg, regulatory T cells

Received 26 July 2007, Revised 14 January 2008 and accepted 30 January 2008

Introduction

Various mechanisms operate during induction and maintenance of transplantation tolerance. Recessive processes such as T-cell deletion or anergy can reduce effector functions against allogeneic donor cells but are not always sufficient. Consequently, dominant processes mediated by regulatory T cells (Treg) are important to establish natural and transplantation tolerance (1–4). Treg can be selected centrally in the thymus and can also be selected in the periphery. In the thymus, epithelial cells play an essential role in the positive selection of specific $CD4^+$ regulatory T cells that are able to induce transplantation tolerance (4–6). In the periphery, dominant transplantation tolerance can be obtained through different methods that result in the emergence of Treg. These methods include (i) costimulatory blockade (7–11); (ii) nondepleting anti-CD4 therapy (11–13) associated or not with donor-specific blood transfusion (14); and (iii) induction of tolerogenic dendritic cells by various protocols including treatment with vitamin D receptor ligands (15), opsonization of apoptotic cells and capture of antigens by immature or plasmacytoid dendritic cells (16, 17). Induction of peripheral tolerance can also be triggered by experimental protocols that result either in clonal deletion or inactivation of T cells, associated with expansion of Treg (18, 19). Depletion of alloreactive T cells by apoptosis, leading to the emergence of Treg, was suggested to be a requirement for transplantation tolerance induction (20). However, T-cell depletion can also trigger homeostatic proliferation of memory T cells, which can impair the induction of transplantation tolerance (21). Thus, a therapeutic strategy that can destroy alloreactive T cells by apoptosis, including memory T cells, but preserve quiescent T cells and induce the emergence of Treg would be valuable for allograft tolerance induction.

We previously described a strategy by which long-term tolerance to surgically vascularized heart allograft was induced in mice. Our treatment was based on a time-controlled, selective destruction of dividing T cells for 2 weeks, starting at the time of transplantation, thus mainly targeting alloreactive T cells. This was achieved by the pharmacogenetic depletion of dividing T cells expressing the therapeutic conditional suicide gene, thymidine kinase of type 1 Herpes Simplex Virus (HSV1-TK). HSV1-TK phosphorylates the inactive prodrug ganciclovir (GCV), changing it into a toxic triphosphorylated-GCV nucleotide analog. This analog, when incorporated into a growing DNA strand, blocks its elongation and leads to apoptosis of the dividing cells. We previously generated transgenic mice specifically expressing the HSV1-TK suicide gene in both $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes (TK^+ mice). Using these mice, we showed that the transient depletion of dividing T cells by GCV (i) controls T-cell-mediated immune diseases involving alloreactive and pathogenic T cells (22–26); (ii) induces long-term, specific and robust tolerance to vascularized allogeneic heart grafts (27) or delayed rejection of self-vascularized skin and heart (28); (iii) and disrupts immunological memory maintenance (29). Here we show, in allogeneic pancreatic islet transplantation, that tolerance induction is mediated by a progressive expansion of Treg. This expansion is a direct consequence of an altered homeostatic balance following the depletion of dividing T cells by apoptosis.

Materials and Methods

Mice

FVB/N ($H\text{-}2^q$), C57 Bl/6 (B6, $H\text{-}2^b$, CD45.2) and BALB/c ($H\text{-}2^d$) mice were obtained from Charles River, France. The HSV1-TK transgenic mice, FVB EpCD4TK line 40, (referred to as TK^+) have been described previously (28) and were bred in our animal facility and used at 10–15 weeks of age. In the transgenic animals, the absence of the CD4 silencer (30) led to transgene expression in both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells (28). Mice were kept under specific pathogen-free conditions and were manipulated according to European council directive 86/609/EEC of 24 November 1986.

GCV and hydroxyurea (HU) administration

The modality of the GCV (Cymevan, Roche, France) administration was previously studied *in vitro* and *in vivo* (28). GCV was diluted in pyrogen-free H_2O, filtered (0.22 μm) and administered by mini-osmotic pumps (Alzet 2001 or 2002, Charles River Laboratories), which delivered GCV at the dose of 50 mg/kg/day for 7 or 14 days allowing a plasma concentration of 7.4 μM. Pumps were implanted s. c. under ketamine (150 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg i.p.) anesthesia at the time of transplantation. HU (Hydrea, Bristol-Myers Squibb) was administrated as cycle of 2 ip injections at 1 g/kg/day, 7 h apart; mice received six cycles every 2 or 3 days over a 12-day period.

Islet isolation

Islets were isolated as previously described (31) by stationary digestion with Liberase RI (Roche Diagnostics, Meylan, France) after *in situ* distension of the pancreas. Islets were purified on a discontinuous Euroficoll gradient, handpicked to obtain 100% purity and cultured overnight at 37°C and 5% CO_2 before transplantation.

Islet transplantation and follow-up

Recipients were rendered diabetic by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, Sigma-Aldrich, France) and 1000 islets were grafted under the left kidney capsule as previously described (31). The experimental group consisted of TK^+ mice treated with GCV for 14 days (TK^+GCV^+). Control groups consisted of TK^+ mice with no GCV treatment (TK^+GCV^-) and nontransgenic littermate mice either treated with GCV (TK^-GCV^+) or untreated (TK^-GCV^-).

Blood glucose concentrations (glycemia) were measured using a glucometer (kindly provided by Bayer Diagnostic, France). Rejection was defined as the observance of two successive nonfasting blood glucose concentrations > 200 mg/dL. Mice that did not become hyperglycemic after removal of the graft-bearing kidney were excluded from the study because regeneration of the native endogenous endocrine pancreatic function had occurred, making clinical assessment of the graft function impossible.

Graft infiltrating cells

For immunohistological analysis, 8 μm cryostat sections of the islet-bearing kidney were stained as previously described (32). Briefly, we used biotinylated anti-CD4/CD8 mAbs followed by the enzymatic avidin-biotin-peroxidase/ 3-amino -9-ethyl carbazole reaction and H/E staining. We observed the slides on a Nikon DIAPHOT microscope (Nikon, France, SA).

To obtain cell suspensions for FACS analysis, islets were separated from the kidney and digested with 1.6 mg/mL type IV collagenase (Sigma Aldrich, France) and 200 μg/mL DNase I at 37°C for 30 min.

Skin grafts

Skin pieces ($1cm^2$) from tail mouse were grafted on the back of recipients under ketamine (150 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg i.p.) anesthesia and follow-up was done as previously described (28).

Cell suspensions

Spleen cell suspensions and pooled axillary, brachial and inguinal lymph node cell suspensions were obtained by mechanical dilacerations. Live cells were counted after trypan blue exclusion. PBL were separated by gradient density on MSL (Eurobio Biotechnology).

Lymphocyte proliferation and cytotoxicity

Cells were cultured for 3 days at 37°C with 5% CO_2 in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 5×10^{-5} M 2-ME, penicillin/streptomycin/neomycin (all from Gibco, BRL) in triplicate in 96-well, U-bottom microplates in a total volume of 200 μL. For MLR, responders (4×10^5/well) were stimulated in the presence of 20 Gy-irradiated stimulators (4×10^5/well). For mitogenic reactions, Con A (2 μg/mL) was added to 2×10^5 cells/well. Proliferation was assayed on day 3 by a ^{3} H-dThd pulse (1 μCi/well), for 16 h. For CTL tests, cells were cultured for 5 days in the presence of allogeneic irradiated spleen cells, then ^{51}Cr release from EL-4 ($H\text{-}2^b$) target cells was assayed as described (29).

Tolerance transfer experiments

Secondary recipients were made diabetic by STZ injection, then sublethally irradiated (2 Gy). The next day, splenocytes were recovered from primary tolerant recipients. The cell suspension was injected i.v. into the retro-orbital sinus of the secondary recipients at the time of islet allograft transplantation under the kidney capsule.

In vivo *treatment with anti-CD25 mAb*

Mice received one i.p.injection of 100 μg in 100 μL of PC61 IgG1 anti-CD25 monoclonal antibody.

Immunostaining and flow cytometry

Cells (2×10^6) were incubated with optimal dilutions of labeled monoclonal antibodies diluted in 50 μL PBS/3% newborn calf serum (NCS Gibco, BRL), for 20 min at 4°C and then washed in PBS/3% NCS. Intra-cytoplasmic staining for measurement of IFN-γ was done using the Cytofix/Cytoperm Plus Pharmingen kit on cells cultured for 4 h at 37°C in presence of Golgiplug, with or without cell stimulation with anti-CD3+anti-CD28 (1 μg/mL) (Pharmingen, San Diego, CA). The monoclonal antibodies anti-CD4 (RM4–5), anti-CD8 (53–6.7), anti-CD62 L (MEL-14), anti-CD44 (IM7) and anti-CD25 (PC61 or 7D4) were obtained from Pharmingen, San Diego, CA. Foxp3 intracellular staining was done with the anti-mouse/rat Foxp3 staining set (clone FJK-16s) from eBioscience (Cliniscience SA, Montrouge, France). A FACSCalibur or a LSR2 (Beckton Dickinson) was used for acquisitions and viable lymphocytes were gated on the basis of forward and side scatter parameters, with Flowjo software (Tree Star, San Carlos, CA).

Statistical analysis

Stat view software (SAS Institute Inc.) was used for statistical analysis. Cumulative graft survival was calculated using Kaplan-Meier estimates. Comparisons were made with the Log-rank test (Mantel-Cox). Mean graft survival was expressed as mean survival time (MST) ± SEM. The Mann-Whitney U-test was used to compare values for the different groups. The PSLD Fisher test was used to compare cell numbers over time. The LOWESS smooth (tension 66) was used to draw T-cell dynamics.

Results

Transient depletion of dividing T cells induces tolerance to islet allograft

B6 islets were grafted under the kidney capsule of diabetic FVB mice. Islet allografts were rejected in all control groups (TK^+GCV^-, TK^-GCV^+; TK^-GCV^-) (Figure 1A to C). The mean time of graft survival was 17.5 ± 0.9 days (Figure 1F). In contrast, 14 of 22 (63%) TK^+ grafted mice treated with GCV were normoglycemic for more than 100 days with no additional immunosuppression; hyperglycemia occurred immediately after removal of the graft-bearing kidney (Figure 1D). These results demonstrate that normoglycemia was due to the function of the grafted islets. The remaining nine recipients (37%) experienced delayed graft rejection (Figure 1E); loss of graft function was less rapid than that of the classical acute rejection observed in controls. The mean graft survival time of these

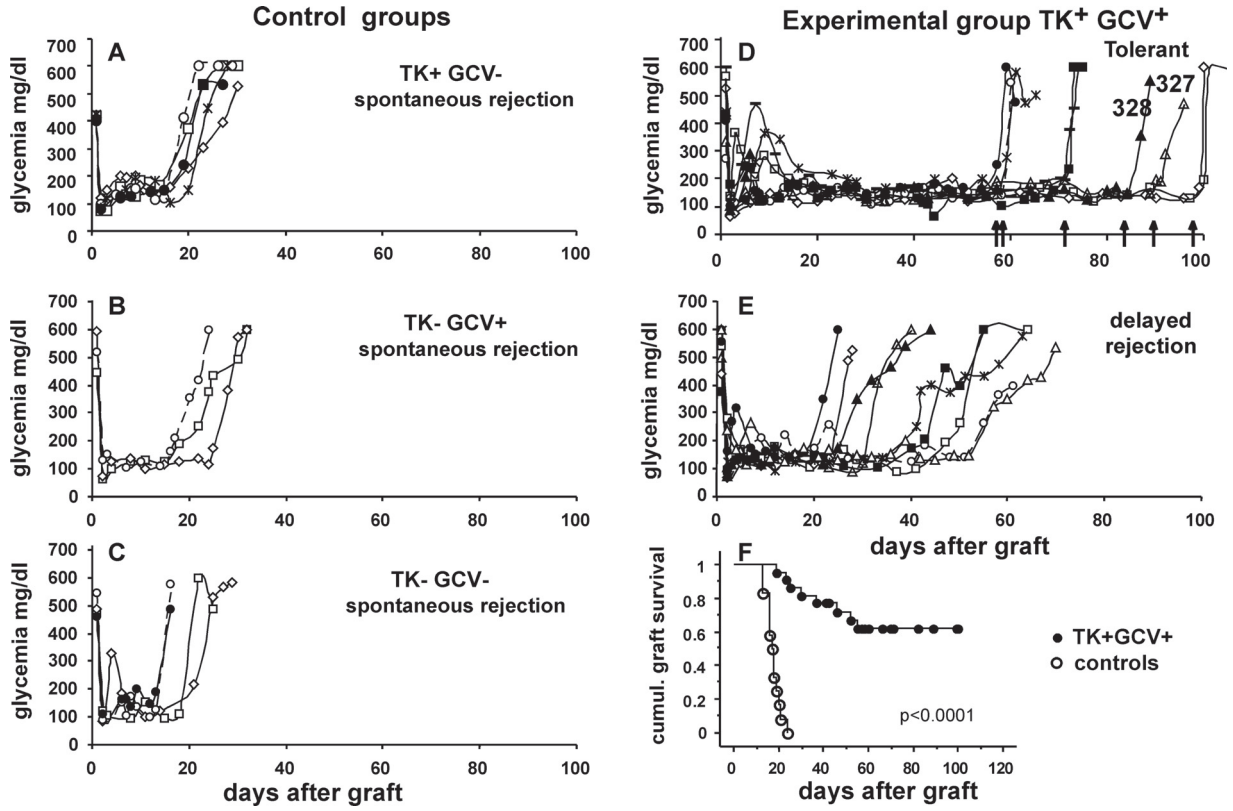


Figure 1: Induction of tolerance to B6 islet allograft in diabetic TK^+ mice, treated by GCV for 14 days. Glycemia in STZ-induced diabetic recipients (TK^+ or TK^-) receiving a B6 islet allograft and treated or not treated with GCV. (A–C): control mice, which experienced spontaneous rejection; (D): TK^+GCV^+ tolerant animals (arrows indicate graft removal by nephrectomy) (Mice 327 and 328 were the donors for further cell transfer experiments). (E): TK^+GCV^+ recipients displaying delayed rejection. (F): Kaplan-Meier estimates of B6 islet allograft survival in TK^+GCV^+ mice (closed circles, n = 22, from D, E) or control mice (open circles, n = 12 from A–C) (Log-rank test $p < 0.0001$).

mice was significantly longer (35.8 ± 12.9 days, Log-rank test $p < 0.0001$) than that of the control groups. These results show that a state of long-term tolerance was achieved in at least 60% of the mice.

Tolerant recipient splenocytes retain normal proliferative and CTL functions in vitro

To address the mechanisms of tolerance–deletion, anergy or suppression—we assayed the proliferative and cytotoxic capacities of T cells from grafted recipients. Two to three months after transplantation, splenocytes from tolerant TK^+GCV^+ mice displayed proliferative responses to Con A stimulation (Figure 2A) to donor or third-party alloantigens (Figure 2B) and cytotoxic activities against donor haplotype (Figure 2C) and IFNγ secretion (Figure 2D) similar to those of nonmanipulated control mice.

TK^+GCV^+ mice experiencing delayed rejection had significantly lower responses to Con A (Figure 2A), and to both donor and third-party alloantigens (Figure 2B) than tolerant or naïve mice, while IFNγ secretion by $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells (Figure 2D) did not differ from that in nonmanipulated controls. Thus, following the delayed rejection episode *in vitro* T-cell proliferation is partially affected while IFNγ secretion was conserved.

In vivo *specificity of the tolerance*

We further assessed the immunocompetence and the antigen specificity of tolerance by the ability of TK^+GCV^+ tolerant mice to reject a third-party skin or islet allograft When mice tolerant to B6 islets for more than 2 months, received skin grafts without treatment (Figure 3A), the BALB/c third-party skin was acutely rejected in 17 days as in naïve recipients ($p > 0.05$ Log-rank test) while the B6 skin rejection was chronic and delayed to 31 days ($p < 0.05$ Log-rank test compared to BALB/c graft and compared to rejection of B6 skin in naïve recipient). A second islet of third-party origin (BALB/c) grafted on day 42 on a tolerant mouse was rejected in less than 29 days (not shown). Thus, tolerance is specific of B6 donor haplotype but not of islet since skin graft survival was prolonged.

In vivo *suppression of islet graft rejection by adoptive transfer of splenocytes from tolerant mice*

We analyzed whether splenocytes from TK^+GCV^+ tolerant mice could suppress rejection of allogeneic islet graft upon transfer to normal immunocompetent mice rendered diabetic. Recipient mice, were sublethally (2 Gy) irradiated before cell transfer to favor T-cell engraftment; this conditioning did not alter the capacity of mice to reject islet allografts, which occurred in 22 ± 1 days (Figure 3C). Allograft recipients received 60×10^6 total splenocytes from TK^+GCV^+ tolerant FVB mice. No other treatments were given. Two of the five recipients of splenocytes remained fully tolerant to B6 islets, and normoglycemic until graft removal (Figure 3B). The three other recipients experienced significantly delayed rejection of islets (Log-rank test

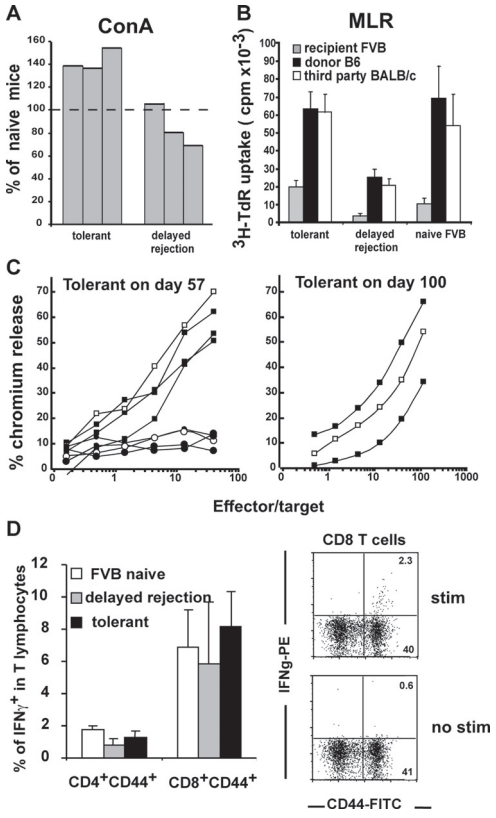


Figure 2: *In vitro* proliferative, cytotoxic and IFNγ responses in TK^+GCV^+ mice grafted with allogeneic islets. (A–D) Splenocyte responses from TK^+GCV^+ mice grafted with B6 islets. Spleens were recovered from tolerant mice (57 or 100 days after grafts were placed) or from mice that had delayed graft rejection on days 25, 37 and 42 (spleen tested on days 13 to 26 after rejection, normoglycemia in the mice was maintained by insulin administration). Naïve mice were nonmanipulated FVB mice. (A): Proliferative response to ConA (on day 3 of culture) tested by ^{3} H-Tdr uptake; results are expressed as percentage of the response obtained with naïve FVB mice (100%). Each bar represents the response of a separate mouse. ($p < 0.05$ in mice with delayed rejection, $p > 0.2$ in tolerant mice compared to naïve controls, Mann-Whitney U-test,) (B): Proliferative response in MLR (on day 3 of culture) against irradiated splenocytes from FVB recipient (gray bars), B6 donor (closed bars) or BALB/c third party (open bars), (mean ± SD from mice either tolerant ($n = 5$), with delayed rejection ($n = 3$) or naïve ($n = 5$)). Responses against irradiated splenocytes from B6 and BALB/c mice: $p > 0.2$ (Mann-Whitney U-test) comparing tolerant and naïve mice, $p<0.05$ comparing mice with delayed rejection and tolerant or naïve mice. (C): CTL activities from separate tolerant mice (closed symbols), 57 or 100 days after grafts were placed. Values are expressed as percentages of chromium release from H-2^b targets after B6 stimulation (square) or after BALB/c stimulation (circle). Open symbols are responses from control naïve FVB mice. (D): (Left) IFNγ secretion determined by flow cytometry after intracytoplasmic staining. Mean values ± SD of % IFNγ$^+$ cells in $CD4^+CD44^+$ or $CD8^+CD44^+$ T cells, $n = 3$ mice per group (no significant differences between groups, $p > 0.05$ Mann-Whitney U-test). (Right) Typical dot plot of IFNγ staining in gated CD8 T splenocytes from a tolerant mouse with or without *in vitro* stimulation.

$p < 0.01$, MST 32.3 ± 4.7 days), as compared with similarly irradiated and grafted controls that received no cell transfer (MST 22 ± 1 days,) transfer of cells from naïve nontolerant mice (MST 21.3 ± 2.0 days), (Figure 3C). Cells transferred from TK^+GCV^- mice at the time of islet graft rejection, led to accelerated rejection of islet graft at 15 days in the second recipient (n = 1, data not shown), as previously shown in other graft models (33). Noteworthy, another group of recipient mice receiving splenocytes from tolerant donor rejected a B6 skin graft as rapidly as controls receiving cells from naïve animals or without cell transfer (MST 17, 16 and 19 days, respectively Log-rank test, $p > 0.2$) (Figure 3C). Thus, splenocytes from mice tolerant to B6 islets contain regulatory cells capable to control effector cells responsible for rejection of B6 islets but not B6 skin.

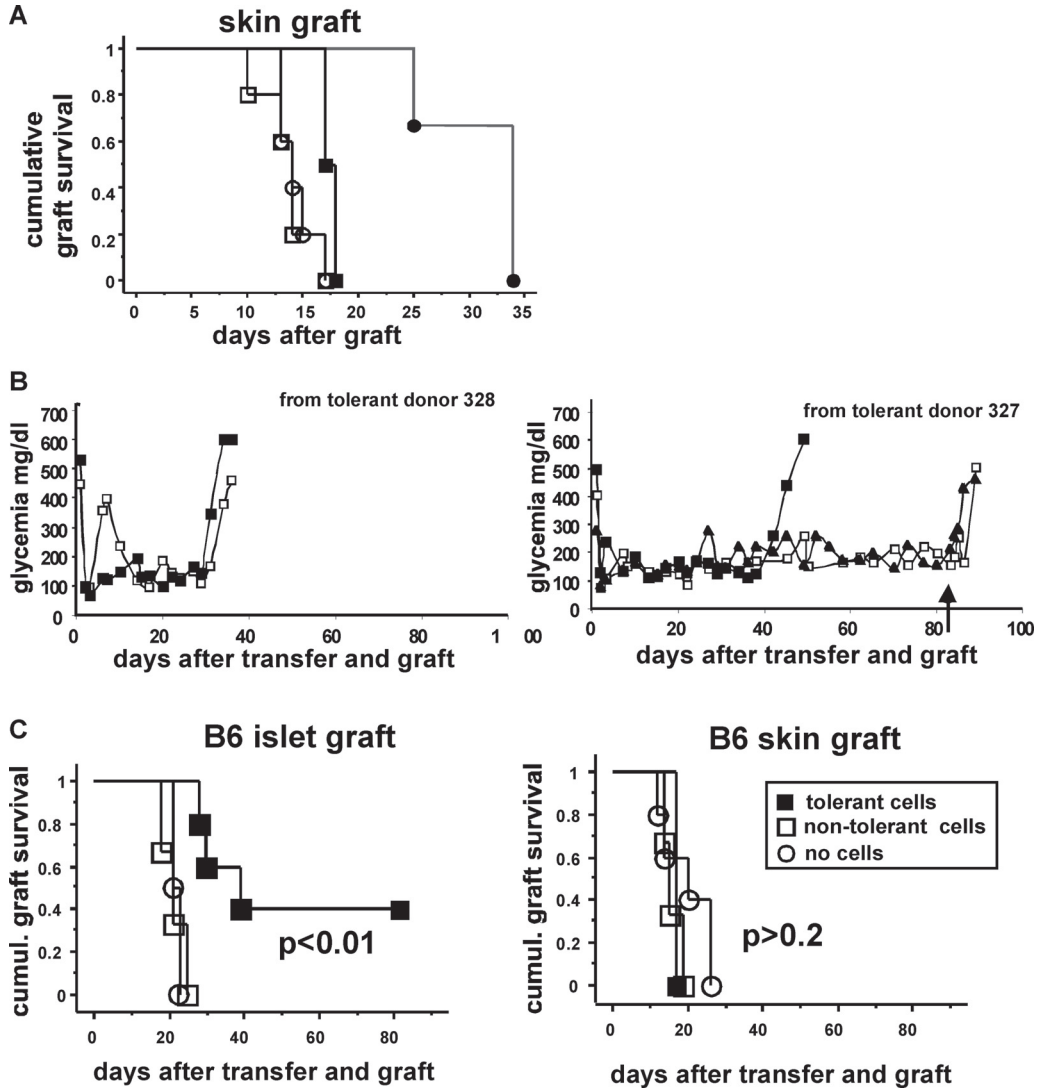


Figure 3: ***In vivo*** **specificity of tolerance and capacities to transfer tolerance.** (A): Kaplan-Meier cumulative estimates of survival of skin grafted on TK^+GCV^+ mice tolerant to B6 islets for more than 60 days (splenectomized and nephrectomized to ascertain tolerance and maintained under insulin), grafted with B6 skin (closed circles, MST 31 ± 3.5 days, n = 5) and BALB/c skin (closed squares, MST 17 ± 6.4 days, n = 3). Naïve control mice were grafted with B6 skin (open circles, MST 14.4 ± 0.7 days, n = 5) and BALB/c skin (open squares, MST 13.6 ± 1.1 days, n = 5). (B–C): Transfer of tolerance to immunocompetent FVB mice: Splenocytes from TK^+GCV^+ mice tolerant to B6 islet allografts (>80 days) were transferred (60×10^6/mouse) into 5 FVB mice that had been made diabetic. At the same time, these mice received a B6 islet allograft. (B) Glycemia of FVB recipients after splenocyte transfer (from the tolerant mice 328 and 327 described in Figure 1D). The arrow indicates islet graft removal. (C) Kaplan-Meier cumulative survival plot of B6 islets or B6 skin, independently grafted in FVB mice, after cell transfer from tolerant mice (closed square), from nontolerant mice (open square) or without cell transfer (open circle). Recipient of skin graft were normoglycemic mice.

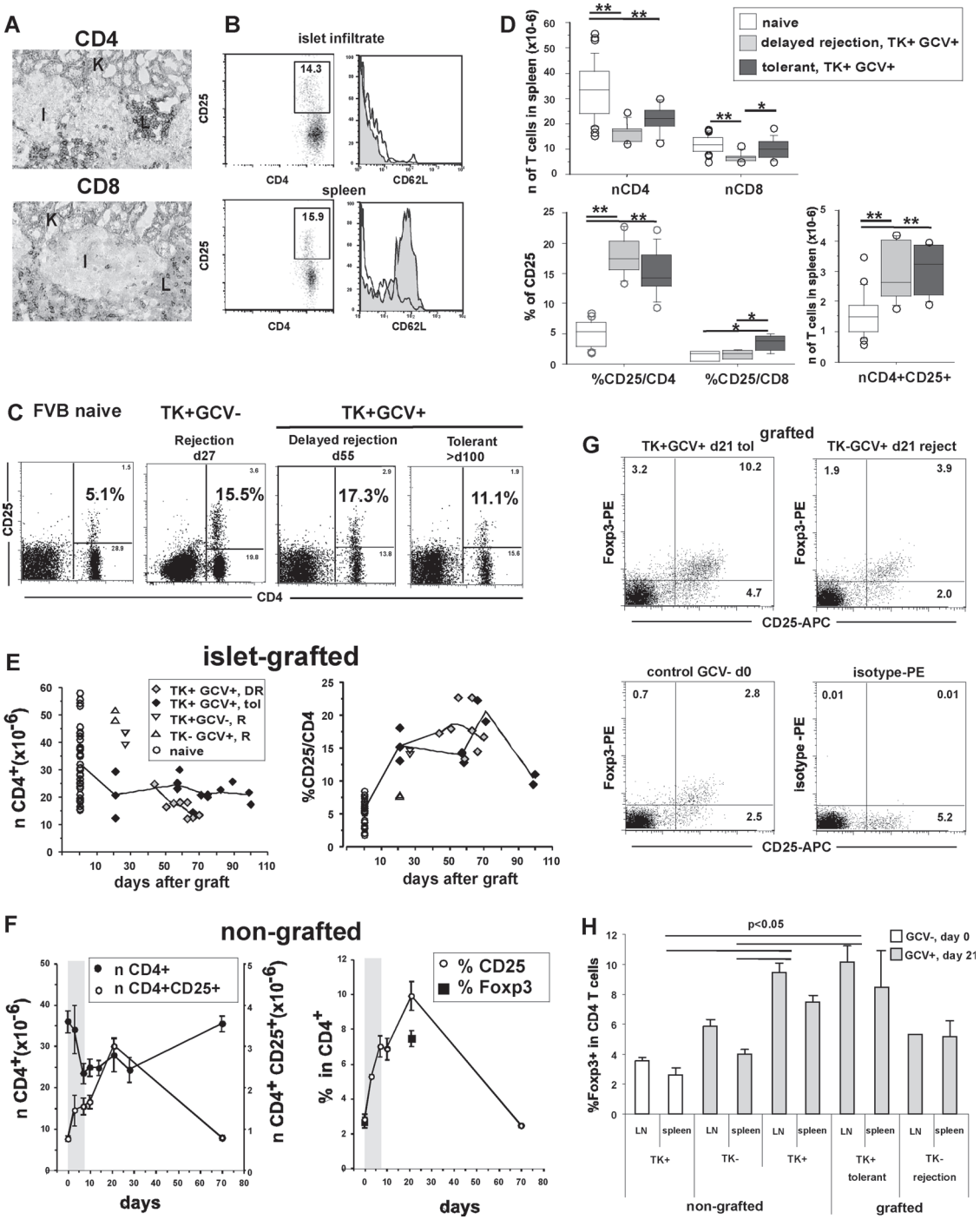


Figure 4: Increased expression of Treg cells following transient depletion of dividing T cells. (A): Immunohistological analysis of cryostat sections of kidney (K) supporting functional islet allografts (I) on day 104 in a tolerant TK^+GCV^+ mouse. Lymphocytes (L) were stained with anti-CD4 or anti-CD8 followed by a peroxidase/ AEC reaction and H/E staining. Original magnification ×400. (B): FACS analysis of islet allografts and spleen of tolerant TK^+GCV^+ mice (day 104). CD25 expression among CD4 gated lymphocytes. CD62 L expression in $CD4^+CD25^-$ (closed histogram) or $CD4^+CD25^+$ (open histogram). (C–D): FACS analysis of splenocytes from naïve nontreated control FVB mice (n = 19), or from TK^+GCV^+ mice allografted with B6 islets, either experiencing delayed rejection (from days 25 to 66, n = 8, spleen tested on days 13 to 26 after rejection with mice maintained under insulin), or tolerant (>day 57, n = 9) or in TK^+GCV^- (on day 27, upon rejection n = 2). (C) Representative FACS dot plot staining in lymphocytes. The numbers in bold represent the % of CD4 T cells expressing CD25. (D) Numbers and percentages of T cells in spleen (the line in the middle of the box represents

the 50th centile of the variable, the box extends to from the 25th and 75th centile, the lines extending above represent the 10th and 90th centile and values above are separately represented by points. $* p < 0.05$, $** p < 0.01$, Mann Witney. (E): Dynamics of CD4 and $CD4^+CD25^+$ splenocytes in individual mice, with LOWESS smooth. TK^+ mice treated with GCV for 14 days (diamonds) at the time of B6 islet grafts. Naïve mice (open circles), grafted controls insensible to depletion treatment (TK^+GCV^-, TK^-GCV^+, triangles) are also shown at time of graft rejection. Outcome of the graft: acute rejection (open triangles), delayed rejection (DR) (gray symbols) or tolerance (closed symbols). (F): Dynamics of CD4 splenocytes recovered from TK^+ mice treated with GCV for 7 days in the absence of any graft. Left panel: Numbers (mean ± SEM, n = 3 to 8 per point) of $CD4^+$ cells (closed circle) and $CD4^+CD25^+$ cells (open circle) in the spleen. Right panel: Percentage of CD4 T splenocytes expressing CD25 (open circles). The gray bar indicates the period of GCV treatment. Similar kinetics was observed in the LN, and also after a 14 days GCV treatment, in spleen and LN. Closed squares represent the percent of $Foxp3^+$ cells in CD4 upon a 14 days GCV treatment. (G, H) Differential expression of Foxp3 in CD4 T cells, on day 21 in nongrafted or B6 islet-grafted mice. (G): FACS dot plot of CD4 T cells gated from pooled LN cells (axillary, brachials, inguinal). Upper panels : TK^+ or TK^- mice grafted with B6 islets, treated with GCV for 14 days and observed on day 21. The TK^+ mice were normoglycemic and tolerant to the graft (TK^+GCV^+d21 tol); the TK^- mice rejected the graft (nonfunctional graft). Lower panels: naïve mouse (control d0 GCV^-), stained with Foxp3-PE (left) or with the isotype-PE control mAb (right). (H): Foxp3 percentages (mean ± SEM, 3 mice per group) in CD4 gated T cells recovered from pooled LN or spleen. Nongrafted TK^+ or TK^- mice were either nontreated (day 0 open histogram) or treated for 14 days with GCV and observed on day 21 (closed histogram). Grafted TK^+ or TK^- mice were treated with GCV for 14 days and observed on day 21 (as in the upper G panel). Bars indicate significant differences ($p < 0.05$ Mann-Whitney U-test) between groups in both spleen and LN.

Depletion of dividing T cells induces the emergence of $CD4^+$ Treg cells

In long-term normoglycemic tolerant mice, $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes could be detected surrounding the transplanted islets (Figure 4A). High proportions of graft infiltrating $CD4^+$ T lymphocytes and spleen cells expressed CD25 (Figure 4B). Most graft infiltrating $CD4^+$ T cells and $CD4^+CD25^+$ of the spleen have lost CD62 L expression corresponding to antigen-experienced T cells, in contrast to $CD25^{neg}$ T cells that always expressed high levels of CD62 L corresponding to naïve cells.

TK^+GCV^+ mice either tolerant or experiencing a delayed rejection have a significant reduction in the percentages (Figure 4C) and numbers of $CD4^+$ splenic T cells (Figure 4D–E) compared to naïve mice. In contrast the numbers and proportion of $CD4^+CD25^+$ T splenocytes were two times higher. Control mice analyzed at the time of an acute allogeneic islet graft rejection (TK^+GCV^- on day 27 or TK^-GCV^+ on day 21) present high numbers of CD4 T cells and $CD4^+CD25^+$ cells (Figures 4E, 6D). This is in accordance with their insensibility to T-cell depletion and activation/expansion of effector T cells.

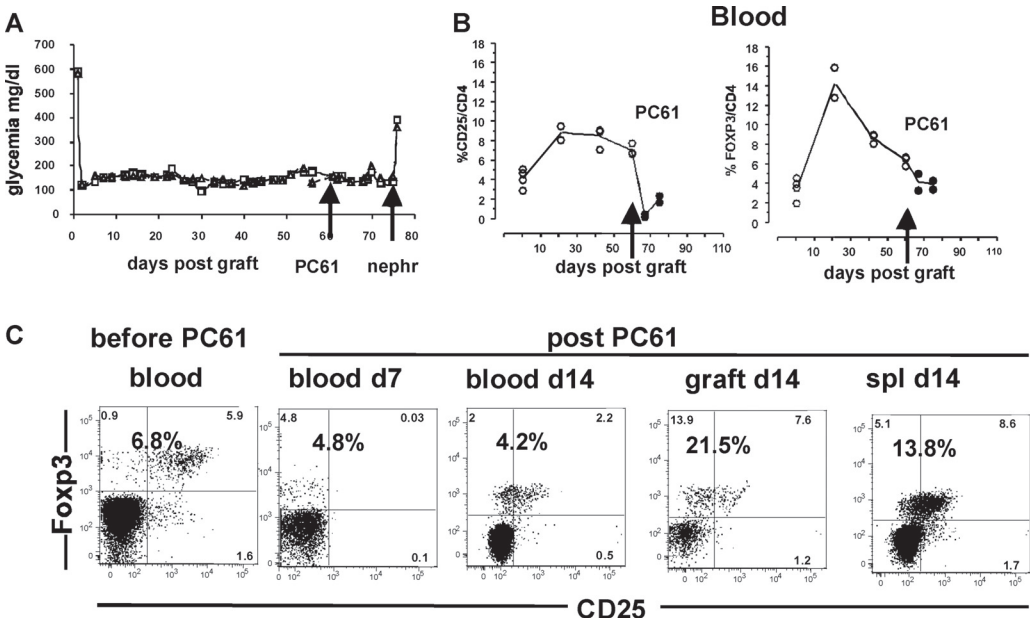


Figure 5: Maintenance of tolerance by $Foxp3^+CD25^-$ cells after PC61 treatment. (A) TK^+GCV^+ tolerant mice were treated with anti-CD25 PC61 mAb on day 61 post-islet B6 graft and nephrectomized on day 74. (B) Effects of treatment followed by FACS in the blood and (C) FACS dot plot before or after PC61 treatment in blood and on day 14 in spleen and graft (i.e. on day 74 post graft).

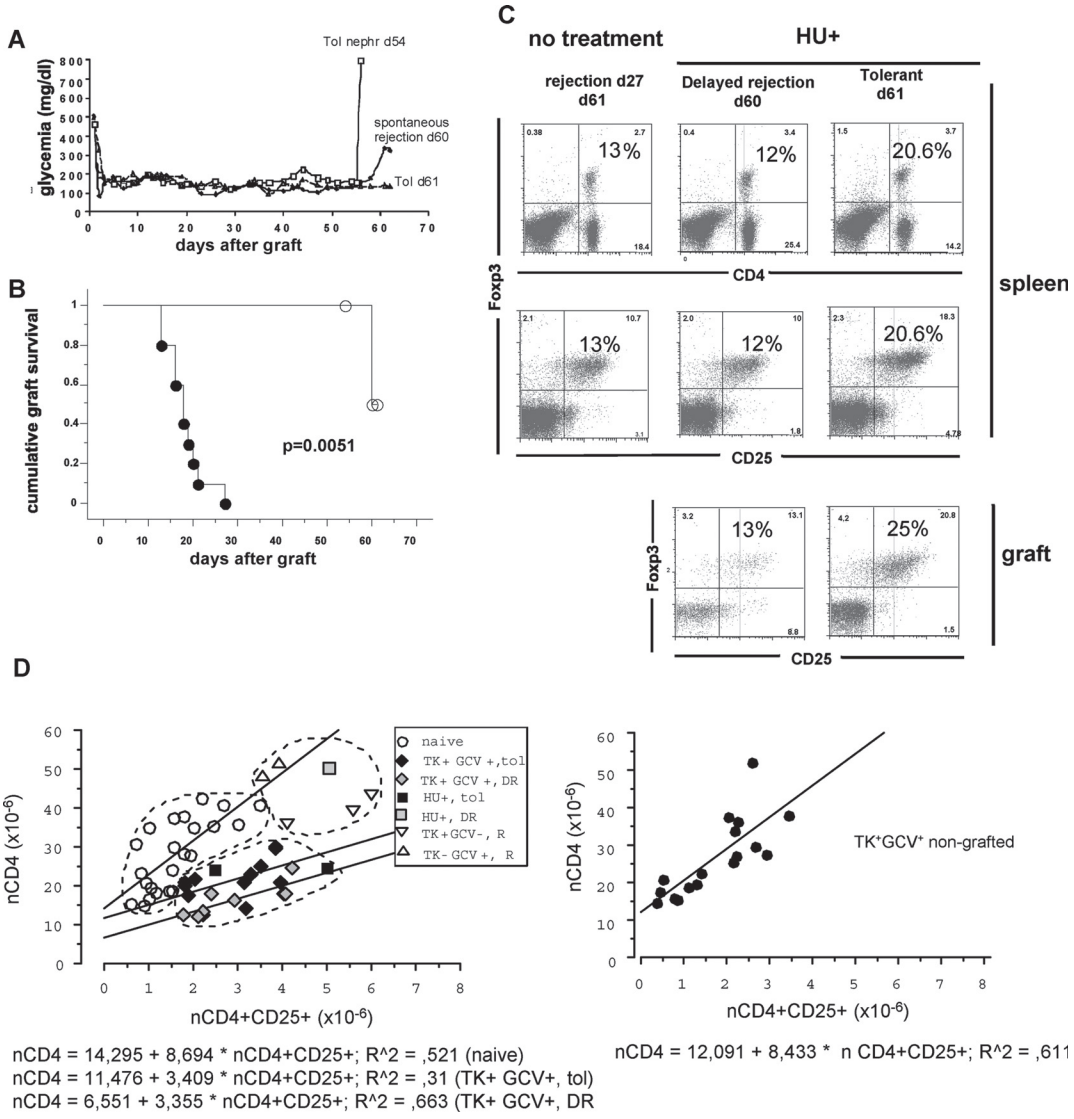


Figure 6: Induction of tolerance by HU treatment and characteristic patterns of CD4 and CD25 numbers. (A-C): FVB diabetic mice grafted with B6 islets and treated with HU for 12 days. (A) Glycemia of 3 mice (one was nephrectomized on day 54, the second had a delayed rejection on day 60 -analyzed on day 61- and the third was still tolerant on day 61). (B) Kaplan-Meier cumulative survival plot of B6 islets in HU treated mice (n = 3) compared to untreated controls (n = 10) (p = 0.0051 Log-rank test). (C) Representative FACS dot plot staining in lymphocytes. The numbers in bold represent the % of CD4 T cells expressing Foxp3. The nontreated mouse rejected the B6 islets on day 27 and was analyzed on day 61 (maintained under insulin treatment). (D) Relative numbers of CD4 and CD25 T cells in the spleen of mice, left panel: grafted with B6 islets after tolerance induction protocols with TK/GCV or HU (tolerant mice: black symbols, delayed rejection: gray symbols), or in grafted controls insensible to depletion treatment and that rejected the graft (TK^+GCV^- or TK^-GCV^+), independently of time post graft or ungrafted naïve controls; right panel : in TK^+GCV^+ nongrafted mice (as in Figure 4F). Linear regression curves are shown. Dotted areas underline the particular pattern of 'naïve nontreated', 'grafted tolerized' or 'grafted nontolerized' mice.

Homeostatic imbalance following transient T-cell depletion

We investigated whether emergence of Treg is related to homeostatic imbalance following the initial depletion of dividing T cells. We compared the T-cell dynamics of TK^+ mice either grafted or not with B6 islets, upon GCV treatment (Figure 4E–H).

In the absence of graft (Figure 4F), the total number of $CD4^+$ T cells significantly decreased in TK^+GCV^+ mice (PSLD Fisher, $p < 0.05$ comparing day 0 with days 7, 10 and 28) reaching at nadir, from day 7 to 28, around 23×10^6 CD4 T cells. In contrast, the numbers and percentages of $CD4^+CD25^+$ and of $CD4^+Foxp3^+$ cells increased two times (PSLD Fisher, $p < 0.05$ comparing day 0 with

days 3, 7, 10 and 21 for $CD4^+CD25^+$ numbers) in spleen and lymph nodes (LN) in 3 weeks (Figure 4G, H). All these alterations are fully reversible, recovery to control values occurring within 2 months (Figure 4F).

In the presence of an islet allograft, the dynamics of T cells from TK^+GCV^+ mice differs: while a similar decrease of CD4 T cell numbers, and increased proportion of Treg were observed during the first 3 weeks (Figure 4E, G–H) the come back to day 0 values did not occurred. A high proportion of Treg cells was maintained in the presence of allograft, which may prevent $CD4^+$ T-cell recovery.

Persistence of tolerance and Treg cells after depletion of CD25 T cells

In order to address directly if CD25 T cells are responsible of the tolerant state, we treated tolerant mice (on day 60 after B6 islet graft) with PC61 monoclonal antibody reported to induce depletion of CD25 T cells *in vivo*. Mice remained normoglycemic until day 74 where removal of the graft induces hyperglycemia (Figure 5A). The kinetics of Treg cells in blood before and after PC61 treatment (Figure 5B, C) revealed efficiency of PC61 to deplete CD25 T cells: the percentage of $CD25^+$ cells drops from 7% of CD4 cells before treatment to less than 0.2% of CD25 cells on day 7. Nevertheless, $Foxp3^+$ Tregs (6.8% before treatment) switched to a $Foxp3^+CD25^-$ cell phenotype representing 4% of CD4 cells on day 7. On day 14 reexpression of CD25 occurred; $Foxp3^+$ cells expressing CD25 or not could be observed at high frequencies in the spleen and even more in graft. Thus, although the PC61 treatment was efficient, depletion of Treg could not be achieved and tolerance was maintained.

Transient depletion of dividing T cells by hydroxyurea-induced tolerance

We also investigated whether the transient depletion of dividing cells obtained by an inhibitor of DNA replication, Hydroxyurea (HU), could also induce tolerance. All FVB mice treated with HU for 12 days at the time of B6 islet transplantation remained tolerant until at least day 54 (Figure 6 A, B). As for TK^+GCV^+ mice tolerance was also associated with a persistent decrease of percentages and numbers of CD4 splenic T cells (around 18% vs. 30% in naïve mice) and an increased proportion of $CD25^+Foxp3^+$ T cells in the spleen and the grafted islets (Figure 6C), reaching 20–25% compared to 12–13% upon delayed rejection of the graft on day 60.

Finally, we observed that islet grafted mice treated by transient depletion of dividing T cells involving either TK^+GCV^+ or HU treated mice, display particular relative numbers of CD4 and CD25 cells, distinct from unmanipulated mice, nontolerized mice experiencing rejection or TK^+GCV^+ nongrafted mice (Figure 6D).

Discussion

In this study, the induction of dominant tolerance to islet allografts was obtained through transitory depletion of dividing T cells at the time of transplantation, leading to emergence of Treg cells. Using self-vascularized islet grafts we confirm and extend our previous findings using surgically vascularized heart allografts (27). The different success rates for tolerance induction differed for self-vascularized heart or skin (0% tolerant, delayed rejection only) (28), islet allografts (63% tolerant), and vascularized heart (84% tolerant) (27,34). Of interest, percentage of tolerance correlate well with the frequency of T cells triggered to divide, depending on the nature of the graft. Indeed, Jones et al. reported that 14%, 19%, 44% of T cells have undergone at least one cell division 7 days after skin, islet and vascularized-heart allografts, respectively (35). Thus, allografts that induce a large number of T-cell divisions might be more easily tolerated following a dividing-T-cell depletion protocol, than allografts that induce a smaller number of divisions.

The initial clonal deletion of dividing T cells, including donor-specific T cells is of importance to decrease the size of the cytopathic T-cell compartment (27,28). Nevertheless, there is no long-term clonal deletion or anergy of effector T cells, nor generalized immunodeficiency and recent thymic emigrants can renew the T-cell compartment and donor-specific T cells. In long-term tolerant mice, although the total number of T lymphocytes was reduced by 30% compared to naïve mice, the immunocompetence was not qualitatively altered *in vivo* or *in vitro*. Thus, tolerant mice (i) rejected a third-party skin or islet allograft, (ii) maintained proliferative T-cell responses to mitogen, donor and third-party antigens, and (iii) maintained donor-specific cytotoxic activities and IFNγ production. The fact that *in vitro* assays of proliferation were done with constant numbers of splenic cells, containing 30% less T cells in TK^+GCV^+ mice, underlines that T-cell responses from tolerant mice are at least as efficient as those from naïve controls.

The dissociation between *in vitro* reactivity and *in vivo* tolerance, also called 'split tolerance', has been described in various models of tolerance and extensively discussed (36,37). *In vitro* reactivity is tested against hematopoeitic cells of donor haplotype, far for physiological conditions. This differs from the *in vivo* context, where the local concentration and activation of regulatory T cells in graft achieve tissue-specific control of graft rejection, as also previously reported (5,38). In B6-islet tolerant mice, the B6 skin graft survival was only prolonged (MST 31 days) as compared with third-party skin. Of note a similar prolongation of B6 skin graft survival (MST 39 days) was previously observed in TK^+GCV^+ mice (28). This suggests that the B6 islet allograft could induce a 'partial' tolerance to skin of the same $H\text{-}2^b$ haplotype, which is nevertheless per se difficult to tolerize in this model. However, the transfer of

splenocytes from B6 islet tolerant mice, while controlling B6 islet rejection in 40% of recipient mice, does not control B6 skin rejection, suggesting that tolerance is dominant, tissue specific and requires a minimal number of tissue specific Treg cells to be achieved (5).

As in other models (7,39–41), our findings suggest that the induction of tolerance requires 2 months to be fully and securely established. Mice displaying a delayed rejection, have increased percentages of $CD4^+CD25^+$ T cells similar to islets tolerant mice and rejected at a slower rate with progressive loss of graft function, suggesting that these cells may exert a partial control of graft-specific effector T cells. Efficient depletion of $CD25^+$ cells with PC61, did not abrogated tolerance nor induced complete elimination of $Foxp3^+$ Treg cells that transiently down-regulated $CD25^+$ expression in accordance with others (42). This suggests that $Foxp3^+CD25^-$ and perhaps others regulatory cells play a role in the maintenance of tolerance.

We demonstrate that the elimination of dividing T cells for 2 weeks induced a homeostatic imbalance in absolute cell numbers and relative sizes of effector/regulator T cell populations that favor Treg. In absence of graft it resulted in about a 36% decrease in the $CD4^+$-cell compartment size within 1 week (Figure 4 and (28)), which essentially reflects the natural T-cell renewal rate (43). At the same time, the proportion of $CD4^+CD25^+$ cells increased, resulting in Treg percentages and numbers that were two to three times higher. The increased numbers of Treg observed in spleen and LN during GCV treatment could be due to recirculation of Treg from other compartments including the gut. Also, Treg are resistant to apoptosis (44,45), which could render them poorly susceptible to depletion.

After cessation of GCV treatment, expansion or *de novo* generation of Treg may arise, encouraged by the space created by major T-cell depletion. The accumulation of Treg, peaking at 3 weeks, could result from nonspecific or donor-specific Treg selection/expansion because the process also occurs in the absence of an allograft. Of note, a transient T-cell depletion through apoptosis, initiated in normal individuals originally at steady state, is different from the context of preexistent lymphopenia, where homeostatic proliferation was suspected to induce autoimmunity (46) or to induce rejection via proliferation of memory cells (21). As observed here, homeostatic expansion of regulatory T cells can also take place during the lymphopenic phase of immuno-reconstitution in patients treated for autoimmunity (47), or after T cell depletion via anti-CD52 Ab and rapamycin inducing human renal transplantation tolerance (48).

After the third week, in nongrafted mice thymic export and homeostatic proliferation (Figure 4 and (43)) contributed to return T cell numbers to baseline, in less than 2 months. In contrast, the presence of the allograft precludes homeostasis recovery and allows for the persistence of elevated proportions of Treg. The presence of alloantigens might stimulates Treg—as revealed by their activated $CD62L^{lo}$ $CD44^{hi}$ phenotype—allowing their sustained presence in the spleen, LN and graft. In turn, these activated Treg seem to prevent the $CD4^+$ T-cell homeostatic recovery in accordance with the role of Treg in the control of T-cell homeostasis (49). Therefore, in long-term tolerant mice the numbers of $CD4^+$ T cells were maintained at values close to those at the lowest point of depletion.

Finally, an apoptosis has been implicated in the induction of transplantation tolerance (20,50,51) and may play a role in our model through massive apoptosis of T cells. The capture of apoptotic cells by dendritic cells in the absence of inflammation prevents their maturation (52), favoring the emergence of Treg (53,54). This is in accordance with the observation that inhibition of dendritic cell maturation by treatment with an active form of vitamin D3 leads to tolerance to both islet and vascularized heart allografts (15).

Depletion of dividing T cells avoids the drawbacks of other models (21, 55) since it decreases the size of the cytopathic donor alloreactive T-cell compartment, but it also targets dividing 'memory' T cells turning a typical '2 d set' rejection kinetics of a second skin allograft into a primary ones, using GCV in TK^+ recipient or HU treatment (29). Thus, this type of approach could be of interest to control rejection of allograft in naïve but also in allo-sensitized recipients.

Our study is the first to demonstrate that specific and transient depletion of dividing T cells at the time of transplantation is sufficient to alter the homeostatic balance between effector and regulatory T cells and to establish a dominant transferable tolerance to islet allografts. While pharmacogenetic T cell depletion would be difficult to implement in humans, it opens the way for using drugs that induce apoptosis of dividing T cells and mimic the effects of TK/GCV treatment. As shown here, Hydroxyurea is a potent candidate, since tolerance favoring Treg emergence was obtained. Thus, selective depletion of effector and memory cells but preservation of regulatory T cells due to differential division rates or resistance to apoptosis could open a way to manipulate T-cell immune responses *in vivo*.

Acknowledgments

We thank B Gouritin, M. Ripaux, E. Piccini, B.Clairé and C. Duros for technical help, I. Raymond and the NAC for breeding of transgenic mice, our colleagues for helpful discussions and Alfediam, Novo Nordisk, Bayer Diagnostics and Roche France for kindly providing some of the reagents used.

The authors have no conflicting financial interests. This work was granted by Etablissement Français des Greffes, Fondation pour la Recherche Médicale, Association Française contre les Myopathies, Académie Nationale de Médecine, Université Pierre et Marie Curie, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris.

References

1. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. Nat Rev Immunol 2003; 3: 199–210.
2. Waldmann H, Cobbold S. Exploiting tolerance processes in transplantation. Science 2004; 305: 209–212.
3. Walsh PT, Taylor DK, Turka LA. Tregs and transplantation tolerance. J Clin Invest 2004; 114: 1398–1403.
4. Salaun J, Corbel C, Le-Douarin NM. Regulatory T cells in the establishment and maintenance of self-tolerance: Role of the thymic epithelium. Int J Dev Biol 2005; 49: 137–142.
5. Modigliani Y, Thomas-Vaslin V, Bandeira A et al. Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 7555–7559.
6. Le Douarin N, Corbel C, Bandeira A et al. Evidence for a thymus-dependent form of tolerance that is not based on elimination or anergy of reactive T cells. Immunol Rev 1996; 149: 35–53.
7. Graca L, Honey K, Adams E et al. Cutting edge: Anti-CD154 therapeutic antibodies induce infectious transplantation tolerance. J Immunol 2000; 165: 4783–4786.
8. Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. J Exp Med 2001; 193: 1311–1318.
9. Nicolls MR, Coulombe M, Beilke J et al. CD4-dependent generation of dominant transplantation tolerance induced by simultaneous perturbation of CD154 and LFA-1 pathways. J Immunol 2002; 169: 4831–4839.
10. Adler SH, Turka LA. Immunotherapy as a means to induce transplantation tolerance. Curr Opin Immunol 2002; 14: 660–665.
11. Cobbold SP, Castejon R, Adams E et al. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. J Immunol 2004; 172: 6003–6010.
12. Sawitzki B, Lehmann M, Ritter T et al. Regulatory tolerance-mediating T cells in transplantation tolerance. Transplant Proc 2001; 33: 2092–2093.
13. Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. J Exp Med 2002; 195: 1641–1646.
14. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR et al. CD25+CD4 +regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. J Immunol 2002; 168: 1080–1086.
15. Adorini L, Penna G, Giarratana N et al. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. J Cell Biochem 2003; 88: 227–233.
16. Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K et al. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. Trends Immunol 2001; 22: 394–400.
17. Ochando JC, Homma C, Yang Y et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. Nat Immunol 2006; 7: 652–662.
18. Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Sho M et al. Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. Immunity 2003; 19: 503–514.
19. Akl A, Luo S, Wood KJ. Induction of transplantation tolerance-the potential of regulatory T cells. Transpl Immunol 2005; 14: 225–230.
20. Li XC, Strom TB, Turka LA, Wells AD. T cell death and transplantation tolerance. Immunity 2001; 14: 407–416.
21. Wu Z, Bensinger SJ, Zhang J et al. Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. Nat Med 2004; 10: 87–92.
22. Cohen JL, Boyer O, Salomon B et al. Prevention of graft-versus-host disease in mice using a suicide gene expressed in T lymphocytes. Blood 1997; 89: 4636–4645.
23. Cohen JL, Boyer O, Klatzmann D. Would suicide gene therapy solve the T-cell dilemma of allogeneic bone marrow transplantation? Immunol Today 1999; 20: 172–176.
24. Cohen JL, Boyer O, Thomas-Vaslin V et al. Suicide gene-mediated modulation of graft-versus-host disease [In Process Citation]. Leuk Lymphoma 1999; 34: 473–480.
25. Cohen JL, Saron MF, Boyer O et al.Preservation of graft-versus-infection effects after suicide gene therapy for prevention of graft-versus-host disease. Hum Gene Ther 2000; 11: 2473–2481.
26. Boyer O, Cohen JL, Bellier B et al. Transient control of a virus-induced immunopathology by genetic immunosuppression. Gene Ther 2000; 7: 1536–1542.
27. Braunberger E, Cohen JL, Boyer O et al. T-Cell suicide gene therapy for organ transplantation: Induction of long-lasting tolerance to allogeneic heart without generalized immunosuppression. Mol Ther 2000; 2: 596–601.
28. Thomas-Vaslin V, Bellier B, Cohen JL et al. Prolonged allograft survival through conditional and specific ablation of alloreactive T cells expressing a suicide gene [see comments]. Transplantation 2000; 69: 2154–2161.
29. Bellier B, Thomas-Vaslin V, Saron MF et al. Turning immunological memory into amnesia by depletion of dividing T cells. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 15017–15022.
30. Boyer O, Zhao JC, Cohen J et al.Position-dependent variegation of a CD4 minigene with targeted expression to mature CD4+ T cells. J Immunol 1997; 159: 3383–3390.
31. Barrou B, Bertry-Coussot L, Morin S et al. Prolonged islet allograft survival by adenovirus-mediated transfer of sICAM-1/Ig immunoadhesin gene. Hum Gene Ther 2002; 13: 1441–1450.
32. Thomas-Vaslin V, Damotte D, Coltey M et al. Abnormal T cell selection on nod thymic epithelium is sufficient to induce autoimmune manifestations in C57 BL/6 athymic nude mice. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 4598–4603.
33. Yoshimura R, Chargui J, Aitouche A et al. Induction of hyperacute rejection of skin allografts by CD8+ lymphocytes. Transplantation 2000; 69: 1452–1457.
34. Braunberger E, Raynal-Raschilas N, Thomas-Vaslin V et al. Tolerance induced without immunosuppression in a T-lymphocyte suicide-gene therapy cardiac allograft model in mice. J Thorac Cardiovasc Surg 2000; 119: 46–51.
35. Jones ND, Turvey SE, Van Maurik A et al. Differential susceptibility of heart, skin, and Islet allografts to T cell-mediated rejection. J Immunol 2001; 166: 2824–2830.
36. Mohler KM, Streilein JW. Tolerance to class II major histocompatibility complex molecules is maintained in the presence of endogenous interleukin-2-producing, tolerogen-specific T lymphocytes. J. Immunol. 1987; 139: 2211–2219.
37. Thomas-Vaslin V, Salaun J, Gajdos B et al. Thymic epithelium induces full tolerance to skin and heart but not to B lymphocyte grafts. Eur J Immunol 1995; 25: 438–445.
38. Modigliani Y, Pereira P, Thomas-Vaslin V et al. Regulatory T cells in thymic epithelium-induced tolerance. I. Suppression of mature peripheral non-tolerant T cells. Eur J Immunol 1995; 25: 2563–2571.
39. Modigliani Y, Coutinho A, Pereira P et al. Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymic epithelium. Eur J Immunol 1996; 26: 1807–1815.
40. Onodera K, Lehmann M, Akalin E et al. Induction of "infectious" tolerance to MHC-incompatible cardiac allografts in CD4 monoclonal antibody-treated sensitized rat recipients. J Immunol 1996; 157: 1944–1950.
41. Saborio DV, Chowdhury NC, Hardy MA et al. Maintenance of acquired thymic tolerance to rat islet allografts by regulatory/suppressor T cells. Transplant Proc 1999; 31: 897.

42. Couper KN, Blount DG, de Souza JB et al. Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3+ regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice. J Immunol 2007; 178: 4136–4146.
43. Thomas-Vaslin V, Khortals-Altes H, De Boer R, Klatzmann D. Comprehensive assessment and mathematical modeling of T-cell population dynamics and homeostasis. J Immunol 2008; 180: 2240–2250.
44. Banz A, Pontoux C, Papiernik M. Modulation of Fas-dependent apoptosis: A dynamic process controlling both the persistence and death of CD4 regulatory T cells and effector T cells. J Immunol 2002; 169: 750–757.
45. Minamimura K, Gao W, Maki T. CD4 +regulatory T Cells are spared from deletion by antilymphocyte serum, a polyclonal anti-T cell antibody. J Immunol 2006; 176: 4125–4132.
46. King C, Ilic A, Koelsch K, Sarvetnick N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. Cell 2004; 117: 265–277.
47. de Kleer I, Vastert B, Klein M et al. Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self-tolerance by reprogramming autoreactive T cells and restoring the CD4+CD25+ immune regulatory network. Blood 2006; 107: 1696–1702.
48. Noris M, Casiraghi F, Todeschini M et al. Regulatory T cells and T cell depletion: Role of immunosuppressive drugs. J Am Soc Nephrol 2007; 18: 1007–1018.
49. Almeida AR, Legrand N, Papiernik M et al. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. J Immunol 2002; 169:4850–4860.
50. Li XC, Wells AD, Strom TB et al.The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance. Curr Opin Immunol 2000; 12: 522–527.
51. Liu K, Iyoda T, Saternus M et al. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. J Exp Med 2002; 196: 1091–1097.
52. Steinman RM, Turley S, Mellman I et al. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. J Exp Med 2000; 191: 411–416.
53. Maeda A, Schwarz A, Kernebeck K et al. Intravenous infusion of syngeneic apoptotic cells by photopheresis induces antigen-specific regulatory T cells. J Immunol 2005; 174: 5968–5976.
54. Wang Z, Larregina AT, Shufesky WJ et al. Use of the inhibitory effect of apoptotic cells on dendritic cells for graft survival via T-cell deletion and regulatory T cells. Am J Transplant 2006; 6: 1297–1311.
55. Neujahr DC, Chen C, Huang X et al. Accelerated memory cell homeostasis during T cell depletion and approaches to overcome it. J Immunol 2006; 176: 4632–4639.

4.3 Données supplémentaires non publiées

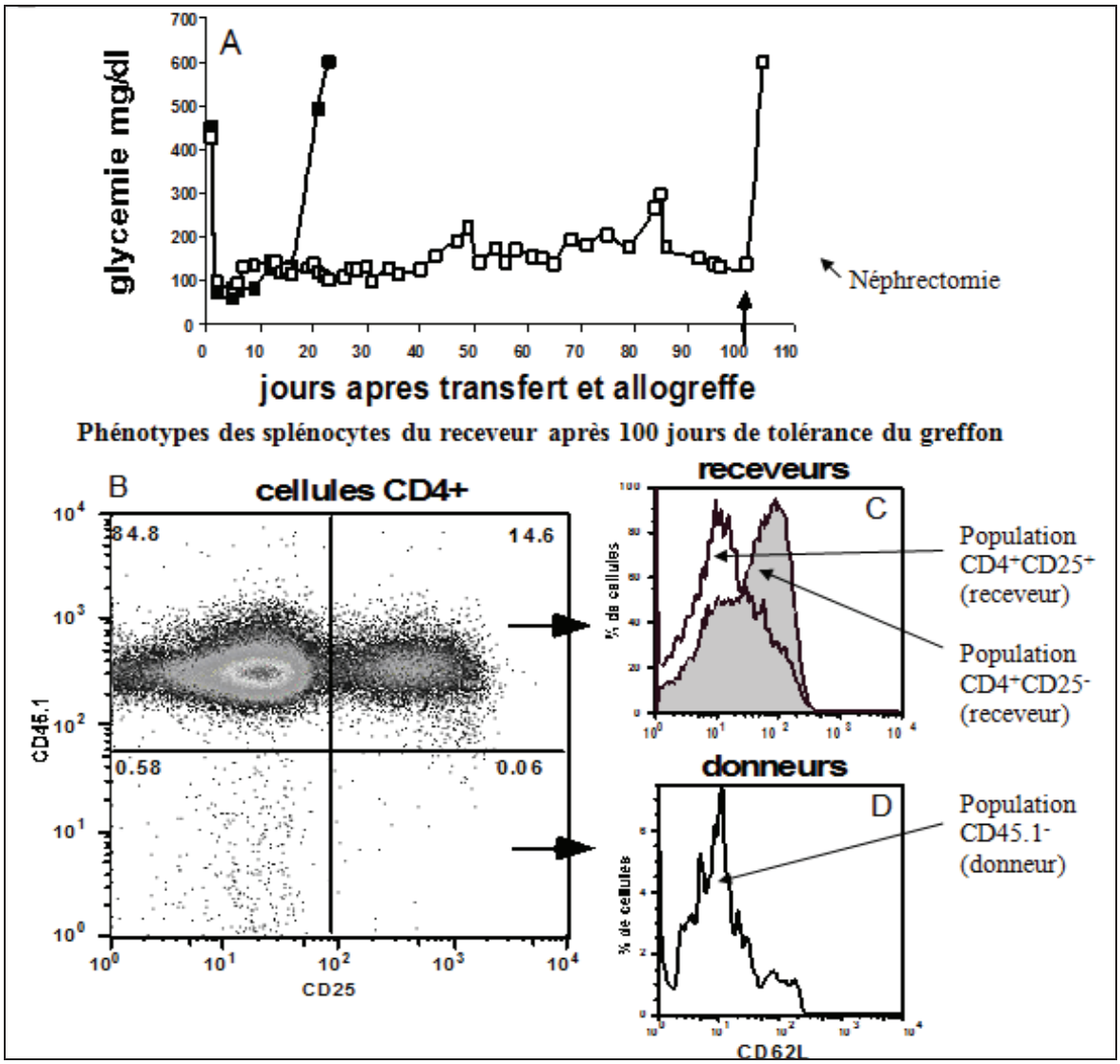


Figure 30 : Transfert de tolérance par l'intermédiaire des cellules spléniques CD25$^-$.

Splénocytes provenant de souris TK$^+$ C57BL/6 (CD45.2) tolérantes aux îlots BALB/c au jour 96 après la greffe, déplétées en cellules CD25$^+$ et transférés chez une souris C57BL/6 (CD45.1) diabétique irradiée ayant été greffée au même moment avec des îlots BALB/c. (A) : courbe de glycémie de l'animal receveur du transfert de tolérance (carré blanc) comparé à l'animal contrôle sans transfert de cellules (carré noir). (B) : marquage CD25$^+$/CD45.1 mesurant le chimérisme (cellules du receveur/cellules du donneur) dans la population CD4$^+$ du receveur au 100ème jour après greffe. (C) : expression de CD62L chez le receveur dans la population cellulaire CD45.1$^+$ CD4$^+$ CD25$^-$ (courbe pleine grise, 62% CD62L$^+$) ou CD45.1$^+$ CD4$^+$ CD25$^+$ (courbe vide, 30% CD62L$^+$), et (D) expression de CD62L dans la population CD4$^+$ CD45.1$^-$ (cellules du donneur).

L'objectif était de savoir si un transfert de tolérance est réalisable à partir de cellules spléniques contenant ou non des T régulateurs $CD4^+CD25^+$ "tolérantes". Conjointement à une allogreffe d'îlots BALB/c, nous avons donc réalisé un transfert de tolérance avec des splénocytes d'une souris TK^+ C57BL/6 Lignée 2 (CD45.2) tolérante aux îlots BALB/c, chez 2 souris congéniques C57BL/6 (CD45.1) diabétiques irradiées. Afin de caractériser le rôle des cellules T $CD4^+CD25^+$ dans l'induction de tolérance immunitaire, des fractions de $8x10^6$ splénocytes $CD25^+$ ou $CD25^-$ (pureté de 99.95%) ont été transférées. Chez les souris contrôles irradiées sans transfert de cellules spléniques, l'allogreffe est rejetée dans les 20 jours après la transplantation. La souris ayant reçu les splénocytes $CD25^+$ est décédée 8 jours après la greffe suite à un échec technique ne permettant pas de conclure. La souris receveuse des splénocytes $CD25^-$ a toléré le greffon au-delà de 100 jours après transplantation (vérification par ablation du greffon) (Figure 30A). Au vu de ces résultats les lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ ne paraissent pas essentiels dans la réussite d'un transfert de tolérance, car les cellules spléniques $CD25^-$ sont capables de répondre à cet objectif. Ces données pourraient ainsi suggérer l'existence de cellules immunosuppressives $CD25^-$. Malheureusement, nous n'avons pas pu reproduire les expériences des transferts des cellules $CD25^+$ et $CD25^-$.

Les splénocytes de l'animal receveur tolérant ont été isolés au $100^{ème}$ jour après la greffe. Curieusement, chez la souris receveuse tolérante moins de 1% des splénocytes lymphocytes T sont des cellules issues du donneur $CD45.1^-$ (Figure 30B). Chez cet animal tolérant les cellules $CD45.1^+$ $CD25^+$ représentent 14,6 % des cellules T $CD4^+$ (comparé à 3.6 % chez l'animal contrôle). Dans la population $CD45.1^+$ 62% des cellules $CD4^+CD25^-$ expriment le marqueur CD62L (courbe grise), alors que seulement 30% des cellules $CD4^+CD25^+$ expriment le marqueur CD62L (courbe vide blanche) (Figure 30C). Dans la population $CD45.1^-$ ou $CD45.2^+$ (cellules du donneur), 14% des cellules $CD4^+$ expriment le marqueur CD62L (Figure 30D). Ces résultats suggèrent que les cellules $CD25^-$ tolérantes à des alloantigènes donnés peuvent transférer la tolérance chez un autre animal allogreffé avec les mêmes alloantigènes. La présence de moins de 1% des cellules du donneur chez le receveur 100 jours après le transfert, suggère que les cellules du donneur ne contrôlent pas l'état de tolérance au long terme, mais que cette capacité à tolérer l'alloantigène est transmise ou acquise par les cellules du receveur. Les cellules $CD4^+CD25^-$ du receveur sont en majorité $CD62L^+$, alors que les cellules $CD4^+CD25^+$ du donneur comme du receveur ont perdus une partie de leur expression du CD62L. Les cellules T régulatrices activées de l'hôte ($CD4^+CD25^+CD62L^-$) jouent probablement un rôle important dans le maintien de la tolérance immunitaire. Ces résultats montrent que la tolérance induite est dominante et infectieuse.

4.4 Synthèse:

L'induction de tolérance immunitaire vis à vis du transplant est la solution idéale dans la prévention des rejets aigus et chroniques des greffons. Dans cette étude nous avons évalué et caractérisé la possibilité d'induire un état de tolérance immunitaire vis-à-vis d'une allogreffe d'îlots pancréatiques dans un modèle murin. L'objectif étant de parvenir à instaurer un état de tolérance périphérique par déplétion transitoire des lymphocytes T alloréactifs.

La déplétion des lymphocytes T en division a été induite au moment de l'allotransplantation, par administration durant 14 jours de Ganciclovir (GCV) chez une souris diabétique exprimant le transgène de la thymidine kinase (TK) au sein de la population lymphocytaire T. Sous l'action de la thymidine kinase du virus HSV-1, le GCV devient un analogue nucléotidique et de ce fait inhibe l'élongation de l'ADN des cellules activées en division, conduisant à l'apoptose cellulaire.

Dans notre étude 63% des animaux traités ont développé une tolérance immunitaire. Nos résultats montrent que cette tolérance périphérique n'est pas due à une immunosuppression globale, ni à une anergie ou délétion persistante des lymphocytes T mais bien à une tolérance dominante. Les animaux tolérants conservent toutes leurs capacités immunocompétentes. Nos travaux ont également montré que cette tolérance peut être dominante et infectieuse, car celle-ci peut être transférée, via les splénocytes, chez un animal naïf receveur d'allogreffe d'îlots. Ce modèle a mis en évidence une perturbation des populations de cellules immunitaires circulantes et infiltrant le greffon. En effet, chez les animaux traités, nous avons constaté une augmentation significative de la population de lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (au détriment de la population T CD4+ totale). L'objectif clinique est d'aboutir à une telle tolérance immunitaire via un traitement transitoire à l'aide d'un mécanisme plus "abordable", telle que l'injection d'une drogue inhibant la néo-synthèse d'ADN des cellules en division. Nos travaux ont montré que ces résultats peuvent être reproduits chez la souris grâce à un traitement durant 14 jours à l'hydroxurée.

Cette déplétion transitoire a permit d'aboutir à une immunotolérance dominante et persistante maintenue par la perturbation de la balance homéostasique. L'émergence d'une population régulatrice au détriment de la poulation T effectrice, semble être une nouvelle perspective susceptible de répondre à des besoins essentiels pour la survie des allogreffes.

DISCUSSION

Au moment de la transplantation, les lésions du greffon, induites par la séquence d'ischémie/reperfusion, vont directement concourir aux désordres de l'intégrité tissulaire et donc à la reprise de fonction du greffon. Les perturbations métaboliques, conséquentes à l'ischémie et à la conservation à froid, vont être à l'origine d'une perte d'ATP, d'une acidose, d'un déséquilibre ionique, d'un œdème cellulaire, et d'une cytolyse pouvant conduire à l'apoptose et à la nécrose cellulaire. Ces réactions en chaînes ainsi que le phénomène de "no-reflow" vont contribuer à la réduction, voire à la perte de fonction des greffons. Parallèlement ces lésions d'ischémie/reperfusion vont augmenter l'immunogénicité du greffon (indépendante de l'alloantigène), notamment liée aux "signaux de danger" relargués par le greffon. Ces signaux sont notamment les molécules DAMPs, les chimiokines, les cytokines pro-inflammatoires ainsi que les débris cellulaires du greffon (conséquents à la nécrose et l'apoptose) qui vont être internalisés par les CPA. En réponse aux stimuli transmis par ces signaux, les CPA du receveur peuvent s'activer et participer à la voie de l'alloreconnaissance directe. En réponse à ces mêmes stimuli, les cellules dendritiques résidentes ou leucocytes passagers du donneur vont s'activer puis migrer vers les régions T des organes lymphoïdes du receveur et participer également à la voie de l'alloreconnaissance directe. Les cellules T naïves alloréactives vont alors être stimulées, devenir des effecteurs et migrer dans le greffon. De plus, les lésions d'ischémie/reperfusion participent à la surexpression des molécules du CMH à la surface des cellules du greffon. Ceci va conduire à l'augmentation de l'immunogénicité du greffon perceptible par les lymphocytes T alloréactifs du receveur. En parallèle, les dommages de l'I/R vont activer l'endothélium et donc favoriser l'adhésion et l'infiltration des leucocytes. Au sein du greffon, ces cellules vont déclencher la formation de lésions soit de manière cytotoxique directe soit à travers la sécrétion de molécules pro-inflammatoires. Ces cellules vont également aider à amplifier et maintenir la réponse immunitaire T adaptative. L'ensemble de ces processus provoquera ainsi l'inévitable rejet d'allogreffe, et participera aux dysfonctions chroniques du greffon.

Il est donc nécessaire d'agir sur plusieurs fronts durant la séquence d'I/R:

- dans un premier temps, réduire les lésions de conservation et limiter l'altération de l'intégrité du greffon.

- dans un deuxième temps, réduire l'immunogénicité du greffon et l'apparition de signaux danger.

- puis, dans un troisième temps, contrôler le rejet d'allogreffe tout en maintenant le receveur immunocompétent.

1 Préservation de l'intégrité du greffon (Partie I)

1.1 Interet de la solution SCOT et des PEG en conservation

La préservation du greffon est une étape critique dans le processus de transplantation. La qualité de préservation des capacités métaboliques de l'organe va conditionner le devenir du transplant à court et moyen terme. Il est désormais établi que les lésions de conservation sont corrélées à un retard de reprise de fonction et à des pertes de fonction au long terme [Perico N.2004] [Jamieson RW.2008]. La solution de préservation des greffons doit donc répondre aux problèmes déclenchés par la séquence d'ischémie et d'hypothermie, sources de désordres métaboliques majeurs [Hauet T.2008] [t Hart NA.2002]. Nos travaux ont donc porté sur l'évaluation d'une nouvelle solution de conservation contenant des PEG : la solution SCOT. Cette solution fut le fruit de réflexions menées au début des années 90, sur la composition idéale du milieu de préservation des greffons. Historiquement, les solutions étaient de composition hyperpotassique, comme le milieu intracellulaire, avec pour objectif de limiter l'entrée d'eau et de sodium dans la cellule. Cependant, ce type de composition est propice à une dépolarisation et donc à une intense activité des pompes ioniques membranaires afin de rétablir l'équilibre physiologique. Ce phénomène entraîne une déplétion en ATP, une acidose tissulaire et un œdème cellulaire perturbant de façon irréversible l'intégrité tissulaire. La solution SCOT de type extracellulaire limite ainsi ces effets et, de par sa composition en PEG, est une solution innovante. Une majorité de solutions de conservation existantes présentaient le désavantage, soit de ne pas posséder de colloïde, soit de contenir un colloïde néphrotoxique tel que l'HES. De ce fait les PEG représentent une alternative séduisante à l'utilisation d'imperméants efficaces uniquement sur de courtes périodes de conservation ou de macromolécules toxiques d'origine biologique [Hauet T.2008] [Eugene M.2004]. Sur la base des travaux de T Hauet et M Eugène, notre première hypothèse suggérait que l'utilisation d'une solution de type extracellulaire contenant des PEG 20kDa à 30g/L permettrait d'améliorer la préservation du métabolisme cellulaire et l'intégrité du greffon d'îlots pancréatiques. Sur la base des travaux de Wicomb et Collins [Wicomb WN.1990], notre seconde hypothèse suggérait que l'utilisation de PEG 20kDa permettrait d'allonger la durée de survie des allogreffes via un effet immunoprotecteur non clairement défini.

Pour répondre à ces hypothèses nous avons utilisé un modèle murin d'isolement et de greffe d'îlots de Langerhans. Actuellement, en clinique, la réussite de la greffe d'îlots de Langerhans est encore perturbée par le faible rendement d'îlots fonctionnels obtenus à la fin de l'isolement et par les phénomènes inflammatoires agissant sur la perte de fonction et la durée de survie le greffon. L'utilisation de ce modèle présente donc plusieurs avantages :

- Il offre la possibilité de répondre aux problèmes rencontrés au cours de l'obtention des îlots. En effet la technique d'isolement est délétère pour la viabilité cellulaire, puisque reconnue pour ne conserver qu'environ 40% à 50% de la masse d'îlots. De ce fait les travaux sur la préservation cellulaire sont nécessaires et constituent une priorité.
- Il constitue une évaluation simple des bénéfices de la conservation sur la fonctionnalité du greffon. En effet, les îlots sont simples à cultiver, permettantt une évaluation *ex vivo* du métabolisme très accessible (masse d'îlots obtenus, viabilité cellulaire, conservation du pouvoir insulinosécréteur…) comparé à un organe entier.
- C'est un des rares modèles de transplantation réalisables chez la souris.

Les intérêts de ce modèle et les limites de la technique d'isolement ainsi que de la transplantation d'îlots pancréatiques nous ont donc conduits à l'utiliser afin d'étudier les effets de la solution de préservation SCOT contenant des PEG 20kDa.

1.2 Interet de la solution SCOT dans notre modèle d'îlots

Nos résultats montrent que la masse d'îlots de Langerhans (IEQ/pancréas) obtenus après isolement avec la solution SCOT est significativement supérieure à celles obtenues avec les solutions HBSS + 0,5% BSA, UW et CMRL-1066 + 1% BSA, IGL-1 ou Celsior. En fin d'isolement comme après 20h de culture des îlots, l'utilisation de la solution SCOT + PEG 20kDa est corrélée à une meilleure viabilité cellulaire et à une meilleure préservation de l'intégrité cellulaire et des capacités insulinosécrétrice des îlots après stimulation au glucose. Cette amélioration de la conservation du greffon conditionne la reprise de fonction des îlots. En effet, dans le groupe des souris isogreffées avec des îlots isolés avec HBSS + 0,5% BSA, on observe 28% de NFP alors que dans le groupe d'isogreffes d'îlots isolés avec SCOT, il n'y a aucune NFP ($p<0.001$). Ces résultats sont identiques pour les conditions d'allogreffes dans lesquelles seule la solution SCOT permet une reprise de fonction immédiate des greffons contrairement aux solutions UW, HBSS + 0,5% BSA, CMRL-1066 + 1% BSA et

SCOT sans PEG. Ceci suggère que la préservation de l'intégrité des îlots est liée à l'effet colloïde car, tout comme les échecs de reprise de fonction, la masse d'îlots obtenue avec la solution SCOT sans PEG est significativement inférieure au rendement obtenu en présence des PEG. Ces données confirment la nécessité des colloïdes dans la composition des solutions de conservation. En accord avec les données obtenues par l'équipe de Thierry Hauet dans des modèles d'I/R de rein [Hauet T.2002] [Hauet T.2000] [Faure JP.2002] [Eugene M.1997], de cœur [Bauza G.1996b], de foie [Gibelin H.2002] ou de poumon [Jayle C.2002] [Jayle C.2003], nos données [Giraud S.2007] prouvent que l'utilisation de solutions de type extracellulaire contenant des PEG de haut poids moléculaire nécessite un plus grand intérêt que les solutions de conservation standards.

1.3 Autres solutions contenant des PEG

Aujourd'hui, il existe d'autres solutions contenant des PEG, comme IGL-1 (Institut Georges Lopez-1) et Polysol. Cependant ces autres solutions ne sont pas véritablement de type extracellulaire car elles contiennent des taux de potassium K^+ supérieurs à 5mM.

1.3.1 IGL-1

La solution IGL-1 contient 30 mM de K^+ et 1g/L de PEG 35 kDa. Cette solution a montré plusieurs effets bénéfiques en transplantation d'organes et de tissus. Initialement le remplacement de l'HES dans l'UW par les PEG 35 kDa 1g/L a permis de réduire l'agrégation des globules rouges après un lavage à 4°C de l'organe, corrigeant ainsi l'une des failles de l'UW [Mosbah IB.2006]. L'utilisation de l'IGL-1 comme solution de conservation rénale en hypothermie a permis, après autotransplantation de rein de porc, de diminuer de façon significative l'expression des molécules du CMH de classe II ainsi que l'apoptose cellulaire [Badet L.2005]. Cette solution est maintenant utilisée en pratique clinique. En 2009, le rapport de la première étude multicentrique évaluant la solution IGL-1 en transplantation rénale a été publié, et les données ont montré des niveaux plus bas de créatinine sérique au cours des 12 premiers mois de suivi dans le groupe IGL-1 [Codas R.2009]. De plus, des différences significatives des taux de rejet ainsi que des taux de survie du greffon ont été constatées entre les groupes UW et IGL-1 [Codas R.2009]. En 2011, les résultats issus d'une cohorte européenne de transplantation hépatique ont montré que les greffons hépatiques partiels préservés avec IGL-1 (n=59) présentaient un meilleur taux de survie que ceux conservés avec l'UW (n=1308) : 90 versus 75% à 1 an et 86 versus 69% à 3 ans [Adam

R.2011]. Le réseau GRAGIL a publié une analyse rétrospective de données cliniques obtenues à partir de pancréas rincés puis conservés avec les solutions UW, Celsior et IGL-1. Les résultats très préliminaires publiés en 2005 montraient une supériorité (cependant non significative) de la solution IGL-1 sur le nombre d'ilots obtenus et sur le taux d'isolement aboutissant à une transplantation [Wojtusciszyn A.2005]. En 2012, sur une plus ample cohorte, leur analyse a montré que les critères de fonctionnalité des greffons d'îlots obtenus à partir des pancréas conservés avec la solution IGL-1 étaient équivalents aux résultats obtenus avec UW ou Celsior [Niclauss N.2011].

1.3.2 Polysol

La solution Polysol développée au milieu des années 2000 [Bessems M.2005] contient 15 mM de K^+ et 20 g/L de PEG 35 kDa. Cette solution a été conçue pour la préservation hypothermique. Elle contient une soixantaine de composés suseptibles de répondre aux variations de pH et aux divers besoins métaboliques de la cellule, ainsi que des antioxydants et des substrats énergétiques. Dans un modèle porcin de conservation rénal, l'intégrité tissulaire fut mieux préservé avec la solution Polysol comparé aux solutions UW et HTK [Schreinemachers MC.2009b]. Dans ce même modèle, la solution Polysol a également permis d'améliorer les premièrs paramètres de reperfusion, tels que le débit sanguin et l'oxygénation tissulaire [Schreinemachers MC.2009b]. Dans ce même modèle la solution Polysol a permis de réduire les lésions d'œdème, de nécrose tubulaire et d'inflammation suite à une séquence d'ischémie comparé à des organes conservés avec la solution HTK [Schreinemachers MC.2009a]. La conservation hypothermique avec cette solution a permis une meilleure conservation de l'intégrité et de la fonctionnalité des foie stéatosiques de rat [Hata K.2007]. Elle a aussi permis d'obtenir des résultats similaires dans un modèle de greffon hépatique partiels [Yagi S.2011].

1.4 PEG et préservation de l'intégrité du greffon

Ces effets bénéfiques des PEG sur la préservation de l'intégrité cellulaire, pourraient être expliqués par plusieurs phénomènes :

- Le rôle oncotique du PEG 20 kDa limiterait l'œdème cellulaire.
- Le PEG pourrait jouer un rôle important dans la stabilisation de la membrane et du cytosquelette cellulaire à 4°C, préservant ainsi l'architecture de la cellule.

Ces hypothèses s'appuyent sur les données suivantes : en 1995, les travaux de Stefanovich ont montré que la conservation d'hépatocytes de rat avec des PEG 8 kDa à 25 g/L a permis le maintien de l'organisation cortical des microfilaments d'actine et la structure des fibres du cytosquelette de la cellule [Stefanovich P.1995]. Ces résultats ont montré que, en comparaison avec de l'HES, un traitement durant 24h à 4°C avec ces PEG permettait de nettement réduire la formation de précipités de F-Actine et de microtubules [Stefanovich P.1995]. Puis, en 1999, les travaux de Davies ont montré que la cryopréservation de veines jugulaire de lapin en présence de PEG 20kDa à 100g/L permettait de conserver l'architecture tissulaire [Davies MG.1999]. Dans ce modèle la présence de PEG de haut poids moléculaire a conduit à une nette réduction de l'hyperplasie de l'intima vasculaire liée aux effets de la cryopréservation. Cette conservation de l'intégrité tissulaire a ainsi permis de significativement réduire l'adhérence des plaquettes, des granulocytes et des monocytes/macrophages à la surface de l'endothélium [Davies MG.1999]. De plus, les travaux de Deible en 1998 suggéraient déjà un rôle protecteur des PEG sur le glycocalyx des cellules vasculaires, limitant ainsi la fixation des plaquettes sur la paroi endothéliales [Deible CR.1998].

L'interaction des PEG avec les glycérophospholipides de la membrane cellulaire pourrait être une justification du pouvoir cyto-protecteur des PEG. Effectivement, *in vitro*, à 4°C les PEG de haut poids moléculaire stabilisent les lipides membranaires [Dutheil D.2009]. Une étude antérieure avait déjà suggéré que les PEG interagissaient avec les lipides membranaires permettant de les stabiliser [Ohno H.1981].

En 2009 les travaux de Chiang ont apporté un important éclaircissement sur le rôle des PEG de haut poids moléculaire dans la stabilisation de l'architecture tissulaire [Chiang ET.2009]. Ces travaux ont montré que la présence de PEG 15 à 20 kDa permettait une importante stabilisation des jonctions entre les cellules endothéliales *in vitro*. Cette préservation des jonctions intercellulaires fut mesurée par la résistance à une onde électrique trans-endothéliale diffusée par des microélectrodes sur lesquelles les cellules étaient cultivées. Les résultats ont montré que les résistances étaient élevées pour des cellules cultivées en présence des PEG, témoignant de la non-perméabilité paracellulaire. A l'inverse, cette résistance n'augmentait pas sur un tapis cellulaire cultivé sans PEG traduisant ainsi d'une perméabilité paracellulaire et donc de la perte des jonctions entre les cellules. Cette résistance était nettement augmentée pour des PEG inférieure à 80 g/L mais pas pour des PEG supérieurs à 90 g/L. En effet, ces travsux ont montré que l'addition de PEG 20 kDa à 80 g/L

augmente la densité des VE-Cadhérines à la jonction entre les cellules endothéliales. Ces données corrèlent avec les observations de Chiang, qui montrent qu'après un temps croissant d'exposition aux PEG, un réarrangement du cytosquelette est observé en faveur d'une structure cellulaire plus organisée [Chiang ET.2009]. En 2012 les travaux de Oltean ont confirmé ces données. En effet l'ajout de PEG dans la lumière intestinale durant plusieurs heures a permis de renforcer les jonctions intercellulaires et notamment la présence des molécules de liaisons telles que ZO-1 (zonula occludens-1) et claudine-3, permettant de maintenir la non-perméabilité de la paroi tissulaire [Oltean M.2012].

Des travaux d'une équipe parisienne avaient démontré que la cryoconservation des îlots de Langerhans porcins avec des PEG 20kDa à 30g/L avait permis, au moment de la décongélation puis durant 21 jours de culture, une nette amélioration de la préservation de la fonction insulinosécrétrice, semblable à des îlots frais [Monroy B.1997]. Dans ce cas, les PEG avaient pour rôle de stabiliser la membrane cellulaire afin d'éviter les "ruptures" dues au choc thermique.

Cette préservation du cytosquelette cellulaire, est un fait majeur dans la conservation de l'intégrité cellulaire, tissulaire et le maintien de la barrière endothéliale [Chiang ET.2009]. La perturbation de la structure membranaire de l'endothélium induit des lésions de coagulation, d'inflammation et de détachement cellulaire qui peuvent aboutir à d'importants désordres tissulaires [Perico N.2004] [Bogatcheva NV.2008]. La présence des PEG à la membrane endothéliale réduit ainsi la fixation des plaquettes et l'activation des voies intracellulaires médiées par la thrombine [Chiang ET.2009], rôle important dans la prévention de certaines complications post-greffe comme l'IBMIR (instant blood mediated inflammatory reaction).

Ces capacités des PEG à protéger le glycocalyx ainsi que l'intégrité cellulaire et tissulaire pourraient naturellement faire le lien avec les effets immunoprotecteur des PEG de haut poids moléculaire. La préservation du glycocalyx à la surface membranaire est un élément clé dans la prévention des lésions d'I/R [Reitsma S.2007] [VanTeeffelen JW.2008] [Platts SH.2003] et notamment du syndrome inflammatoire [Mulivor AW.2004] [Chappell D.2012].

2 Effets immunoprotecteurs de la solution SCOT

2.1 PEG et immunoprotection

Les premiers travaux en transplantation clinique ayant suggéré l'effet immunoprotecteur des PEG de haut poids moléculaire ont été publiés dans le Lancet en 1991 par l'équipe de Wicomb et Collins [Collins GM.1991]. Depuis d'autres travaux ont confirmé les bénéfices des PEG sur la diminution des lésions d'inflammation post reperfusion. Cependant, aucune étude n'a caractérisé le caractère immunoprotecteur des PEG 20 kDa (non réactifs) dans des conditions de transplantation d'îlots pancréatiques.

2.2 PEG et immunoprotection dans notre modèle d'îlots

Dans notre étude, nous avons réalisé des expériences afin de comprendre le potentiel immunoprotecteur des PEG 20kDa. Pour cela, nous avons évalué les capacités immunomasquantes des PEG via la détection des molécules de CMH de classe I à la surface des cellules β par cytométrie en flux et à la surface des îlots de Langerhans par immunofluorescence. Nous avons constaté un immunomasquage d'environ 89% des molécules du CMH à la surface cellulaire lorsque les îlots sont préparés avec la solution SCOT et cultivés en présence de PEG 20 kDa (30 g/L), alors que plus de 99% des molécules sont détectées à la surface des cellules préparées sans PEG. L'évaluation des capacités d'alloreconnaissance antigénique dans un contexte de coculture de splénocytes + îlots préparés avec ou sans PEG, a montré une prolifération des cellules T significativement plus importante en présence des îlots préparés sans PEG ($p<0,01$). L'utilisation de notre modèle d'allogreffe d'îlots de Langerhans murin chez la souris diabétique nous a permis de confirmer ces effets immunoprotecteurs des PEG et, par conséquent, de la solution SCOT. La durée de survie des allogreffons SCOT était de 17.3 ± 4.3 jours alors qu'elle était de 7.3 ± 3.6 jours pour les greffons préparés en HBSS+0,5% BSA ($p< 0,01$). Ces résultats confirmaient par ailleurs les effets bénéfiques de la solution SCOT sur la préservation de la fonctionnalité cellulaire avec un taux de NFP de 50% pour les greffons HBSS+0,5% BSA alors qu'aucune NFP n'est apparue dans le groupe SCOT ($p< 0,01$).

Nos résultats ayant démontré que la solution SCOT améliore la viabilité et la fonctionnalité des îlots, nous nous sommes demandé si l'allongement de la durée de survie du greffon n'était pas simplement dû à une meilleure conservation de la fonctionnalité des

îlots plutôt qu'au phénomène d'immunomasquage. Afin d'y répondre, nous avons évalué *in vivo* les effets immunomasquants des PEG de la solution SCOT sur un modèle suraigu de rejet cellulaire répondant uniquement au phénomène d'alloreconnaissance antigénique. Dans ce modèle les souris donneuses InsHA expriment un transgène codant pour le peptide transmembranaire HA (Hemagglutinine A) du virus *Haemophilus Influenzae*. Ce transgène est associé au promoteur de l'insuline ce qui permet l'expression du peptide HA à la surface des cellules β des îlots pancréatiques [Lo D.1992]. Les animaux receveurs sont des souris CL4 qui expriment un TCR transgénique (chaines Vα10 ; Vβ8.2) sur les lymphocytes $CD8^+$ spécifique du peptide HA. En effet plus de 90% des $CD8^+$ ont un TCR modifié ce qui conduit à un rejet rapide et suraigu des cellules β exprimant le peptide HA [Morgan DJ.1996] [Vizler C.2000]**.** Dans notre étude, comme on l'attendait, le rejet s'est produit très rapidement dans le groupe HBSS+0,5% BSA (2,4 ± 0,4 jours), alors qu'il s'est produit plus tardivement dans le groupe SCOT (12,5 ± 0,5 jours) ($p<0.01$). Il est très intéressant de noter que la prolongation de la durée de survie des greffons correspond à environ 10 jours comme dans le modèle d'allogreffe conventionnelle. Ces données permettent de suggérer que dans notre modèle le phénomène d'immunomasquage transitoire est probablement d'environ 10 jours, idépendamment du nombre de cellules effectrices anti-allogéniques. Ces résultats démontrent que la prolongation de la durée de survie du greffon est bien due en grande partie au pouvoir immunomasquant des PEG 20kDa 30g/L et pas uniquement à la préservation du métabolisme cellulaire.

2.3 Preservation de l'integrité cellulaire et immunogenicité

Cependant, il existe un lien très étroit entre la préservation de l'intégrité cellulaire et l'immunogénicité du greffon. En effet, certains travaux montrent que la conservation du greffon avec des solutions hyperpotassiques, entraîne une surexpression des molécules de classe II du CMH à la surface cellulaire, augmentant ainsi l'immunogénicité du greffon [Hauet T.2002] [Faure JP.2004]. De plus, l'expression des molécules d'adhésion et des chimiokines, liée aux lésions d'I/R, entraîne une augmentation de l'infiltration du greffon par les cellules immunocompétentes du receveur, participant au rejet de greffe [Land W.2002] [Land W.1996] [Halloran PF.1997] [Richer JP.2000]. La mauvaise préservation cellulaire induit des phénomènes inflammatoires, transformant ainsi le greffon en une véritable "bombe inflammatoire". Durant la conservation, comme au moment de l'implantation du greffon, les

cellules du donneur altérées, nécrosées ou apoptotiques relarguent des DAMPs provoquant ainsi un "signal danger", activant rapidement et fortement le système immunitaire contre le greffon [Gallucci S.2001] [Matzinger P.2002]. Ces DAMPs sont des molécules endogènes séquestrées, en conditions physiologiques, dans le compartiment cellulaire. En cas de dommages cellulaires, ces molécules sont excrétées sous forme soluble et deviennent ainsi les ligands des TLR, activant des voies de signalisation qui déclenchent des réactions immunitaires.

L'augmentation de l'expression des molécules du CMH à la surface des cellules dendritiques du greffon (résidentes et passagères), pourrait être liée à l'endocytose de fragments cellulaires propres au greffon (Figure 31). Ces fragments, comprenant les DAMPs, sont issus des corps apoptotiques et des résidus de nécrose cellulaire. De plus, cette expression des molécules du CMH pourrait être accentuée par le stress oxydant [Kim Y.2009] et le stress du réticulum endoplasmique [Bidmon B.2011], lésions qui peuvent être causées par l'I/R. Une revue récente relate l'influence du stress oxydant dans les mécanismes moléculaires de l'assemblage du complexe CMH-peptide [Kim Y.2009], assemblage hautement régulé par un cycle redox [Kim Y.2009]. Les protéines chaperonnes jouent un rôle important dans la synthèse du CMH et dans l'assemblage des peptides au sein de la molécule CMH de classe I. Les métabolismes du réticulum endoplasmique et des protéines chaperonnes, sont perturbés par l'I/R, ce qui pourrait induire l'augmentation d'expression des molécules de CMH et de l'apprêtement des peptides. Les travaux de Bidmon font le lien entre l'augmentation d'expression des molécules du CMH au cours de l'I/R et l'influence des protéines chaperonnes, telle que l'Hsp70. Ces données ont établi une corrélation significative entre la régulation positive de Hsp70 et la surexpression des molécules ICAM-1 et du CMH de classe II, conséquents à une déplétion en ATP et à un stress thermique lié à une séquence d'I/R chez le rat [Bidmon B.2011]. Cette surexpression des molécules du CMH pourrait être contiguë à une augmentation d'apprêtement des peptides présentés par les CMH, via l'activation des protéines TAP et Tapasine [données en cours de soumission].

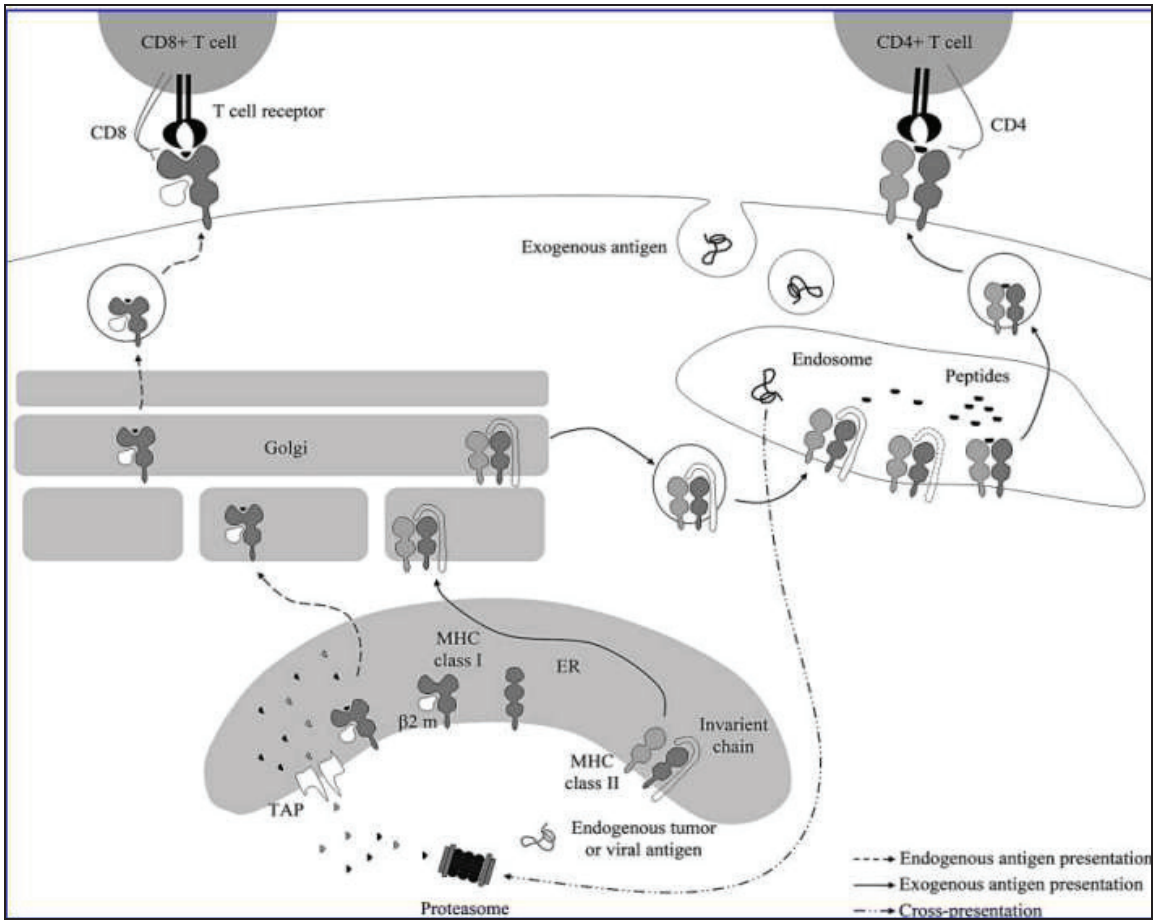


Figure 31 : "Processing" et présentation des antigènes exogènes et endogènes [Bidmon B.2011].

Le "processing" des peptides exogène, via l'endocytose des fragments extra-cellulaires, passe par l'endosome et l'apprêtement des peptides dans la cuvette du CMH de classe II. Ces peptides sont reconnus à la surface cellulaire par le TCR des lymphocytes T CD4. Les peptides endogènes sont dégradés dans le protéasome et transitent vers le réticulum endoplasmique où ils se lient au CMH de classe I. Le complexe final transite via le Golgi et une fois exprimé à la surface cellulaire est reconnu par le TCR des lymphocytes T CD8. Il existe une présentation croisée dans laquelle les peptides exogènes peuvent être présentés par les molécules du CMH de classe I et être reconnus par le TCR des lymphocytes T CD4.

2.4 Immunomodulation par les PEG

Une meilleure préservation de l'intégrité cellulaire grâce à la solution SCOT permettrait une réduction de libération des DAMPs, et donc une diminution de l'immunogénicité des cellules du donneur. Cependant, même si cette préservation est améliorée, elle n'inhibe pas totalement l'expression des molécules membranaires

responsables de l'immunogénicité. Dans ce cas, les PEG jouraient un rôle complémentaire dans le camouflage de ces molécules, inhibant ainsi l'alloreconnaissance et l'adhésion leucocytaire.

L'immunomodulation des îlots par les PEG vise à réduire l'immunogénicité du greffon ainsi que sa vulnérabilité vis-à-vis de l'agression par les cellules du système immunitaire et par les médiateurs de l'inflammation. Les données du Registre International des Greffes d'îlots ont clairement établi que l'immunomodulation représente un point crucial pour l'avenir de la transplantation d'îlots et des cellules endocrines [Registry CIT.2010].

2.4.1 PEG et inhibition du phénomène IBMIR

Les PEG, en prévenant les lésions d'I/R, peuvent donc limiter les phénomènes à l'origine des dysfonctions précoces du greffon et des rejets de greffe, comme la réaction d'IBMIR.

Les PEG de haut poids moléculaire peuvent répondre à cette problématique. En préservant l'intégrite cellualire et tissulaire durant la période d'ischémie, les PEG peuvent ainsi limiter l'apoptose et donc l'expression du facteur tissulaire et des phophatidylserines à la surface cellulaire. Cette PEGylation induit par conséquent une diminution d'expression de ces molécules pro-coagulantes (PS et de TF) initatrices de la coagulation [Hwang JW.2011] [Lee DG.2011]. Les PEG à la surface cellulaire peuvent également limiter la fixation des plaquettes [Deible CR.1998] par immunomasquage des sites de fixation ou effet de repulsion. En effet, selon les travaux de Chiang, la présence de PEG 20 kDa à la membrane endothéliale réduit significativement la fixation des plaquettes et l'activation des voies intracellulaires médiées par la thrombine [Chiang ET.2009], limitant ainsi la génération de thrombies et de l'inflammation. Ces mêmes travaux montrent que, la présence de PEG 20 kDa à 80 g/L permet l'inhibition de la phosphorylation des protéines ERK et MLC par la thrombine ajoutée dans le milieu, phosphorylation qui devient possible lorsque les PEG sont lavés [Chiang ET.2009].

Dans un deuxieme temps la limitation des lésions d'ischémie permet de reduire l'expression des molecules d'adhésion à la membarne des cellules. Ceci couplé aux propriétés de repulsion, permetterait de réduire l'adhésion des granulocytes et des monocytes/macrophages à la surface cellulaire, comme le suggère les travaux de l'équipe de Davis [Davies MG.1999].

Les PEG via leurs propriétés de protection de l'intégrité cellulaire (limitant l'expression des molecules pro-coagulantes), et via leurs capacités d'immunomasquage et de repulsion, peuvent ainsi reduire la lésion d'IBMIR [Hwang JW.2011] [Lee DG.2011] (Figure 32), et ainsi favoriser la reprise de fonction immédiate des îlots et leur survie.

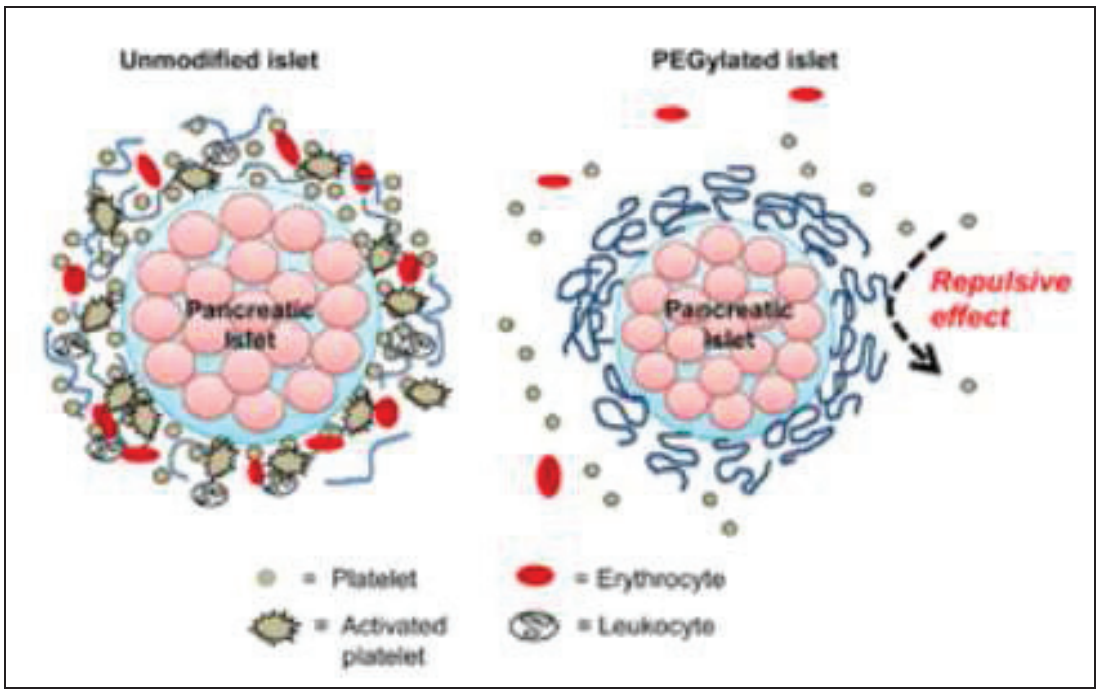


Figure 32 : Effet des PEG à la surface des îlots sur la réaction IBMIR [Hwang JW.2011] [Lee DG.2011].

2.4.2 PEG et prévention de l'immunogenicité

Une meilleure préservation de l'intégrité du greffon avec les PEG, inhibant le relargage de signaux danger (DAMPs), permet de réduire la réponse immunitaire innée et la transition vers la réponse immunitaire adaptative vis-à-vis du greffon. Polly Matzinger avait émis l'hypothèse qu'en l'absence de signaux de danger il pouvait ne pas y avoir de rejet de greffe (état de tolérance par ignorance) [Anderson CC.2001]. Il estétabli que l'expression de TLR2 et TLR4 (récepteurs des DAMPs) participe au rejet de greffe et à la dysfonction tissulaire [Kruger B.2010]. En effet, l'inhibition des voies de signalisation des récepteurs TLR4 prolonge significativement la survie des greffons médiée par les cellules T régulatrices [Zhang N.2012]. Certains travaux ont montré que des greffes de cœur réalisées chez des souris $RAG^{-/-}$ déficientes en cellules T ont été tolérées pendant une période supérieure à 50 jours. Au-delà de 50 jours si le compartiment de cellules T est reconstruit, par transfert

adoptif de cellules T naïves ou par greffe de moelle osseuse, les greffes cardiaques sont vigoureusement rejetées [Bingaman AW.2000]. Ces résultats suggèrent la persistance de "signaux", même longtemps après la greffe. D'après ces mêmes travaux, ces signaux pourraient être des molécules inflammatoires, sécrétes par le greffon, dont la synthèse d'ARN persiste même après 50 jours de tolérance [Bingaman AW.2000]. Ces résultats apportent de nouvelles informations pertinentes sur le rôle de l'inflammation ou des "signaux danger" dans l'initiation d'une réponse immunitaire alloréactive dépendante des cellules T. La séquence d'I/R modifie l'issue du rejet en augmentant l'accumulation des lymphocytes T effecteurs au sein du greffon. L'infiltration de ces lymphocytes T est dépendante de la présence conjuguée, des molécules d'adhésion, des cytokines/ chimiokines, et de l'augmentation d'expression des molécules du CMH [Chalasani G.2004]. Il est donc nécessaire de contrôler les lymphocytes T responsables du rejet. Cette régulation du répertoire T doit persister durant toute la période de survie fonctionnelle du greffon. Les capacités immunomasquantes des PEG permettent de réduire l'alloreconnaissance directe des molécules du CMH à la surface des cellules du greffon, limitant ainsi l'expansion d'une réponse alloréactive dépendante des lymphocytes T. Malheureusement cet immunomasquage est transitoire et ne permet pas de répondre de façon durable à cette invasion leucocytaire.

Les PEG pourraient participer à la réduction des lésions de dysfonctions chroniques du greffon en limitant les lésions précoces d'inflammation. En effet, les lésions précoces participent au développement des lésions chroniques par le biais de l'immunité innée et notamment via les voies DAMPs/TLR [Land WG.2005b] [Land WG.2005a] et par la surexpression des molécules d'adhésion et des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires [Mathur A.2006]. Il parait maintenant clair que les lésions d'I/R sont la source des lésions initiatrices du rejet chronique du greffon dans un contexte allodépendant ou alloindépendant [Perico N.2004] [Bon D.2012]. Dans un modèle de rongeurs où les receveurs de greffe cardiaque ne peuvent pas développer de stimulation primaire des cellules T naïves, les allogreffes ne sont pas rejetées même après transfert adoptif de cellules T alloréactives activées. Cependant après 100 jours post-greffe, des signes de rejet chronique se développent au sein des greffons [Chalasani G.2004]. Nos travaux ont clairement établis le lien entre la qualité de préservation du greffon et son impact sur la réduction des lésions tardives du greffon, telles que l'inflammation, la fibrose et l'atrophie tubulaire et ceci dans des modèles porcins d'autotransplantation rénale [Faure JP.2004] [Faure JP.2002] [Hauet T.2000] [Hauet T.2002] [Manuscript en cours de soumission : Thuillier R, Giraud S, Manguy E, Barrou B,

Valagier A, Puichaud A, Eugene M, Hauet T. Improving kidney graft preservation: role of polyethylene glycol. Cryobiology] ou d'allotransplantation [Thuillier R.2011a] [Thuillier R.2011b]

3 Choix des PEG

Cependant, les effets bénéfiques des PEG dépendent de leurs tailles et de leur concentration. L'utilisation de la solution SCOT, contenant 30g/L de PEG 20kDa, en préservation hépatique a conduit à deux phénomènes inattendus : une décoloration inhomogène du greffon et un pic anormalement élévé de transaminases vers le 2ème ou 3ème jour, sans que ni l'un ni l'autre de ces phénomènes observés n'affecte le devenir du greffon. Nous avons souhaité réétudier au laboratoire les effets de différentes longueurs de chaine et de différentes concentrations de PEG sur la préservation du greffon. Nous avons ainsi testé deux tailles différentes de PEG (20 et 35 kDa) à différentes concentrations.

3.1 Variation de longeur et de concentration de PEG dans notre modèle d'îlots

Nos travaux ont pu mettre en évidence que les solutions SCOT + PEG 20kDa ou 35kDa aux concentrations comprises entre 15g/L et 30 g/L permettent d'obtenir un rendement d'îlots (>527 IEQ/pancréas) supérieurs aux résultats obtenus avec les concentrations 0,5g/L, 1g/L, 5g/L, 10g/L et 52g/L ou comparé aux solutions CMRL + BSA 1% (494±24 IEQ/pancréas), HBSS + 0,5% BSA, UW ou encore SCOT sans PEG (432±19 IEQ/pancréas). Ce dernier résultat confirme le rôle essentiel des colloïdes dans les solutions de conservation. En concordance avec les moyens de préservation de l'intégrité cellulaire qu'apportent les solutions SCOT à hautes (>30g/L) ou faibles concentrations (<5g/L) de PEG, ces solutions ne permettent pas une reprise de fonction optimale des greffons d'îlots chez la souris diabétique (14% à 28% de NFP). Effectivement, nous n'avons observé aucune NFP dans les groupes de greffons isolés avec les solutions SCOT + PEG 20kDa ou 35kDa aux concentrations comprises entre 5g/L et 30 g/L. Au regard des reprises différées de fonction, jugées sur le retour à la normoglycémie à partir du troisième jour post-greffe, seules les solutions SCOT + PEG 20kDa >10 g/L ont permis un retour immédiat de la fonction insulinosécrétrice. Dans notre modèle, cette reprise de fonction est intimement liée à la

présence des PEG car le taux de NFP représente 25% des greffes et le taux de RRF 42% dans le groupe de greffons isolés avec la solution SCOT sans PEG. La durée de survie des allogreffes d'îlots préservées avec les solutions SCOT + PEG 20 kDa 10g/L à 30g/L (>20 jours) est significativement supérieure, comparée aux greffons SCOT + PEG 20kDa <10g/L, SCOT + PEG 35kDa, UW, CMRL-BSA 1% ou SCOT sans PEG (14 ± 1.7 jours).

Notre étude conforte les données existantes sur les bénéfices des PEG comme colloïdes, donnant de meilleurs résultats que les solutions contenant de la BSA ou de l'HES. Les solutions SCOT contenant des PEG 20kDa ou 35kDa à des concentrations comprises entre 10 et 30g/L permettent de répondre aux problématiques en transplantation d'îlots. Nos résultats ont mis en évidence que la préservation de l'intégrité cellulaire, avec un important rendement d'îlots en fin d'isolement, est un facteur prédictif d'une meilleure reprise de fonction et d'une augmentation de la durée de survie. Nos données sont en accord avec l'étude menée par l'équipe du Pr F. Pattou à Lille, qui rapportait qu'une meilleure conservation des greffons était associée à une meilleure durée de survie de l'allogreffe et un meilleur contrôle métabolique [Hubert T.2007].

Après analyse de ces résultats, notre groupe a choisi la concentration de 15g/L de PEG 20kDa pour remplacer la concentration initiale de 30 g/L dans la solution SCOT. Cette solution, compatible pour les organes du système abdominal, est actuellement utilisée en transplantation rénale [Billault C.2006] et en transplantation hépatique [Savier E.2010]. Ce type de solution pourrait, à terme, remplacer les solutions conventionnelles UW, Celsior et HTK utilisée pour le rinçage et la conservation du pancréas [Iwanaga Y.2008] [Fridell JA.2010] [Baertschiger RM.2008]. Cette solution pourrait également remplacer les solutions utilisées pour l'isolement des îlots. De plus, la culture des îlots avant transplantation pourrait être complétée par l'ajout de PEG 20kDa à 15g/L afin d'obtenir, à toutes les étapes, les bénéfices des PEG.

3.2 Rôle de la masse et de la nature de PEG sur les effets immunoprotecteurs

La longueur de chaîne et la concentration des PEG déterminent le rôle protecteur des PEG. A des concentrations variables, nos résultats montrent que les PEG 35kDa répondent différemment des PEG 20kDa en terme de durée de survie des allogreffes d'îlots murins [Giraud S.2012]. Ces observations sont concordantes avec les résultats obtenus dans notre

modèle d'allotransplantation de rein de porc. En effet les allogreffes de reins conservés avec la solution SCOT + PEG 20kDa à 30g/L ont une durée de survie supérieure (80% de survie 3 mois après greffe) aux reins conservés avec la solution IGL-1 contenant du PEG 35kDa à 1g/L (40% de survie à 3 mois) [Thuillier R.2011a].

3.2.1 Encombrement stérique des PEG

Les différents effets observés avec des PEG de taille et de concentrations variables peuvent s'expliquer de plusieurs raisons. La fixation des PEG à la surface de l'endothélium varie en fonction du diamètre de vaisseau sanguin, et des propriétés physico-chimiques propres aux PEG. L'encombrement stérique des PEG à la membrane cellulaire dépend de leur taille et de leur concentration. La concentration des PEG peut avoir d'importants impactes rhéologiques qui dépendent notamment de l'arbre vasculaire du tissu ou de l'organe. L'architecture vasculaire du cœur accepte de fortes concentrations de PEG, tandis que cette concentration doit être plus réduite pour le rein et encore plus pour le foie. Les groupes de Mosbah et Zhao ont montré, *in vitro*, que les PEG pouvaient avoir des effets agrégants sur des globules rouges. Comme pour l'HES, d'après leurs travaux, l'utilisation de PEG 20kDa > 30g/L et de PEG 35kDa > 10g/L est corrélée avec une incidence sur l'agrégation des érythrocytes [Zhao WY.2011] [Mosbah IB.2006]. *In vivo*, ces désordres rhéologiques peuvent être à l'origine d'obstruction des vaisseaux sanguins. Cette notion doit être prise en compte dans la conception d'une solution de rinçage ou de perfusion des organes.

3.2.2 Adsorption des PEG à la membrane cellulaire

L'adsorption des PEG à la surface cellulaire dépend donc de sa concentration et de sa taille, mais également du rayon de courbure de la cellule ou du tissu. Dans le cas d'un grand rayon de courbure (faible courbure membranaire), comme la paroi vasculaire ou encore des îlots pancréatiques, l'adsorption des PEG est plus importante contrairement à un petit rayon (forte courbure membranaire) où l'adsorption est plus limitée. Ainsi, les effets immunomasquants des PEG 6 kDa, 20 kDa et 35 kDa n'ont pas pu être observés sur des lymphocytes humains, cellules qui présentent un grand rayon de courbure [Perrin H.2009], alors que cet effet immunocamouflant a pu être observé sur nos îlots, [Giraud S.2007]. Ceci peut être expliqué par le fait qu'un îlot possède en effet un plus petit rayon de courbure qu'une cellule sanguine. De plus, les interactions des PEG à la membrane cellulaire

dépendent également de la nature biochimique de la membrane. Ainsi le fait que la surface les îlots soit plus adhérente que celle des lymphocytes [Perrin H.2009] pourrait expliquer l'absence d'immunomasquage observés avec les PEG sur les lymphocytes.

Le modèle expérimental doit se rapprocher de la réalité physiologique. C'est pourquoi en transplantation, l'intérêt de l'immunomasquage antigénique doit cibler en priorité le greffon et non pas les cellules lymphocytaires, d'autant plus que ces dernières doivent rester immunocompétentes. Notre groupe a récemment étudié l'incidence de la taille des PEG dans un modèle *in vitro* de cellules épithéliales rénales (lignée cellulaire), cultivées en "tapis cellulaire", et les résultats ont montré que les PEG 35kDa étaient supérieures aux PEG 20kDa dans la prévention de la nécrose cellulaire [Dutheil D.2006]. Le fait que ce modèle *in vitro* ne reflète pas la physiologie géométrique d'un tubule rénal pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas pu reproduire ces résultats chez le porc dans notre modèle préclinique de transplantation rénale. En effet, notre étude sur l'organe entier a montré une supériorité des PEG 20kDa dans la solution SCOT par rapport aux PEG 35kDa en termes de durée de survie des greffons [manuscrit en soumission].

3.2.3 Nature des PEG

Une des limitations de la solution SCOT dans sa composition actuelle est la durée de masquage qui semble être inférieure à 10 jours selon nos résultats. Cette courte durée de fixation des PEG sur la membrane cellulaire peut être due au détachement de la molécule puisque la liaison entre le PEG et la membrane est une liaison faible de type électrostatique.

3.2.3.1 PEG réactifs

L'utilisation de PEG réactifs pourrait permettre d'allonger considérablement les effets immunoprotecteurs. Ces derniers sont des PEG ayant un atome d'hydrogène remplacé par un groupement organique, de façon à pouvoir se lier aux membranes de manière covalente, rendant ainsi possible une fixation durable. Il existe différentes molécules de PEG réactifs en fonction de la nature du groupement organique : le "cyanuric chloride activated mPEG" (C-mPEG), le "benzotriazole carbonate methoxyPEG" (BTC-mPEG), le "N-hydroxysuccinimidyl ester of mPEG propionic acid" (SPA-mPEG) et le "PEG-isocyanate". Le C-mPEG, le BTC-mPEG et le SPA-mPEG ont été testés sur des globules rouges par l'équipe de Scott M.D. Les résultats n'ont pas montré d'altérations fonctionnelles des globules rouges et ont permis de

mettre en évidence une baisse significative de l'interaction cellulaire due à un immunomasquage des molécules d'adhésion [Scott MD.1997] [Bradley AJ.2002]. Seuls le PEG-isocyanate et le SPA-mPEG ont été utilisés sur des îlots pancréatiques. Elles ont confirmé la viabilité et la fonctionnalité des îlots de rat en présence de PEG réactifs [Lee DY.2002]. Toutefois seul le BTC-mPEG fixé à la surface des globules rouges a permis une survie *in vivo* des cellules dans un contexte allogénique à des concentrations immunoprotectrices (supérieure à 2 mM) [Bradley AJ.2002]. Comme décrit avec les PEG non réactifs, il y a un équilibre entre la longueur de chaîne et la concentration, qui conditionne l'encombrement spatial des PEG à la membrane. Le groupe de Scott et Murad a démontré que cet encombrement spatial des PEG détermine ces effets immunomasquants [Bradley AJ.2002] [Murad KL.1999b]. Dans ce cas des PEG de haut poids moléculaire sont préférables [Bradley AJ.2002]. Leurs travaux ont montré que les PEG 20kDa préviennent plus l'adhésion des globules entre eux par rapport aux PEG 5kDa [Bradley AJ.2002]. De plus ils ont montré que plus les concentrations de PEG étaient élevées plus cette agrégation cellulaire était inhibée. Le camouflage d'une protéine Kidd JK^b à la surface d'un globule rouge est rendu effectif par les PEG 20kDa à partir des concentrations supérieures à 3mM alors que cet immunomasquage n'a pas lieu avec des PEG 20kDa à des concentrations de 1 et 2mM ni avec des PEG 5 kDa à desconcentrations de 1 à 5mM [Bradley AJ.2002].

La fixation de PEG isocyanate 5kDa à 200g/L, à la surface des îlots pancréatiques de rat, durant 30 min à 37°C suivi d'un rinçage puis d'une période de culture en milieu neuf, n'a pas d'incidences négatives sur la fonctionnalité ni la survie des îlots [Panza JL.2000]. Cette modification de la surface des îlots par l'ajout de PEG réactifs semble être une solution prometteuse pour augmenter la durée de survie des îlots après transplantation. Les travaux de Lee DY en 2006 ont montré que la modification de la surface des îlots par les PEG-SPA 5kDa à 12,5g/L suivi de deux lavages, permet une nette augmentation de la durée de survie des îlots chez le rat diabétique (12 jours de survie versus 5 jours sans traitement). Cette durée de survie des îlots PEGylés fut prolongée au-delà de 100 jours après administration d'une faible dose de cyclosporine A (3 mg/kg/jour) alors que la survie fut de seulement 14 jours en présence de cyclosporine A pour des îlots sans PEG [Lee DY.2007] [Lee DY.2006]. Cette même équipe en 2007 a amélioré ces résultats par un procédé de triple PEGylation des îlots, comprenant des PEG-SPA 5kDa puis des polymères cationiques, puis des SPA-PEG-SPA 3,4kDa. Cette modification a permis une durée de survie des îlots supérieure à 100 jours sans traitement immunosuppresseur, alors que des îlots PEGylés une seule fois ont une durée de survie de

19±45 jours [Lee DY.2007] [Lee DY.2006]. Depuis d'autres travaux ont confirmé la possibilité de prolonger la durée de survie des allogreffes d'îlots après PEGylation [Jeong JH.2011].

3.2.3.2 Problèmes lié à l'utilisation de PEG réactifs

Cependant l'utilisation de ces PEG réactifs est difficilement applicable pour un organe entier et elle semble restreinte à la cellule isolée ou aux îlots de Langerhans. Effectivement, l'architecture de l'arbre vasculaire d'un organe pourrait être un frein compte tenu de la fixation "forcée" et durable de ces PEG. Cette fixation incontrôlable pourrait être à l'origine d'obstructions des microvaisseaux sanguins. De plus la fixation de ces PEG à la membrane cellulaire est liée à une réaction chimique qui a pour incidence une importante variation de pH. Cette acidose pourrait être rapidement contrôlée par un rinçage rapide de l'organe, cependant ce rinçage pourrait entrainer d'importants désordres rhéologiques augmentant ainsi les pressions de perfusion.

Ces données montrent que l'immunocamouflage des antigènes de surface par les PEG dépend donc de la nature du PEG, de sa taille, de sa concentration, de la nature biochimique de la surface cellulaire et du rayon de courbure de la membrane à laquelle se fixe ou s'adsorbe les PEG.

4 Utilisation de la solution en clinique

La solution SCOT optimisée et commercialisée contient 15 g/L de PEG 20kDa (appelée SCOT 15). Elle est utilisée en clinique pour la transplantation rénale et hépatique comme solution de rinçage et de conservation hypothermique. Les premiers résultats d'une étude randomisée monocentrique, ont montré que la conservation hypothermique des foies avec la solution SCOT induit une diminution des cholostases après reperfusion, par rapport aux organes conservés avec UW [Savier E.2010]. En transplantation rénale, les premiers résultats montrent une diminution (non significative) du nombre de reprises différées de fonction du greffon rénal par rapport à la solution UW [Billault C.2006]. Une évaluation clinique de cette solution de conservation a été menée à Lille dans le service du Pr F Pattou pour la préservation du pancréas. Les résultats obtenus avec SCOT sont favorables quant à la

prévention de l'œdème cellulaire et tissulaire après 4h de conservation à 4°C, contrairement à la solution Celsior (ne contenant pas de colloïde) [Hubert T.2007].

4.1 Interet de la solution SCOT et DDAC

La démographie actuelle des donneurs tend à une nette augmentation des donneurs à critères étendus et des DDAC. Les greffons provenant de ces donneurs sont fragilisés et donc plus sensibles aux lésions d'I/R. Nous avons voulu vérifier si l'utilisation de la solution SCOT permettrait de limiter les lésions induites après une séquence d'ischémie chaude (IC), comme chez les DDAC. Nous avons évalué les capacités de différentes solutions de conservation à prévenir les lésions d'IC subies par les îlots pancréatiques: la solution CMRL+BSA 1%, et les solutions UW, Celsior, IGL-1 et SCOT 15. Le rendement d'îlots est significativement moins important après une séquence d'IC, cependant la solution SCOT 15 permet d'obtenir un meilleur rendement d'îlots comparé aux autres solutions. Après 20h de culture les différences existantes en fin d'isolement entre les îlots ayant subis ou non l'IC, sont atténuées pour laisser place à des taux comparables d'activité mitochondriale. Cette séquence d'IC induit également une activation de nombreux gènes se traduisant par l'augmentation d'expression des transcrits de TLR-2, de TNF-α (cytokine pro-inflammatoire), de RANKL (TNF-related activation-induced cytokine ou TRANCE), qui est un facteur dépendant de NF-kB, pouvant induire notamment l'expression de ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) [Min JK.2005]. Ces transcrits sont particulièrement augmentés en fin d'isolement avec la solution Celsior, cette expression est modérée avec les solutions IGL-1 et UW, et faible avec les solutions CMRL-1% BSA et SCOT 15. Après une séquence d'IC, l'expression de ces transcrits est augmentée dans toutes les conditions, respectant la hiérarchie des solutions.

Les lésions d'IC sont donc à l'origine d'une souffrance métabolique mettant en jeu la perte de l'intégrité cellulaire, la perturbation du métabolisme mitochondrial, ainsi que l'activation de gènes pro-inflammatoire. L'utilisation d'une solution de type SCOT 15 contribue fortement à la préservation de ces lésions, sans pour autant empêcher totalement les dégâts de l'IC.

4.2 Solution SCOT et isolement des îlots pancréatiques en clinique

Initialement le pancréas du donneur est préservé dans les solutions UW ou HTK (Histidine- Tryptophan-Ketoglutarate). Cependant l'utilisation de la solution SCOT pour la conservation du pancréas pourrait permettre d'augmenter la conservation des îlots et le rendement en fin d'isolement. De plus cette solution pourrait être utilisée soit par injection conventionnelle, soit via l'injection par le canal pancréatique (ductal preservation). Cette dernière apparait comme une nouvelle technique permettant de mieux préserver le pancréas et d'augmenter la qualité des rendements d'îlots. Cette méthode émergeante est basée sur l'hypothèse que le système "ductal" est particulièrement vulnérable aux lésions d'ischémie froide. En injectant une solution de conservation à froid dans la direction opposée à travers le canal de Wirsung, la majorité des espaces intérieurs du pancréas peuvent être atteints. Ceci permettant de conserver un plus grand nombre d'îlots destinés à l'isolement, et permettant une plus grande distension de l'organe suite à l'injection de collagénase [Matsumoto S.2010]. Cette méthode réduit considérablement le nombre de cellules non viables, et améliore la préservation des capacités insulinosécrétrice des îlots [Sawada T.2003].

La méthode traditionnelle en clinique pour la purification des îlots est l'utilisation du Ficoll, sur la base d'un gradient de densité combinée à une centrifugation semi-automatique (COBE-2991). Cependant le processus de centrifugation est mécaniquement stressant et dommageable pour les îlots, conduisant à des phénomènes d'apoptose et d'inflammation. Le gradient de densité iodixanol pourrait être une alternative séduisante, c'est une solution de contraste neutre et iso-osmotique. Les travaux de Mita ont montré les effets bénéfique de la purification avec Iodixanol sur la diminution de production de cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF-α, IL-6, IL-8, IL-1β, IFN-γ et MCP-1, après isolement des îlots [Mita A.2011] [Matsumoto S.2011]. En outre, l'équipe de Hering a rapporté que les préparations d'îlots purifiés en utilisant iodixanol ont réussi à permettre l'insulino-indépendance chez les huit patients de l'étude après une seule injection d'îlots [Hering BJ.2005].

La solution SCOT pourrait être utilisée en remplacement des solutions conventionnelles UW et HTK, tout comme par injection dans le canal de Wirsung pancréatique. Elle pourrait également servir de solution de lavage des îlots au cours de la purification, et l'ajout des PEG 20kDa à 15 g/L pourrait être réalisé durant la culture afin de renforcer le pouvoir immunomasquant des PEG juste avant la transplantation.

4.3 Autres méthodes d'immuno-isolation des îlots pour prolonger la durée de survie des greffons.

Dans le but de réduire l'alloreconnaissance par le système immunitaire du receveur, d'autres techniques d'immuno-isolation ont été développées [Siebers U.1995] [Wilson JT.2008] (Figure 33).

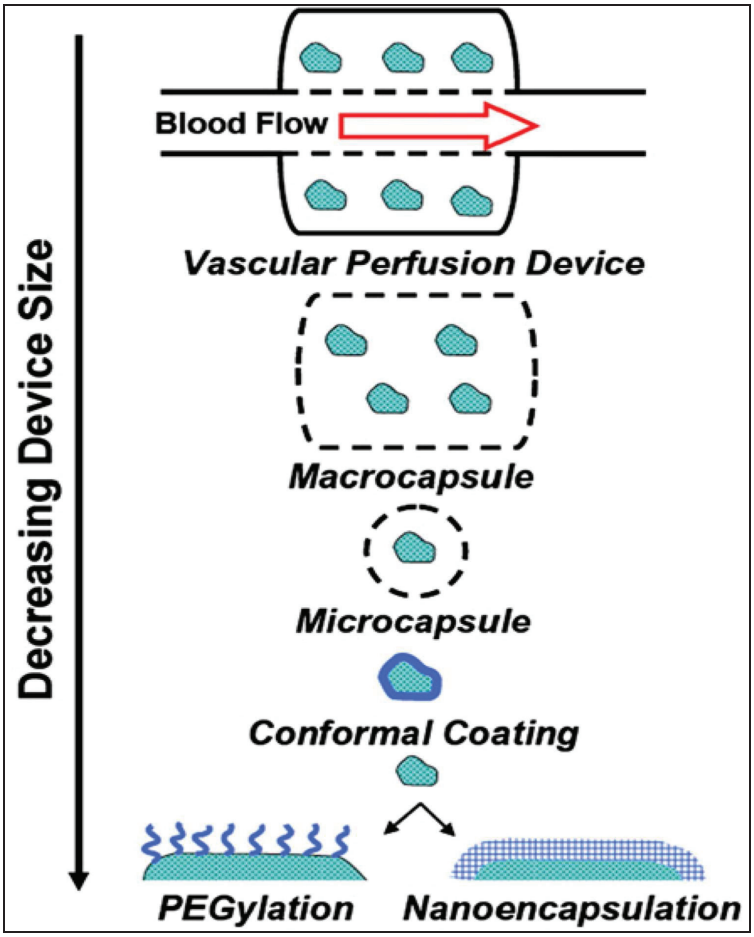


Figure 33 : Méthodes d'immuno-isolation des îlots, figure issue de [Wilson JT.2008].

Les dispositifs médicaux, la macroencapsulation et la microencapsulation des îlots nécessitent un matériel biocompatible imperméable envers le système immunitaire. Ces capsules sont principalement composées d'agarose ou d'alginate-poly(L-lysine). Elles doivent être microporées afin de permettre l'entrée du glucose et la sortie d'insuline, mais doivent cependant prévenir l'entrée du système du complément, des cytokines ainsi que des anticorps. Cependant cette méthode reste limitée par les problèmes de formation de fibrose enveloppant la matrice, induisant par conséquent une hypoxie [Narang AS.2006]. De plus, l'importante taille de la capsule (5 fois plus grande que l'îlot) est un frein pour l'actuel site d'injection. La

limitation principale et réelle de ces méthodes est donc l'importante taille du "transplant", nécessitant des investigations sur de nouveaux sites de transplantation. Certains sites comme l'injection intramusculaire sont actuellement en cours d'évaluation. La solution la plus prometteuse semble être la modification de la surface des îlots, comme avec des PEG. En effet cette méthode est séduisante du fait de la très faible épaisseur du revêtement (micrométrique). Une très récente étude américaine a mis au point une technique de nanoencapsulation des îlots à l'aide de nanoparticules fixés sur des îlots PEGylés. Cette méthode a permis de prolonger durablement la survie d'allogreffes d'îlots au-delà de 100 jours sans traitement immunosuppresseurs [Dong H.2012].

5 Contrôle du rejet d'allogreffe (Partie II)

5.1 Induction de tolérance périphérique par depletion des lymphocytes T alloréactifs dans notre modèle d'îlots

L'allogreffon est soumis à une réaction alloimmune, liée à l'immunogénicité du greffon notamment exacerbée par les lésions d'I/R. Il est donc nécessaire d'administrer un traitement immunosuppresseur contraignant et potentialisant certains effets secondaires indésirables. La prévention ou le contrôle de la réaction immunitaire aboutissant au rejet de l'allogreffe est en enjeu majeur en transplantation. Parmi plusieurs thérapies envisageables, le contrôle du rejet par déplétion des cellules T alloréactives est une judicieuse alternative à l'immunosuppression non spécifique. Plusieurs arguments nous ont conduit à étudier l'induction de tolérance, avec le système de "gène suicide TK", dans notre modèle de transplantation d'îlots de Langerhans allogéniques. Les îlots sont considérés comme étant autant immunogènes qu'une greffe de peau et plus qu'une greffe de cœur. Effectivement une greffe d'îlots peut être rejetée par environ 1000 lymphocytes T alloréactifs, alors qu'une greffe de cœur vascularisée requière environ $6x10^6$ cellules T alloréactives [Jones ND.2001]. Ceci est notamment dû au fait que l'expression des molécules du CMH est plus élevée sur les cellules β que sur les cellules cardiaques [Winer S.2003]. Ces données supportent le fait que la forte immunogénicité des îlots allogreffés induit chez le receveur une forte division des lymphocytes T. Les allogreffes d'îlots devraient donc être plus facilement tolérées, grâce à la déplétion des lymphocytes T en division (principalement les cellules alloréactives) avec le système de "gène suicide TK".

5.1.1 Caractère de la tolérance

Notre étude a montré la faisabilité d'induction de tolérance à une allogreffe d'îlots de Langerhans par déplétion transitoire (14 jours) des lymphocytes T en division, sous l'action du gène suicide TK (+ GCV) exprimé spécifiquement dans les lymphocytes T matures (lignée 2) et également dans les lymphocytes immatures (lignée 40). Nos résultats montrent que 63% des animaux TK^+GCV^+ deviennent tolérants aux allogreffes d'îlots C57BL/6. Chez les animaux TK^+GCV^+ lignée 40 ayant rejeté leur greffon tardivement (37%), la durée de survie (35.8 ± 12.9 jours) est significativement plus allongée que dans les groupes contrôles (17.5 ± 0.9 jours) ($p<0.0001$).

Dans notre étude aucun rejet de greffon n'apparaît après 55 jours de transplantation. Nos données suggèrent donc que, dans le modèle murin, deux mois minimum sont nécessaires pour établir pleinement la tolérance comme semblent le montrer également d'autres travaux [Saborio DV.1999] [Onodera K.1996] [Modigliani Y.1996]. Afin de définir la qualité de la tolérance induite et l'état d'immunocompétence des animaux, nous avons évalué la fonctionnalité des lymphocytes des souris tolérantes. Les expériences d'alloreconnaissance et de prolifération ont montré que les splénocytes des animaux tolérants possèdent le même potentiel alloréactif et prolifératif que les lymphocytes des animaux naïfs, vis-à-vis des antigènes d'une tierce allogénicité. Il est intéressant de noter que, *in vitro*, les splénocytes des animaux tolérants répondent aux antigènes du donneur, ceci peut être expliqué par le phénomène de "split tolerance". Cette immunoréactivité *in vitro*, qui contraste avec la tolérance *in vivo*, pourrait être expliqué par une probable absence dans l'expérience *in vitro* des cellules qui contrôlent l'alloréactivité *in vivo*. Des tests de cytotoxicité ont montré que les lymphocytes des animaux tolérants conservent des capacités cytotoxiques comparables à celles des animaux naïfs. De plus, le pouvoir de sécrétion d'IFN-γ par les lymphocytes T $CD8^+CD44^+$ des animaux TK^+GCV^+ allogreffés, n'est pas significativement différent de celui de lymphocytes d'animaux naïfs. Ces résultats confirment que l'absence de rejet n'est pas liée à une immunodéficience des cellules T effectrices chez le receveur, ces animaux restent immunocompétents. Chez des animaux tolérants, nous avons réalisé des allogreffes de peau et d'îlots de tierce partie et nous avons pu observer un rejet rapide de ces greffons, confirmant les capacités immunocompétentes de ces animaux tolérants. Cependant, chez des animaux tolérants, nous avons réalisés des allogreffes de peau de même fond génétique que les îlots tolérés et nous avons pu observer un rejet significativement retardé, mais pas de tolérance. Ces expériences nous permettent de définir cette tolérance comme spécifique d'haplotype, sans

cependant induire un état de tolérance de la greffe de peau. Cette tolérance "partielle" pourrait être due au fait que les animaux tolérants aux îlots ont subis une splénectomie et une ablation du greffon d'îlots avant la greffe de peau. Si une partie des cellules responsables de la tolérance se situaient au niveau de la rate et du greffon d'îlots, ces animaux ont pu subir une amputation de leur répertoire de cellules tolérogènes nécessaires pour établir une tolérance envers la greffe de peau.

5.1.2 Tolérance et balance de cellules effectrices / regulatrices

Chez ces animaux tolérants, le nombre absolu et le pourcentage des splénocytes T $CD4^+CD25^+$ augmentent significativement comparé aux animaux naïfs. Chez les souris tolérantes comme chez les souris TK^+GCV^+ ayant rejetées tardivement leur greffon, le pourcentage de cellules $CD4^+CD25^+$ se stabilise à 13% de la population T $CD4^+$ au-delà de 90 jours après traitement au Ganciclovir. Ces résultats suggèrent que la présence de cellules régulatrices T $CD4^+$ $CD25^+$ ainsi que la perturbation de la balance homéostasique cellules effectrices alloréactives / régulatrices jouent un rôle important dans le retard du rejet de greffe et dans l'établissement et le maintien de la tolérance. De plus le maintien de la population T régulatrices $CD4^+CD25^+$ semble être dépendant de la présence du greffon car chez les animaux contrôles et les animaux TK^+GCV^+ non greffés le nombre et le pourcentage de lymphocytes $CD4^+CD25^+$ augmentent nettement jusqu'à J21 et retournent aux valeurs physiologiques dans les 2 premiers mois après traitement. Dans notre modèle les cellules tolérantes T $CD4^+CD25^+$, induites par le système TK^+GCV^+, sont positives pour le marqueur FoxP3, spécifiques des cellules T régulatrices.

Au sein de la population de lymphocytes infiltrant le greffon des animaux tolérants, le nombre absolu et le pourcentage des cellules T $CD4^+CD25^+$ dans la population $CD4^+$ augmentent significativement. Les lymphocytes $CD4^+CD25^+$ et $CD4^+CD25^-$ infiltrant le greffon perdent l'expression du marqueur membranaire CD62L. La protéine CD62L (ou L-Selectine) intervient dans la diapédèse leucocytaire. Il a été démontré, chez des animaux naïfs, que 50 à 60% des cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+$ sont $CD62L^+$, et que les T régulateurs $CD62L^+$ ou $CD62L^-$ ont le même potentiel suppresseur ou anergique [Fu S.2004]. Ce phénotype cellulaire activé ($CD4^+CD25^+CD62L^-$) est probablement essentiel pour que les cellules puissent être recrutées en dehors de ganglions lymphatiques (notamment vers le greffon) afin d'y réguler les cellules T alloréactives et permettre ainsi le maintien de la

tolérance vis-à-vis du greffon. Cette perte d'expression du CD62L expliquerait la présence de ces cellules au sein du greffon des animaux tolérants.

L'induction d'apoptose des cellules T alloréactives en division par le traitement TK^+GCV^+ pourrait augmenter la fréquence des cellules T régulatrices. Il est décrit que la diminution du nombre des cellules T alloréactives pourrait favoriser l'apparition de cellules T régulatrices [Kishimoto K.2002] [Li XC.2000]. L'augmentation du nombre et du pourcentage de cellules T $CD4^+CD25^+$ chez les animaux TK^+GCV^+ greffés confirme cette hypothèse. De plus, la capture des corps apoptotiques provenant des cellules T alloréactives TK^+GCV^+ par les cellules dendritiques autologues, en absence de phénomènes inflammatoires, permet la maturation de ces dernières vers un phénotype immunosuppresseur induisant l'activation de cellules T régulatrices et permetant ainsi d'induire un état de tolérance spécifique à un antigène [Liu K.2002] [Steinman RM.2002]. Il est décrit dans la littérature que la maturation des cellules dendritiques en "phénotype tolérogène" (sécrétion d'IL-10 et diminution de l'expression des molécules de costimulation) par traitement avec la forme active de la vitamine D3, favorise l'émergence de cellules T régulatrices et aboutie à la tolérance des allogreffes d'îlots et de cœur [Adorini L.2003].

5.1.3 Tolérance infectieuse

Nous avons réalisés des expériences de transfert de tolérance, afin de caractériser les capacités des splénocytes des souris tolérantes sur le contrôle du rejet d'allogreffes d'îlots chez une souris FVB diabétiques TK^-GCV^-. Dans le premier groupe expérimental (souris FVB receveuses d'îlots C57BL/6 et de $60x10^6$ splénocytes de souris FVB TK^+GCV^+ tolérantes aux îlots C57BL/6), les résultats montrent que le transfert permet d'induire un retard significatif du rejet dans 60% des cas et un état de tolérance dans 40% des cas. Dans le deuxième groupe expérimental (souris FVB receveuses d'une greffe de peau C57BL/6 et de $60x10^6$ splénocytes de souris FVB TK^+GCV^+ tolérantes aux îlots C57BL/6), les résultats montrent que le transfert n'a pas pu aboutir à une tolérance ni même à un retard de rejet. L'ensemble de ces résultats qualifient cette tolérance de dominante [Graca L.2003] [Wood KJ.2003] et spécifique d'antigène après transfert. Dans le troisième groupe expérimental (souris C57BL/6 CD45.1 receveuse d'îlots BALB/c et de $8x10^6$ splénocytes C57BL/6 $CD25^-$ CD45.2 tolérants aux îlots BALB/c), les résultats montrent que le transfert aboutit à un état de tolérance chez le receveur (données non publiées). Chez ces nouveaux animaux tolérants, le pourcentage de lymphocytes T $CD25^+$ représente 14,8% des cellules $CD4^+$ (3.6% chez

l'animal contrôle). Nos résultats montrent que les cellules spléniques du donneur CD45.2 ne sont presque plus présentes chez l'animal receveur tolérant 96 jours après transplantation. Il semble possible que les cellules spléniques tolérantes $CD25^-$ du donneur, dès les premiers jours après le transfert régulent les cellules alloréactives du receveur, induisant l'émergence d'une population de T régulatrices du receveur qui vont possiblement remplacer au fur et à mesure les cellules régulatrices du donneur. Ces résultats permettent de qualifier cette tolérance de dominante et infectieuse, d'après les caractères émis par [Qin S.1993] [Waldmann H.2001].

5.1.4 Role de la population Treg dans le contrôle de la tolérance

Le traitement des animaux avec un anticorps PC61 anti CD25 au 61ème jour après greffe chez des animaux tolérants, n'a pas rompu cette tolérance. Il est très intéressant de noter que les cellules initialement $CD25^+FoxP3^+$ ont perdu l'expression du CD25, 7 jours et 14 jours après traitement au PC61. Ces données laissent suggérer que le maintien de la tolérance est effectué par une population autre que les T $CD4^+CD25^+$. Ces résultats renforcent nos expériences de transfert de tolérance (troisième groupe) réussi via les cellules spléniques $CD4^+CD25^-$. Il est possible que cette tolérance soit entretenue par des cellules FoxP3 $CD25^-$. Cependant, il est possible que si nous avions sacrifié les animaux plus tard que 14 jours après PC61, nous aurions pu constater une re-augmentation de la population T $CD4^+CD25^+$ comme peut l'évoquer l'évolution du profil phénotypique de ces animaux.

L'observation d'une augmentation du pourcentage des cellules T $CD4^+CD25^+$ $FoxP3^+$ chez les souris tolérantes, suggère que cette population joue un rôle important dans la tolérance. Cependant, les expériences de déplétion par PC61 et de transfert de tolérance ont prouvé que les cellules $CD25^+$ ne sont pas obligatoirement nécessaires pour le maintien et le transfert la tolérance. Ceci est en faveur d'un possible rôle d'autres populations de cellules régulatrices, exprimant ou pas CD25 et FoxP3 [Huehn J.2004] [Fontenot JD.2003]. En effet, d'autres populations de cellules régulatrices ont été également décrites, telles que des sous populations de cellules T $CD8^+$ [Field AC.2003] [Colovai AI.2003], de cellules $CD4^-$ $CD8^-$ TCR^+ [Young KJ.2002] [Chen Y.2001], de cellules NKT [Hammond KJ.1998], de lymphocytes B $CD19^+$ [Thaunat O.2011], de MDSC [Dugast AS.2008] [Dilek N.2012b] [Dilek N.2012a] et les DC tolérogènes [Lebranchu Y.2004]. Dans notre modèle, la tolérance pourrait être due à une combinaison de différentes cellules régulatrices.

5.1.5 Induction de mécanismes multiples de tolérance periphérique

Notre système de délétion transitoire des T alloréactifs aboutit à un état de tolérance périphérique permanent. Notre modèle a probablement permit la mise en place des autres mécanismes de tolérance périphériques. En effet nous avons finalement pu aboutir à la déplétion par apoptose des cellules T alloréactives et donc à l'émergence d'une régulation de la réponse immunitaire via la probable émergence de DC immunosuppressives et la génération de Lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+FoxP3^+$. Le maintien de cet environnement immunorégulateur a permis d'induire l'anergie clonale des cellules T alloréactives, associée à un probable défaut de synthèse d'IL-2, sous le contrôle des lymphocytes T régulateurs. L'ensemble de ces phénomènes aboutissent à une déviation immunitaire de la réponse immunitaire Th1 vers une réponse Th2 avec une probable production des cytokines IL-10 et TGF-β et une inhibition de la synthèse de TNF-α.

5.2 Interêt de la tolérance periphérique dans le contrôle de la recurrence du diabète autoimmun

Le diabète de type I étant dû à une réaction auto-immunitaire, la récurrence d'un processus de destruction auto-immune du greffon d'îlots est un phénomène théoriquement redouté. Cette récurrence a été démontrée lors de transplantations entre jumeaux homozygotes [Sibley RK.1985] et plus récemment chez une patiente après une greffe de pancréas [Assalino M.2012]. Cette récurrence est considérée comme un phénomène restreint au complexe majeur d'histocompatibilité, donc improbable en cas de donneur non apparenté. Cependant, certains auteurs ont avancé une relation entre la réapparition d'anticorps anti-îlots et la survenue ultérieure d'un échec de la greffe, lors de greffes entre sujets HLA-différents [Bosi E.1989]. Une équipe de Genève a récemment observé la récurrence du diabète de type I chez une femme ayant reçue une greffe simultanée de rein et pancréas. En effet 3,5 ans après transplantation, la patiente présentait des signes de dysfonction du greffon, elle fut retransplanté après 6 ans. Chez cette patiente le greffon rénal (du même donneur que le pancréas) ne présentait aucun signe de rejet. Les analyses du pancréas ont montré une absence de réaction immune cellulaire et humorale, mais ont laissé entrevoir des infiltrats lymphocytaires autour des îlots pancréatiques. Ces données confirment que le pancréas n'a pas été rejeté, mais qu'il a bien été le siège d'une recidive du diabète de type I, et ce en absence de détéction des anticorps autoréactifs anti GAD et anti IA-2 [Assalino M.2012].

L'induction d'une tolérance avec un contrôle immunorégulateur des cellules alloréactives devrait théoriquement contrôler la récurrence "auto-immune" si elle est dirigée contre un antigène autre que les CMH autologues des îlots.

5.3 Pouvoir immunosuppresseur des cellules apoptotiques

Les cellules apoptotiques ont la capacité d'induire *in vivo* une déviation de la réponse immunitaire vers un profil cytokinique immunomodulateur et un mécanisme de tolérance périphérique [Voll RE.1997]. En effet, les cellules phagocytaires comme les macrophages ou les cellules dendritiques peuvent libérer des cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF-β) lors du "traitement" des cellules apoptotiques autologues [Voll RE.1997] [Fadok VA.1998]. Les cellules apoptotiques, générées après irradiation gamma, ont un effet immunosuppresseur *in vitro* par l'intermédiaire des cellules phagocytaires qui produisent de l'IL-10 [Voll RE.1997]. Ainsi, un environnement immunosuppresseur est créé par les DC de manière à empêcher le déclenchement d'une réponse immune vis à vis de ces propres antigènes. L'émergence de DC régulatrices ou tolérogènes est probablement une des meilleures alternatives pour générer un état de tolérance vis-à-vis de nouveaux antigènes. Les DC sont les seules cellules capables d'activer des lymphocytes T naïfs. Il s'agit là d'une caractéristique majeure des DC spécialisées dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative vis à vis d'un nouvel antigène [Banchereau J.1998]. De plus les DC sont réputées pour être les "sentinelles" du système immunitaire, elles permettent le maintien de l'homéostasie [Steinman RM.2002]. Ainsi les DC suppressives peuvent induire un état de tolérance spécifique, suite à l'activation ou la génération de lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+$ qui inhibent les lymphocytes T effecteurs [Steinman RM.2007] (Figure 34).

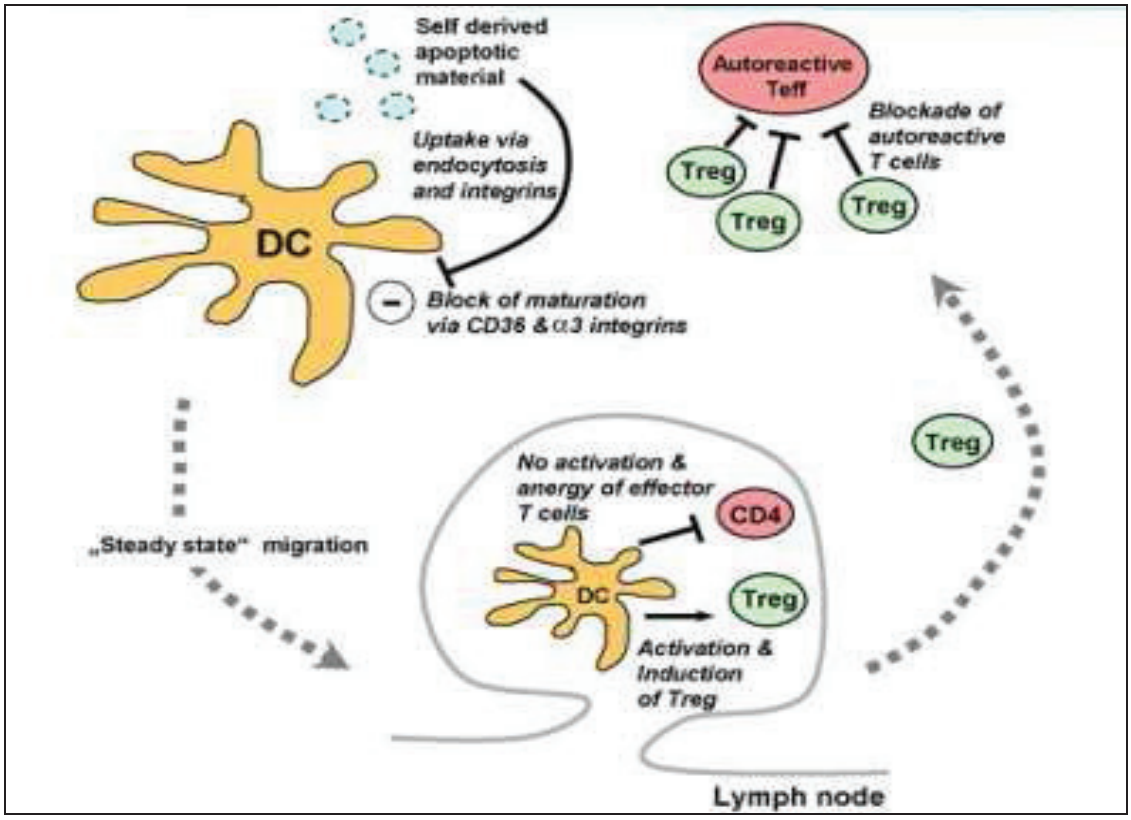


Figure 34 : Emergence et rôle des DC tolérogènes. D'après [Mahnke K.2007].

En absence d'inflammation, les DC du tissu peuvent capturer les antigènes du soi provenants de cellules apoptotiques autologues. Elles migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques afférents. La présentation d'antigène du soi active ainsi les lymphocytes T regulateurs qui inhibent l'activation des lymphocytes T effecteurs.

5.4 Induction de tolérance et environment immunoregulateur

Notre étude met en évidence 3 phases successives (Figure 35) :

(i) la déplétion transitoire des cellules alloréactives en division,

(ii) la perturbation de la balance homéostasique,

(iii) et l'émergence d'un pool de cellules régulatrices qui controlent le maintien d'une tolérance dominante et infectieuse.

Le maintien de cet environnement immunorégulateur responsable de la tolérance pourrait être lié à la génération de DC tolérogènes ayant phagocyté les T alloréactifs rendus apoptotiques par le système $TK^{+}GCV^{+}$. Le maintien de cet environnement pourrait également être lié à un rôle plus central du lien entre les DC tolérogènes et les cellules T régulatrices

induites. Le contact entre les Treg et les DC, ainsi que la sécrétion de l'IL-10 et du TGF-β par les lymphocytes T régulateurs, bloquent également l'interaction entre les DC et les lymphocytes T effecteurs [Mahnke K.2007]. D'autres études décrivent un rôle direct des T régulateurs dans l'inhibition des cellules T effectrices, via la production de TGF-β qui inhibe les populations T CD8+ et via la sécrétion d'IL-10 et TGF-β qui inactivent les sous-populations lymphocytaires TH1 [Thomas D.2005]. La cytokine IL-10 joue quant à elle un rôle pivot. Elle est sécrétée par les DC tolérogènes ainsi que par les Treg et elle permet l'induction de ces 2 populations cellulaires via la production d'IL-10 par l'une ou l'autre [Thomas D.2005]. L'utilisation de cellules régulatrices comme les cellules dendritiques immatures ou les lymphocytes T régulateurs produisant de l'IL-10 aboutie à un état de tolérance [Dhodapkar MV.2001].

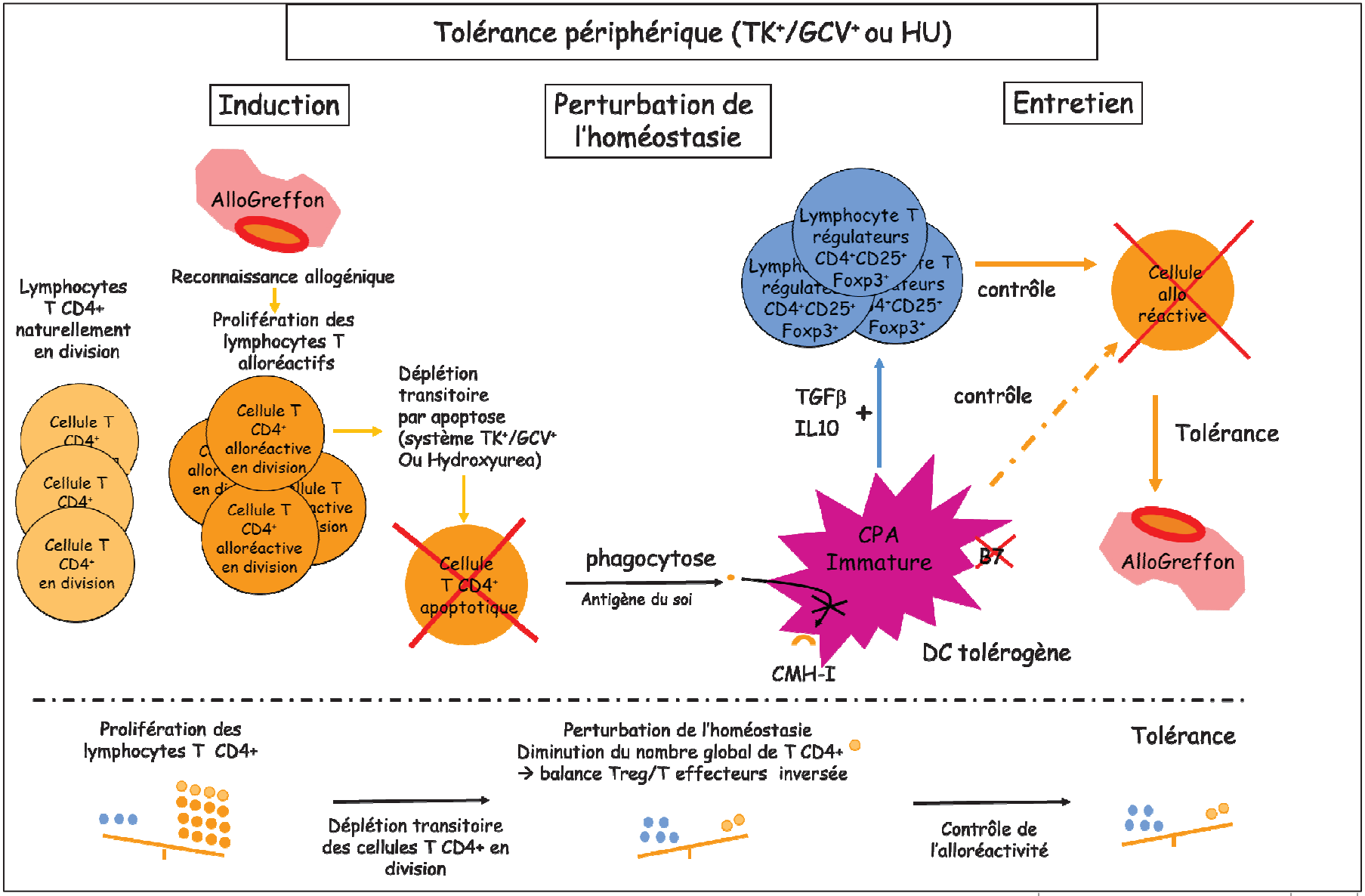


Figure 35 : Induction de tolérance périphérique dominante par dépletion transitoire des lymphocytes T CD4$^+$ en division, (modèle TK$^+$/GCV$^+$ ou HU).

L'état de tolérance périphérique est la résultante d'un équilibre entre le pool des lymphocytes agressifs et celui des lymphocytes T régulateurs

5.4.1 Potentiel rôle des cellules dendritiques tolérogènes et cytokines immunoregulatrices

La génération de cellules dendritiques de type tolérogènes semble être une voie intéressante, ces cellules ayant le contrôle de la réaction immunitaire. Cependant il n'est pas forcément nécessaire de moduler le phénotype des cellules phagocytaires dès les premiers temps après la transplantation. Une étude récente a montré que les monocytes peuvent être recrutés à partir d'un réservoir de la rate pour participer à la cicatrisation des plaies dans les tissus lésés après une ischémie [Swirski FK.2009]. De plus la déplétion en cellules dendritiques augmenterait l'inflammation stérile accentuant les lésions tissulaires liées à une séquence d'I/R hépatique [Bamboat ZM.2010]. En effet le rôle premier de ces cellules est de "nettoyer" le tissu des cellules apoptotiques ou nécrosées afin de restaurer l'intégrité tissulaire. Une solution alternative serait de moduler le phénotype des ces cellules phagocytaire à partir de la deuxième semaine post-transplantation, temps à partir duquel les lésions tissulaires aigues sont atténuées. La protection conférée par les macrophages de type II ou cellules dendritiques tolérogènes dépend de leur phénotype, notamment de leur production de cytokine anti-inflammatoire IL-10 ou TGF-β, résultant en une atténuation des niveaux de sécrétion de cytokine de type TH1 telles que TNF-α, IL-6 et IL-4. Cependant quelques interrogations persistent sur le rôle et l'impact des cellules dendritiques tolérogènes et des macrophages de type II. Un des premiers points est le paradoxe TGF-β.

5.4.2 Le paradoxe TGF-β

Actif sur tous les types cellulaires, le TGF-β contrôle la prolifération, la différenciation, la migration, l'adhérence ou la mort, selon le type cellulaire et l'état de différenciation. Le TGF-β exerce un effet antiprolifératif important sur les cellules endothéliales, épithéliales, neurales, hématopoïétiques, et dans certains types de cellules mésenchymateuses. Il a été montré que le TGF-β réprimait l'expression des protéines contrôlant négativement la sortie du cycle cellulaire et l'entrée en différenciation de divers types cellulaires [Kang Y.2003], agissant comme des inhibiteurs des facteurs de transcription essentiels pour la différenciation [Ruzinova MB.2003]. TGF-β1 contrôle la cytotoxicité des macrophages en supprimant leur production de NO (via iNOS) et d'anion superoxyde [Vodovotz Y.1993]. Les souris KO pour le gène TGF-β1 meurent quelques semaines après la naissance, des conséquences d'une réponse inflammatoire généralisée et d'une nécrose

tissulaire trop importante. Dans ce contexte, le TGF-β a non seulement une action antiproliférative sur les cellules immunitaires (lymphocytes T et les thymocytes) mais il contrôle aussi leur activation, leur division et leur différenciation [Chen W.2002]. De plus, le TGF-β participe à la formation de myofibroblastes via son action sur la différenciation cellulaire et la transcription du facteur Smad4. Le TGF-β1 attire fortement les neutrophiles, lymphocytes T, macrophages, les monocytes [Eddy AA.1996] [Wahl SM.1987] et les fibroblastes [Postlethwaite AE.1987]. Une fois sur les sites endommagés, ces cellules s'activent et croisent de fortes concentrations de TGF-β1. Activés par le TGFβ, les monocytes sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, telles que MCP-1 et TNF-α, et les fibroblastes augmentent leurs synthèses de protéines de collagène, constituant la matrice extracellulaire. Le TGF-β1 participe également à l'infiltration intra-tissulaire de cellules, elles-mêmes, productrices de TGF-β1. Cet effet paracrine a un rôle central dans le développement de la fibrose et de l'inflammation chronique [Kim SJ.1990]. L'expansion de la fibrose a pour conséquence la réduction des apports en oxygène au sein du tissu fibrosé, ceci induisant la transcription du facteur HIF-1α. Cette émergence de fibrose est une caractéristique majeure des lésions chroniques du greffon, encore à ce jour incontrôlables. Ce lien est important car les travaux de Dang en 2011 ont clairement établis le rôle central du facteur HIF-1α dans le contrôle de la balance des cellules Th17/Treg [Dang EV.2011] [Pan F.2012]. Dans les cellules T murines, HIF-1α participe au développement des Th17 via l'activation transcriptionnelle de RORγδ (Retinoid-related orphan receptor γt) et l'activation du promoteur de l'IL-17. Parallèlement, HIF-1α fixe FoxP3 dans le protéasome conduisant à sa dégradation, ayant pour conséquence la diminution du ratio Treg/Th17 [Dang EV.2011].

Le TGF-β est donc au centre d'un paradoxe, participant à la fois à l'induction de cellules T régulatrices et jouant aussi un rôle déterminant dans le développement de la fibrose et de l'inflammation chronique via le recrutement de monocytes/macrophages et de lymphocytes T. L'équipe de Kitani a suggéré que le TGF-β produit par les Treg murins induit la production d'IL-10 par les cellules T et les macrophages, via la transcription de Smad4 [Kitani A.2003]. Leurs travaux ont montré que l'administration d'un plasmide codant pour le TGF-β augmente légèrement le développement de fibrose induite par bleomycine chez la souris, mais significativement moins que le plasmide codant pour Mock. Par rapport à Mock, le TGF-β réduit la fibrose induite par la bleomycine, augmente le taux d'IL-10 circulante et réduit la sécrétion d'IFN-γ et d'IL-12 chez la souris sauvage, contrairement à la

souris IL-10 KO chez laquelle le développement de la fibrose est accentué pour atteindre les niveaux de fibrose Mock^{+} [Kitani A.2003]. Ces travaux suggèrent que le TGF-β a une action immunosuppressive et anti-fibrotique IL-10 dépendante [Kitani A.2003]. Combiné avec l'IL-6, le TGF-β est requis pour la génération de lymphocytes Th17 dérivant des cellules T naïves périphériques (Figure 36). A sein d'une population T naïve, l'expression de RORγt est induit par l'IL-6 et le TGF-β. RORγt est un facteur de transcription clé dans la différenciation Th-17 [Korn T.2009]. L'augmentation périphérique du nombre de cellules lymphocytaires Th17 RORγt et des cytokines IL-17, IL-6 et IL-23 est corrélée à la diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs et des cytokines IL-10 et TGF-β [Cheng X.2008]. Le TGF-β combiné ou non à l'IL-6 ou à l'IL-10, régule ainsi la balance entre les cellules T effectrices, Th17 et Treg pouvant jouer un rôle primordial dans le développement des lésions chroniques du greffon.

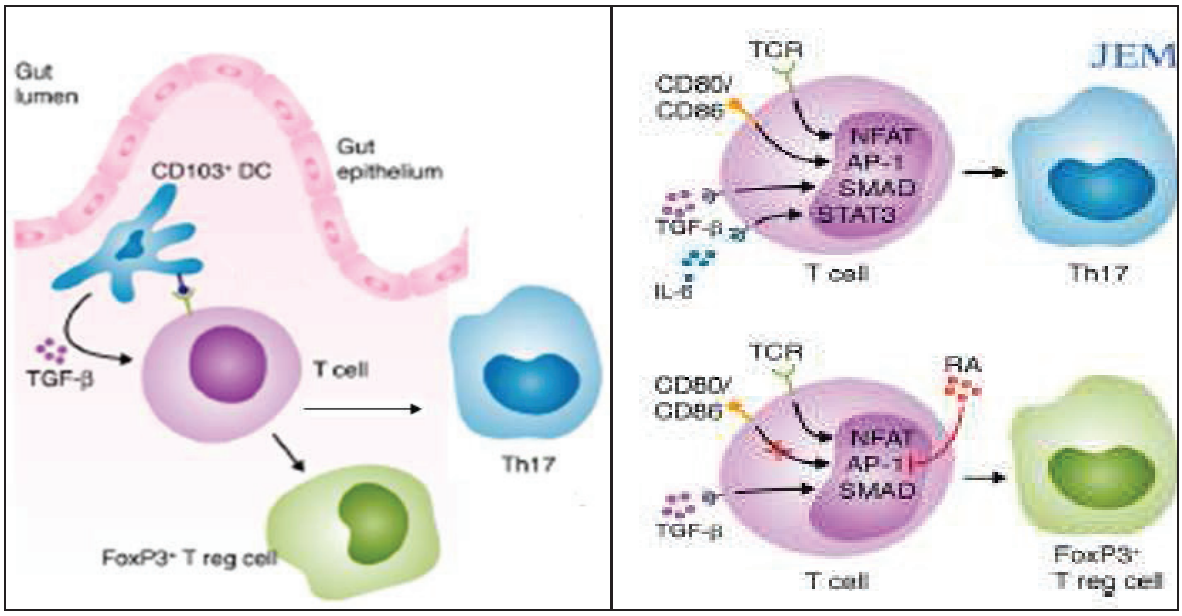


Figure 36 : Signalisation du TGF-β et émergence des cellules Th17 ou Treg [Korn T.2009]. *La balance entre les cellules T effectrices Th17 et les cellules T régulatrices FoxP3 pourrait être médiée par la cytokine TGF-β combinée ou non à la cytokine IL-6. L'immunorégulation aboutissant à la réduction de la production d'IL-6 pourrait être en faveur d'une balance pro-régulatrice.*

5.5 Translation en clinique

Des essais cliniques anticancéreux, basés sur l'utilisation du système HSV-TK/GCV, ont été mis en place et ont tous montré une bonne tolérance au traitement puisque aucun effet

secondaire néfaste n'a été observé. Les résultats obtenus, en termes d'efficacité anti tumorale, sont variables selon le type tumoral ciblé. Les premiers résultats chez l'Homme montrent que 14 jours de traitement au GCV, 7 jours après injection du gène TK au cœur du glioblastome, permettent de réduire la récurrence de la tumeur chez seulement peu de patients [Klatzmann D.1998b] [Klatzmann D.1998a]. Ceci est dû au faible taux de pénétration du gène HSV-TK dans les cellules tumorales [Rainov NG.2000]. Le ciblage et l'endocytose du transgène sont donc des pistes à optimiser.

La stratégie du transfert d'un gène à visée thérapeutique comporte donc des exigences, comme le choix du gène d'intérêt, du système de transfert (vecteurs viraux ou non), de la cellule cible, ainsi que des problèmes d'éthique. De plus, il est important d'éviter la réaction de rejet du vecteur viral par l'organisme. Il existe aussi le problème des éventuels virus recombinants et compétents pour la réplication. Dans le cas d'une transplantation autre que la moelle osseuse, la manipulation génétique *ex vivo* (incorporation du gène TK) des lymphocytes T des patients receveurs, pour ensuite les réimplanter, semble délicate. Cependant l'injection d'un lentivirus pourrait être une solution. En effet le lentivirus à un trophisme particulier, il cible spécifiquement les cellules immunitaires et principalement les lymphocytes T. L'équipe de Yan a développé une méthode efficace pour cibler la transduction du gène médiée par lentivirus à un type cellulaire désiré. Cette méthode implique l'incorporation d'anticorps choisis et de protéines fusogènes comme deux molécules distinctes à la surface lentiviral. Le fusogène est construit en modifiant les protéines de l'enveloppe virale, de telle sorte qu'elles n'aient plus la capacité de se lier à leur récepteur apparenté tout en conservant la possibilité de déclencher la fusion membranaire dépendante du pH. Ainsi, la spécificité d'un tel vecteur lentiviral est uniquement déterminée par l'anticorps, qui est choisi pour reconnaître un antigène de surface spécifique du type cellulaire souhaité. Cette liaison spécifique induit alors l'endocytose de l'antigène de surface, ce qui porte le lentivirus dans un endosome. Le fusogène répond ensuite à l'environnement à faible pH et la fusion membranaire sert d'intermédiaire, permettant ainsi au virus d'entrer dans le cytosol [Yang L.2006]. La thérapie génique utilisant le lentivirus en tant que vecteur est en essai pilote en phase clinique pour la thérapie du syndrome de Wiskott-Aldrich [Merten OW.2011]. Une des limites de ce système est le caractère intégratif du lentivirus dont son incorporation dans le génome est "incontrôlable", il peut aisément intégrer un gène oncogène. Actuellement certaines équipes tentent de contrôler ce caractère intégratif.

Dans une optique clinique sans thérapie génique associée, l'utilisation d'inhibiteur chimique de la réplication de l'ADN, tel que l'Hydroxyurea (HU), permettrait d'obtenir des

résultats similaires. Dans notre étude, nous avons modélisé la thérapie avec HU afin d'induire un état de tolérance aux allogreffes d'îlots. Dans notre modèle, le traitement transitoire durant 12 jours après greffe a permis d'induire un état de tolérance, chez 100% des animaux (n=3), au-delà de 54 jours. Ces animaux tolérants présentent également, comme dans le modèle TK^+/GCV^+, une augmentation significative de la population de lymphocytes T reg. Comme dans le modèle de gène suicide, cette augmentation du pourcentage de la population lymphocytaire T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ au sein de des CD4+ totaux est conséquente à une diminution du nombre de lymphocytes T $CD4^+$. En effet au niveau de la rate comme du greffon des animaux tolérants traités avec HU, plus de 20% des cellules $CD4^+$ sont $CD25^+FoxP3^+$, alors que seulement 13% des cellules $CD4^+$ sont $CD25^+$ $FoxP3^+$ chez les animaux allogreffés non traités avec HU. Cette perturbation de la balance cellules regulatrices / cellules effectrices favorise ainsi la tolérance de l'allogreffe. Cependant l'utilisation d'un traitement non spécifique tel que l'Hydroxyurea comporte de nombreux effets secondaires, même si dans nos conditions le traitement est transitoire et donc possiblement peu délétère.

5.6 Conclusion

L'intérêt majeur de notre étude est d'avoir démontré que la déplétion transitoire des cellules T alloréactives permet d'induire une perturbation de la balance homéostasique cellules effectrices/cellules régulattrices, à l'orginie d'un état de tolérance dominante vis-à-vis d'une allogreffe d'îlots pancréatiques. D'après nos résultats, nous montrons qu'un traitement au long cours n'est pas forcément nécessaire afin d'établir et de maintenir une tolérance immunitaire. Malheureusement, les tentatives d'induction de tolérance donnent des résultats forts intéressants dans les modèles expérimentaux chez les rongeurs, mais sont souvent très décevantes chez les gros animaux et chez l'Homme. Un des principaux atouts des expérimentations chez le rongeur est de clarifier les mécanismes immunorégulateurs et le lien entre les différentes populations cellulaires.

Il serait intéressant de trouver un moyen simple et efficace pour induire l'apoptose des cellules T alloréactives à partir du septième jour après la greffe afin ensuite de laisser place aux cellules régulatrices capables de maintenir la tolérance. L'étude du potentiel des cellules régulatrices ouvre un vaste champ de perspectives thérapeutiques.

PERSPECTIVES

L'intérêt des solutions de conservation de 4ème génération moins riches en potassium et contenant des PEG est grandissant même si plusieurs équipes hésitent encore à les utiliser en pratique clinique. Notre groupe continue à évaluer la solution SCOT et les PEG dans différents organes abdominaux dans notre modèle préclinique porcin. Au sein de ce modèle, il serait judicieux de tester la solution SCOT dans la préservation du pancréas avant l'isolement des îlots. Les îlots seraient isolés selon la procédure appliquée en clinique en y ajoutant la solution SCOT. Les îlots pourraient être cultivés durant 24h en présence de PEG réactifs 20kDa, lavés puis infusés dans le système porte chez un porc allogénique diabétique.

En clinique, nous pourrions envisager chez le donneur d'organes un premier lavage de l'organe avec une solution de rinçage contenant un anticoagulant pour supprimer les agrégats plaquettes et globules rouges. Les organes seraient ensuite préservés avec la solution SCOT en conservation statique. Si le greffon provient d'un donneur limite ou d'un DDAC, l'organe doit être préservé en machine de perfusion dans la solution de conservation recommandée. La conservation des organes sous perfusion a révélé de réels bénéfices sur la reprise de fonction des greffons rénaux humains [Moers C.2009] [Moers C.2012] et sur la conservation de l'intégrité tissulaire du pancréas porcin permettant un meilleur rendement d'îlots [Taylor MJ.2010] [Karcz M.2010]. Nous pourrions envisager alors, en fin de conservation dynamique, un rinçage des organes avec la solution SCOT juste avant l'implantation afin d'apporter les bénéfices des PEG. L'ajout des PEG pourraient, dans les premiers temps après transplantation, permettre de réduire les phénomènes inflammatoires et limiter l'alloreconnaissance. Cette période serait susceptible d'être bénéfique pour le greffon car il "serait libre d'être nettoyé" de ces cellules en voie d'apoptose et de nécrose. Puis la deuxième semaine après transplantation serait le temps idéal pour instaurer une thérapie transitoire immunomodulatrice visant à induire l'apoptose des cellules T alloréactives. Cette apoptose pourrait être induite par un apport exogène de HU ou d'un lentivirus, comprenant des anticorps anti CD3 à la surface (selon technique de Yan). Le gène suicide HSV1-TK, intégré dans le lentivirus, s'incorporerait dans l'ADN des cellules lymphocytaires T cibles, empêchant l'élongation de l'ADN de ces cellules en division. Ce modèle serait sous contrôle extérieur par administration exogène de Ganciclovir. Cette apoptose des cellules T autologues chez le receveur induirait un environnement immunorégulateur qui permettrait le maintien de la tolérance immunitaire vis-à-vis de l'allogreffe. La génération de cet environnement suppresseur pourrait également être induite par la réinjection de cellules dendritiques tolérogènes autologues ou de Treg autologues, ayant subis un traitement de modulation et/ou d'expansion *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE

Abuchowski A, McCoy JR, Palczuk NC, van Es T, Davis FF. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. The Journal of biological chemistry. 1977 Jun 10;252(11):3582-3586.
Adam R. Compared Efficacy of IGL-1 and UW Solution in Liver Transplantation. 2011;17:225.
Adorini L, Penna G, Giarratana N, Uskokovic M. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. Journal of cellular biochemistry. 2003 Feb 1;88(2):227-233.
Agence-de-Biomedecine. rapport annuel de l'Agence de Biomedecine. 2011.
Alcolado R, Arthur MJ, Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis. Clin Sci (Lond). 1997 Feb;92(2):103-112.
Allen DG, Xiao XH. Role of the cardiac Na+/H+ exchanger during ischemia and reperfusion. Cardiovascular research. 2003 Mar 15;57(4):934-941.
Alonso A, Fernandez-Rivera C, Villaverde P, Oliver J, Cillero S, Lorenzo D, Valdes F. Renal transplantation from non-heart-beating donors: a single-center 10-year experience. Transplantation proceedings. 2005 Nov;37(9):3658-3660.
Anaya-Prado R, Delgado-Vazquez JA. Scientific basis of organ preservation. Current opinion in organ transplantation. 2008 Apr;13(2):129-134.
Anderson CC, Matzinger P. Immunity or tolerance: opposite outcomes of microchimerism from skin grafts. Nature medicine. 2001 Jan;7(1):80-87.
Anderson MS, Su MA. Aire and T cell development. Current opinion in immunology. 2011 Apr;23(2):198-206.
Antoine C, Brun F, Tenaillon A, Loty B. [Organ procurement and transplantation from non-heart-beating donors]. Nephrologie & therapeutique. 2008 Feb;4(1):5-14.
Arumugam TV, Okun E, Tang SC, Thundyil J, Taylor SM, Woodruff TM. Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. Shock (Augusta, Ga. 2009 Jul;32(1):4-16.
Assalino M, Genevay M, Morel P, Demuylder-Mischler S, Toso C, Berney T. Recurrence of type 1 diabetes after simultaneous pancreas-kidney transplantation in the absence of GAD and IA-2 autoantibodies. Am J Transplant. 2012 Feb;12(2):492-495.
Auger S, Vallerand D, Haddad PS. Cold preservation-warm reperfusion perturbs cytosolic calcium ion homeostasis in rat liver sinusoidal endothelial cells. Liver Transpl. 2003 Feb;9(2):150-159.
Baatard R, Pradier F, Dantal J, Karam G, Cantarovich D, Hourmant M, Bourbigot B, Soulillou JP. Prospective randomized comparison of University of Wisconsin and UW-modified, lacking hydroxyethyl-starch, cold-storage solutions in kidney transplantation. Transplantation. 1993 Jan;55(1):31-35.
Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. Nature reviews. 2003 Mar;3(3):189-198.
Bach JF, Chatenoud L. Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. Annual review of immunology. 2001;19:131-161.
Baczkowska T, Perkowska-Ptasinska A, Sadowska A, Lewandowski Z, Nowacka-Cieciura E, Cieciura T, Pazik J, Lewandowska D, Mroz A, Urbanowicz A, Nazarewski S, Danielewicz R. Serum TGF-beta1 correlates with chronic histopathological lesions in protocol biopsies of kidney allograft recipients. Transplantation proceedings. 2005 Mar;37(2):773-775.
Badet L, Ben Abdennebi H, Petruzzo P, McGregor B, Espa M, Hadj-Aissa A, Ramella-Virieux S, Steghens JP, Portoghese F, Martin X. Effect of IGL-1, a new preservation solution, on kidney grafts (a pre-clinical study). Transpl Int. 2005 May;17(12):815-821.
Badet L, Eugene M, Hauet T, Barrou B. [The use of preservation solutions in renal transplantation]. Prog Urol. 2006 Feb;16(1):25-31.

Baertschiger RM, Berney T, Morel P. Organ preservation in pancreas and islet transplantation. Current opinion in organ transplantation. 2008 Feb;13(1):59-66.
Bailes BK. Diabetes mellitus and its chronic complications. AORN journal. 2002 Aug;76(2):266-276, 278-282; quiz 283-266.
Bamboat ZM, Ocuin LM, Balachandran VP, Obaid H, Plitas G, DeMatteo RP. Conventional DCs reduce liver ischemia/reperfusion injury in mice via IL-10 secretion. The Journal of clinical investigation. 2010 Feb;120(2):559-569.
Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998 Mar 19;392(6673):245-252.
Banovic T, MacDonald KP, Morris ES, Rowe V, Kuns R, Don A, Kelly J, Ledbetter S, Clouston AD, Hill GR. TGF-beta in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe? Blood. 2005 Sep 15;106(6):2206-2214.
Barba D, Hardin J, Sadelain M, Gage FH. Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994 May 10;91(10):4348-4352.
Barlow AD, Hosgood SA, Nicholson ML. Current State of Pancreas Preservation and Implications for DCD Pancreas Transplantation. Transplantation. 2013 Jun 27;95(12):1419-1424.
Barlow AD, Metcalfe MS, Johari Y, Elwell R, Veitch PS, Nicholson ML. Case-matched comparison of long-term results of non-heart beating and heart-beating donor renal transplants. The British journal of surgery. 2009 Jun;96(6):685-691.
Barrou B, Sylla C, Suberbielle C, Autran B, Debre P, Bitker MO. In vitro immunomodulation of human islet allografts using mixed islet lymphocyte coculture. Transplantation proceedings. 1997 Aug;29(5):2396.
Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B, Oberholzer J, Odorico JS, Garfinkel MR, Levy M, Pattou F, Berney T, Secchi A, Messinger S, Senior PA, Maffi P, Posselt A, Stock PG, Kaufman DB, Luo X, Kandeel F, Cagliero E, Turgeon NA, Witkowski P, Naji A, O'Connell PJ, Greenbaum C, Kudva YC, Brayman KL, Aull MJ, Larsen C, Kay TW, Fernandez LA, Vantyghem MC, Bellin M, Shapiro AM. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. Diabetes care. 2012 Jul;35(7):1436-1445.
Bauza G, Lima L, Le Moyec L, Gandjbakhch I, Eugene M. 12-hour preservation of rat hearts with "fabrique d'implants et d'instruments" or University of Wisconsin oxygenated microperfused cardioplegic solution. Transplantation proceedings. 1996a Oct;28(5):2899.
Bauza G, Lima L, Le Moyec L, Gandjbakhch I, Eugene M. Metabolic and functional effects of polyethylene glycol 20M and 2,3- butanedione monoxime during single flush or oxygenated microperfusion preservation: comparison with Plegisol. Transplantation proceedings. 1996b Feb;28(1):284-285.
Bellier B. Contrôle pharmacogénétique de la division lymphocytaire T chez la souris : effets sur le maintien de la mémoire immunologique et application aux pathologies immunitaires. Paris 5, Necker. 2004;N093.
Bennet W, Groth CG, Larsson R, Nilsson B, Korsgren O. Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes. Upsala journal of medical sciences. 2000;105(2):125-133.
Bennet W, Sundberg B, Groth CG, Brendel MD, Brandhorst D, Brandhorst H, Bretzel RG, Elgue G, Larsson R, Nilsson B, Korsgren O. Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation? Diabetes. 1999 Oct;48(10):1907-1914.

Bernard M, Chatenoud L, Compagnon P, Cuturi M, Durand F, Durrbach A, Grimbert P, Hauet T, Lang P, Legendre C, Morelon E, Samuel D, Sebbag L, Thabut G. Expertise collective Inserm, Transplantation d'organes. Quelles voies de recherche?, . Les éditions Inserm. 2009;1.

Bessems M, Doorschodt BM, Hooijschuur O, van Vliet AK, van Gulik TM. Optimization of a new preservation solution for machine perfusion of the liver: which is the preferred colloid? Transplantation proceedings. 2005 Jan-Feb;37(1):329-331.

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. Journal of leukocyte biology. 2007 Jan;81(1):1-5.

Biancone L, Cantaluppi V, Romanazzi GM, Russo S, Figliolini F, Beltramo S, Scalabrino E, Deregibus MC, Romagnoli R, Franchello A, Salizzoni M, Perin PC, Ricordi C, Segoloni GP, Camussi G. Platelet-activating factor synthesis and response on pancreatic islet endothelial cells: relevance for islet transplantation. Transplantation. 2006 Feb 27;81(4):511-518.

Bidmon B, Kratochwill K, Rusai K, Kuster L, Herzog R, Eickelberg O, Aufricht C. Increased immunogenicity is an integral part of the heat shock response following renal ischemia. Cell stress & chaperones. 2012 May;17(3):385-397.

Bidmon B, Kratochwill K, Rusai K, Kuster L, Herzog R, Eickelberg O, Aufricht C. Increased immunogenicity is an integral part of the heat shock response following renal ischemia. Cell stress & chaperones. 2011 May;17(3):385-397.

Billault C, Vaessen C, Van Glabeke E, Rolland E, Ourahma S, Dimitru L, Richard F, Eugene M, Barrou B. Use of the SCOT solution in kidney transplantation: preliminary report. Transplantation proceedings. 2006 Sep;38(7):2281-2282.

Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature. 1953 Oct 3;172(4379):603-606.

Bingaman AW, Ha J, Waitze SY, Durham MM, Cho HR, Tucker-Burden C, Hendrix R, Cowan SR, Pearson TC, Larsen CP. Vigorous allograft rejection in the absence of danger. J Immunol. 2000 Mar 15;164(6):3065-3071.

Bittencourt MC, Perruche S, Contassot E, Fresnay S, Baron MH, Angonin R, Aubin F, Herve P, Tiberghien P, Saas P. Intravenous injection of apoptotic leukocytes enhances bone marrow engraftment across major histocompatibility barriers. Blood. 2001 Jul 1;98(1):224-230.

Bloomgarden ZT. Diabetes complications. Diabetes care. 2004 Jun;27(6):1506-1514.

Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. Nature reviews. 2003 Mar;3(3):253-257.

Bogatcheva NV, Verin AD. The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function. Microvascular research. 2008 Nov;76(3):202-207.

Bon D, Chatauret N, Giraud S, Thuillier R, Favreau F, Hauet T. New strategies to optimize kidney recovery and preservation in transplantation. Nat Rev Nephrol. 2012 Jun;8(6):339-347.

Boni LT, Hah JS, Hui SW, Mukherjee P, Ho JT, Jung CY. Aggregation and fusion of unilamellar vesicles by poly(ethylene glycol). Biochimica et biophysica acta. 1984 Sep 5;775(3):409-418.

Bonventre JV, Cheung JY. Effects of metabolic acidosis on viability of cells exposed to anoxia. The American journal of physiology. 1985 Jul;249(1 Pt 1):C149-159.

Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. The New England journal of medicine. 1994 Nov 10;331(19):1286-1292.

Borot S, Niclauss N, Wojtusciszyn A, Brault C, Demuylder-Mischler S, Muller Y, Giovannoni L, Parnaud G, Meier R, Badet L, Bayle F, Frimat L, Kessler L, Morelon E, Penfornis A, Thivolet C, Toso C, Morel P, Bosco D, Colin C, Benhamou PY, Berney T.

Impact of the number of infusions on 2-year results of islet-after-kidney transplantation in the GRAGIL network. Transplantation. 2011 Nov 15;92(9):1031-1038.
Bosi E, Bottazzo GF, Secchi A, Pozza G, Shattock M, Saunders A, Gelet A, Touraine JL, Traeger J, Dubernard JM. Islet cell autoimmunity in type I diabetic patients after HLA-mismatched pancreas transplantation. Diabetes. 1989 Jan;38 Suppl 1:82-84.
Boyer O, Cohen JL, Bellier B, Thomas-Vaslin V, Klatzmann D, Saron MF. Transient control of a virus-induced immunopathology by genetic immunosuppression. Gene therapy. 2000 Sep;7(18):1536-1542.
Boyer O, Zhao JC, Cohen JL, Depetris D, Yagello M, Lejeune L, Bruel S, Mattei MG, Klatzmann D. Position-dependent variegation of a CD4 minigene with targeted expression to mature CD4+ T cells. J Immunol. 1997 Oct 1;159(7):3383-3390.
Bradley AJ, Murad KL, Regan KL, Scott MD. Biophysical consequences of linker chemistry and polymer size on stealth erythrocytes: size does matter. Biochimica et biophysica acta. 2002 Apr 12;1561(2):147-158.
Braunberger E, Cohen JL, Boyer O, Pegaz-Fiornet B, Raynal-Raschilas N, Bruneval P, Thomas-Vaslin V, Bellier B, Carpentier A, Glotz D, Klatzmann D. T-Cell suicide gene therapy for organ transplantation: induction of long-lasting tolerance to allogeneic heart without generalized immunosuppression. Mol Ther. 2000a Dec;2(6):596-601.
Braunberger E, Raynal-Raschilas N, Thomas-Vaslin V, Bruneval P, Fabiani JN, Carpentier A, Glotz D, Klatzmann D. Tolerance induced without immunosuppression in a T-lymphocyte suicide-gene therapy cardiac allograft model in mice. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 2000b Jan;119(1):46-51.
Brendel M, Hering B, Schulz A, Bretzel R. International Islet Transplant Registry report. Giessen. 1999(1-20).
Brissova M, Fowler M, Wiebe P, Shostak A, Shiota M, Radhika A, Lin PC, Gannon M, Powers AC. Intraislet endothelial cells contribute to revascularization of transplanted pancreatic islets. Diabetes. 2004 May;53(5):1318-1325.
Brissova M, Powers AC. Revascularization of transplanted islets: can it be improved? Diabetes. 2008 Sep;57(9):2269-2271.
Brunicardi FC, Stagner J, Bonner-Weir S, Wayland H, Kleinman R, Livingston E, Guth P, Menger M, McCuskey R, Intaglietta M, Charles A, Ashley S, Cheung A, Ipp E, Gilman S, Howard T, Passaro E, Jr. Microcirculation of the islets of Langerhans. Long Beach Veterans Administration Regional Medical Education Center Symposium. Diabetes. 1996 Apr;45(4):385-392.
Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, Moerer O, Gruendling M, Oppert M, Grond S, Olthoff D, Jaschinski U, John S, Rossaint R, Welte T, Schaefer M, Kern P, Kuhnt E, Kiehntopf M, Hartog C, Natanson C, Loeffler M, Reinhart K. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. The New England journal of medicine. 2008 Jan 10;358(2):125-139.
Bucher P, Mathe Z, Bosco D, Becker C, Kessler L, Greget M, Benhamou PY, Andres A, Oberholzer J, Buhler L, Morel P, Berney T. Morbidity associated with intraportal islet transplantation. Transplantation proceedings. 2004 May;36(4):1119-1120.
Bucher P, Mathe Z, Morel P, Bosco D, Andres A, Kurfuest M, Friedrich O, Raemsch-Guenther N, Buhler LH, Berney T. Assessment of a novel two-component enzyme preparation for human islet isolation and transplantation. Transplantation. 2005 Jan 15;79(1):91-97.
Bunnag SC, Bunnag S, Warner NE. Microcirculation in the islets of Langerhans of the mouse. The Anatomical record. 1963 Jun;146:117-123.

Burchenal JE, Deible CR, Deglau TE, Russell AJ, Beckman EJ, Wagner WR. Polyethylene glycol diisocyanate decreases platelet deposition after balloon injury of rabbit femoral arteries. Journal of thrombosis and thrombolysis. 2002 Feb;13(1):27-33.

Carlsson PO, Liss P, Andersson A, Jansson L. Measurements of oxygen tension in native and transplanted rat pancreatic islets. Diabetes. 1998 Jul;47(7):1027-1032.

Carlsson PO, Palm F, Mattsson G. Low revascularization of experimentally transplanted human pancreatic islets. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2002 Dec;87(12):5418-5423.

Caroppi P, Sinibaldi F, Fiorucci L, Santucci R. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein. Current medicinal chemistry. 2009;16(31):4058-4065.

Carroll P. Anatomy and physiology of islets of Langerhans, in Pancreatic Islet Cell Transplantation Ricordi C editions. 1992;1:7–18.

Caruso M, Klatzmann D. Selective killing of CD4+ cells harboring a human immunodeficiency virus-inducible suicide gene prevents viral spread in an infected cell population. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992 Jan 1;89(1):182-186.

Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzmann JL, Klatzmann D. Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993 Aug 1;90(15):7024-7028.

Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, Nghiem D, Miracle K, Fung JJ, Starzl TE. Liver and kidney transplantation from non-heart beating donors: the Pittsburgh experience. Transplantation proceedings. 1995 Feb;27(1):710-712.

Cavallo MG, Baroni MG, Toto A, Gearing AJ, Forsey T, Andreani D, Thorpe R, Pozzilli P. Viral infection induces cytokine release by beta islet cells. Immunology. 1992 Apr;75(4):664-668.

Chalasani G, Li Q, Konieczny BT, Smith-Diggs L, Wrobel B, Dai Z, Perkins DL, Baddoura FK, Lakkis FG. The allograft defines the type of rejection (acute versus chronic) in the face of an established effector immune response. J Immunol. 2004 Jun 15;172(12):7813-7820.

Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. Circulation. 2001 May 8;103(18):2296-2302.

Chapel H, Haeney M, Misbah S, Snowden N. Immunologie clinique: De la théorie à la pratique, avec cas cliniques. Editions De Boeck Supérieur. 2004.

Chappell D, Dorfler N, Jacob M, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion. Shock (Augusta, Ga. 2012 Aug;34(2):133-139.

Chatenoud L. Immunité de greffe. In: Bach JF : Traité d'Immunologie. Flammarion. 1993;1ere édition.

Chatenoud L, Cavaillon J. Cytokines et transplantation. In: : Les cytokines. . Masson,. 1996;2éme édition:567-576.

Chavalitdhamrong D, Gill J, Takemoto S, Madhira BR, Cho YW, Shah T, Bunnapradist S. Patient and graft outcomes from deceased kidney donors age 70 years and older: an analysis of the Organ Procurement Transplant Network/United Network of Organ Sharing database. Transplantation. 2008 Jun 15;85(11):1573-1579.

Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nature reviews. 2010 Dec;10(12):826-837.

Chen W, Wahl SM. TGF-beta: receptors, signaling pathways and autoimmunity. Current directions in autoimmunity. 2002;5:62-91.
Chen Y, Sun R, Guan T, Zhang H. [The Raman spectra study on crystal-octadecyl hydrogen succinate crystal]. Guang pu xue yu guang pu fen xi = Guang pu. 2001 Apr;21(2):202-203.
Cheng X, Yu X, Ding YJ, Fu QQ, Xie JJ, Tang TT, Yao R, Chen Y, Liao YH. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. Clinical immunology (Orlando, Fla. 2008 Apr;127(1):89-97.
Chiang ET, Camp SM, Dudek SM, Brown ME, Usatyuk PV, Zaborina O, Alverdy JC, Garcia JG. Protective effects of high-molecular weight polyethylene glycol (PEG) in human lung endothelial cell barrier regulation: role of actin cytoskeletal rearrangement. Microvascular research. 2009 Mar;77(2):174-186.
Chowdhury NC, Saborio DV, Garrovillo M, Chandraker A, Magee CC, Waaga AM, Sayegh MH, Jin MX, Oluwole SF. Comparative studies of specific acquired systemic tolerance induced by intrathymic inoculation of a single synthetic Wistar-Furth (RT1U) allo-MHC class I (RT1.AU) peptide or WAG (RT1U)-derived class I peptide. Transplantation. 1998 Oct 27;66(8):1059-1066.
Christie MR, Tun RY, Lo SS, Cassidy D, Brown TJ, Hollands J, Shattock M, Bottazzo GF, Leslie RD. Antibodies to GAD and tryptic fragments of islet 64K antigen as distinct markers for development of IDDM. Studies with identical twins. Diabetes. 1992 Jul;41(7):782-787.
CITR. Annual repport of Collaborative Islet Transplant Registry 2010.
Cittanova ML, Leblanc I, Legendre C, Mouquet C, Riou B, Coriat P. Effect of hydroxyethylstarch in brain-dead kidney donors on renal function in kidney-transplant recipients. Lancet. 1996 Dec 14;348(9042):1620-1622.
Cobbold SP, Nolan KF, Graca L, Castejon R, Le Moine A, Frewin M, Humm S, Adams E, Thompson S, Zelenika D, Paterson A, Yates S, Fairchild PJ, Waldmann H. Regulatory T cells and dendritic cells in transplantation tolerance: molecular markers and mechanisms. Immunological reviews. 2003 Dec;196:109-124.
Codas R, Petruzzo P, Morelon E, Lefrancois N, Danjou F, Berthillot C, Contu P, Espa M, Martin X, Badet L. IGL-1 solution in kidney transplantation: first multi-center study. Clinical transplantation. 2009 Jun-Jul;23(3):337-342.
Cohen JL, Boyer O, Salomon B, Onclerco R, Depetris D, Lejeune L, Dubus-Bonnet V, Bruel S, Charlotte F, Mattei MG, Klatzmann D. Fertile homozygous transgenic mice expressing a functional truncated herpes simplex thymidine kinase delta TK gene. Transgenic research. 1998 Sep;7(5):321-330.
Cohen JL, Boyer O, Salomon B, Onclercq R, Charlotte F, Bruel S, Boisserie G, Klatzmann D. Prevention of graft-versus-host disease in mice using a suicide gene expressed in T lymphocytes. Blood. 1997 Jun 15;89(12):4636-4645.
Cohen JL, Lacroix-Desmazes S, Charlotte F, Lejeune L, Martin PJ, Klatzmann D, Boyer O. Immunological defects after suicide gene therapy of experimental graft-versus-host disease. Human gene therapy. 1999 Nov 1;10(16):2701-2707.
Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. Lancet. 1969 Dec 6;2(7632):1219-1222.
Collins GM, Wicomb WN. New organ preservation solutions. Kidney Int Suppl. 1992 Oct;38:S197-202.
Collins GM, Wicomb WN, Levin BS, Verma S, Avery J, Hill JD. Heart preservation solution containing polyethyleneglycol: an immunosuppressive effect? Lancet. 1991 Oct 5;338(8771):890-891.

Colombani J. HLA, Le complexe majeur de presentation et d'histocompatiblité humain. Fonctions immunitaires et applications médicales. Editions John Libbey Eurotext, Paris. 1993;1ere édition:205-216.
Colovai AI, Mirza M, Vlad G, Wang S, Ho E, Cortesini R, Suciu-Foca N. Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients. Human immunology. 2003 Jan;64(1):31-37.
Contassot E, Ferrand C, Angonin R, Cohen JL, de Carvalho Bittencourt M, Lorchel F, Laithier V, Cahn JY, Klatzmann D, Herve P, Tiberghien P. Ganciclovir-sensitive acute graft-versus-host disease in mice receiving herpes simplex virus-thymidine kinase-expressing donor T cells in a bone marrow transplantation setting. Transplantation. 2000 Feb 27;69(4):503-508.
Contreras JL, Eckstein C, Smyth CA, Bilbao G, Vilatoba M, Ringland SE, Young C, Thompson JA, Fernandez JA, Griffin JH, Eckhoff DE. Activated protein C preserves functional islet mass after intraportal transplantation: a novel link between endothelial cell activation, thrombosis, inflammation, and islet cell death. Diabetes. 2004 Nov;53(11):2804-2814.
Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. Nature. 2000 Sep 14;407(6801):258-264.
Coupes BM, Newstead CG, Short CD, Brenchley PE. Transforming growth factor beta 1 in renal allograft recipients. Transplantation. 1994 Jun 27;57(12):1727-1731.
Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. The Biochemical journal. 1999 Jul 15;341 (Pt 2):233-249.
Culver KW, Van Gilder J, Link CJ, Carlstrom T, Buroker T, Yuh W, Koch K, Schabold K, Doornbas S, Wetjen B, et al. Gene therapy for the treatment of malignant brain tumors with in vivo tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene/ganciclovir system. Human gene therapy. 1994 Mar;5(3):343-379.
Daemen JH, de Wit RJ, Bronkhorst MW, Yin M, Heineman E, Kootstra G. Non-heart-beating donor program contributes 40% of kidneys for transplantation. Transplantation proceedings. 1996 Feb;28(1):105-106.
Daemen JW, Kootstra G, Wijnen RM, Yin M, Heineman E. Nonheart-beating donors: the Maastricht experience. Clinical transplants. 1994:303-316.
Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen HR, Luo W, Zeller K, Shimoda L, Topalian SL, Semenza GL, Dang CV, Pardoll DM, Pan F. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. Cell. 2011 Sep 2;146(5):772-784.
Daniel M, Wakerley C. Factors influencing the survival of cell monolayers during storage at 4 degrees. British journal of experimental pathology. 1976 Apr;57(2):137-147.
Davies MG, Huynh TT, Fulton GJ, Svendsen E, Brockbank FG, Hagen PO. Controlling transplant vasculopathy in cryopreserved vein grafts with polyethylene glycol and glutathione during transport. Eur J Vasc Endovasc Surg. 1999 Jun;17(6):493-500.
De Perrot M, Sekine Y, Fischer S, Waddell TK, McRae K, Liu M, Wigle DA, Keshavjee S. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. American journal of respiratory and critical care medicine. 2002 Jan 15;165(2):211-215.
Deible CR, Beckman EJ, Russell AJ, Wagner WR. Creating molecular barriers to acute platelet deposition on damaged arteries with reactive polyethylene glycol. Journal of biomedical materials research. 1998 Aug;41(2):251-256.
Delgrange E. Intérêt clinique de nouveaux marqueurs immunologiques du diabète sucré. Louvain Med. 2001;120:7-9.

Deol HS, Tuch BE. Immunomodulation of fetal pig islet-like cell clusters by gamma-irradiation. Xenotransplantation. 1999 May;6(2):141-146.
Descorps J. Toxiques non médicamenteux. Urgences en toxicologie. 1992.
DeVries ME, Hosiawa KA, Cameron CM, Bosinger SE, Persad D, Kelvin AA, Coombs JC, Wang H, Zhong R, Cameron MJ, Kelvin DJ. The role of chemokines and chemokine receptors in alloantigen-independent and alloantigen-dependent transplantation injury. Seminars in immunology. 2003 Feb;15(1):33-48.
Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. The Journal of experimental medicine. 2001 Jan 15;193(2):233-238.
Diaz JL, Ways J, Hammonds P. T-lymphocyte lines specific for glutamic acid decarboxylase (GAD) the 64K beta-cell antigen of IDDM. Diabetes. 1992 Jan;41(1):118-121.
Dilek N, Poirier N, Usal C, Martinet B, Blancho G, Vanhove B. Control of transplant tolerance and intragraft regulatory T cell localization by myeloid-derived suppressor cells and CCL5. J Immunol. 2012a May 1;188(9):4209-4216.
Dilek N, Vuillefroy de Silly R, Blancho G, Vanhove B. Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. Frontiers in immunology. 2012b;3:208.
Dong H, Fahmy TM, Metcalfe SM, Morton SL, Dong X, Inverardi L, Adams DB, Gao W, Wang H. Immuno-isolation of pancreatic islet allografts using pegylated nanotherapy leads to long-term normoglycemia in full MHC mismatch recipient mice. PloS one. 2012;7(12):e50265.
Doshi MD, Hunsicker LG. Short- and long-term outcomes with the use of kidneys and livers donated after cardiac death. Am J Transplant. 2007 Jan;7(1):122-129.
Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, Vuillefroy de Silly R, Usal C, Smit H, Martinet B, Thebault P, Renaudin K, Vanhove B. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. J Immunol. 2008 Jun 15;180(12):7898-7906.
Dumitriu IE, Baruah P, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. European journal of immunology. 2005 Jul;35(7):2184-2190.
Dustin ML. Membrane domains and the immunological synapse: keeping T cells resting and ready. The Journal of clinical investigation. 2002 Jan;109(2):155-160.
Dutheil D, Rioja-Pastor I, Tallineau C, Goujon JM, Hauet T, Mauco G, Petit-Paris I. Protective effect of PEG 35,000 Da on renal cells: paradoxical activation of JNK signaling pathway during cold storage. Am J Transplant. 2006 Jul;6(7):1529-1540.
Dutheil D, Underhaug Gjerde A, Petit-Paris I, Mauco G, Holmsen H. Polyethylene glycols interact with membrane glycerophospholipids: is this part of their mechanism for hypothermic graft protection? Journal of chemical biology. 2009 Mar;2(1):39-49.
Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol. 1996 Dec;7(12):2495-2508.
el-Agroudy AE, Hassan NA, Foda MA, Ismail AM, el-Sawy EA, Mousa O, Ghoneim MA. Effect of angiotensin II receptor blocker on plasma levels of TGF-beta 1 and interstitial fibrosis in hypertensive kidney transplant patients. American journal of nephrology. 2003 Sep-Oct;23(5):300-306.
Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. Nature medicine. 2011;17(11):1391-1401.
Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. Nature medicine. 2012;17(11):1391-1401.

Eugene M. Polyethyleneglycols and immunocamouflage of the cells tissues and organs for transplantation. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France). 2004 May;50(3):209-215.
Eugene M, Gerota J. Cryopreserved aortic allograft replacement of infected prosthetic grafts in man: processing and clinical results. Transpl Int. 1998;11 Suppl 1:S452-454.
Eugene M, Hauet T, Mothes D, Goujon JM, Le Moyec L, Carretier M, Caritez JC. Beneficial effects of a low-potassium+ and polyethylene glycol solution on renal function and structure during 48-hour cold storage preservation. Transplantation proceedings. 1997 Aug;29(5):2360-2362.
Ezzeddine ZD, Martuza RL, Platika D, Short MP, Malick A, Choi B, Breakefield XO. Selective killing of glioma cells in culture and in vivo by retrovirus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. The New biologist. 1991 Jun;3(6):608-614.
Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. The Journal of clinical investigation. 1998 Feb 15;101(4):890-898.
Farney AC, Xenos E, Sutherland DE, Widmer M, Stephanian E, Field MJ, Kaufman DB, Stevens RB, Blazar B, Platt J, et al. Inhibition of pancreatic islet beta cell function by tumor necrosis factor is blocked by a soluble tumor necrosis factor receptor. Transplantation proceedings. 1993 Feb;25(1 Pt 2):865-866.
Faure JP, Hauet T, Han Z, Goujon JM, Petit I, Mauco G, Eugene M, Carretier M, Papadopoulos V. Polyethylene glycol reduces early and long-term cold ischemia-reperfusion and renal medulla injury. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2002 Sep;302(3):861-870.
Faure JP, Petit I, Zhang K, Dutheil D, Doucet C, Favreau F, Eugene M, Goujon JM, Tillement JP, Mauco G, Vandewalle A, Hauet T. Protective roles of polyethylene glycol and trimetazidine against cold ischemia and reperfusion injuries of pig kidney graft. Am J Transplant. 2004 Apr;4(4):495-504.
Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, Dykstra DM, Punch JD, DebRoy MA, Greenstein SM, Merion RM. Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. Am J Transplant. 2006 Apr;6(4):783-790.
Feng XN, Xu X, Zheng SS. Current status and perspective of liver preservation solutions. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2006 Nov;5(4):490-494.
Field AC, Caccavelli L, Bloch MF, Bellon B. Regulatory CD8+ T cells control neonatal tolerance to a Th2-mediated autoimmunity. J Immunol. 2003 Mar 1;170(5):2508-2515.
Filippi C, von Herrath M. How viral infections affect the autoimmune process leading to type 1 diabetes. Cellular immunology. 2005 Feb;233(2):125-132.
Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. Biochimie. 2002 Feb-Mar;84(2-3):131-141.
Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nature immunology. 2003 Apr;4(4):330-336.
Fornas D. Solution de preservation d'organe : descriptif, statut reglemenatire et enregistrement en Europe. Université Claude Bernard. 2001.
Fridell JA, Mangus RS, Powelson JA. Organ preservation solutions for whole organ pancreas transplantation. Current opinion in organ transplantation. 2010 Dec 9.
Fruijtier-Polloth C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. Toxicology. 2005 Oct 15;214(1-2):1-38.
Fu S, Yopp AC, Mao X, Chen D, Zhang N, Chen D, Mao M, Ding Y, Bromberg JS. CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. Am J Transplant. 2004 Jan;4(1):65-78.

Fyfe JA, Keller PM, Furman PA, Miller RL, Elion GB. Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. The Journal of biological chemistry. 1978 Dec 25;253(24):8721-8727.

Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. Nature medicine. 1999 Nov;5(11):1249-1255.

Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. Current opinion in immunology. 2001 Feb;13(1):114-119.

Ganote CE, Worstell J, Iannotti JP, Kaltenbach JP. Cellular swelling and irreversible myocardial injury. Effects of polyethylene glycol and mannitol in perfused rat hearts. The American journal of pathology. 1977 Jul;88(1):95-118.

Gao Q, Ma LL, Gao X, Yan W, Williams P, Yin DP. TLR4 mediates early graft failure after intraportal islet transplantation. Am J Transplant. 2012 Jul;10(7):1588-1596.

Gao Q, Ma LL, Gao X, Yan W, Williams P, Yin DP. TLR4 mediates early graft failure after intraportal islet transplantation. Am J Transplant. 2010 Jul;10(7):1588-1596.

Garlicki M, Kolcz J, Rudzinski P, Kapelak B, Sadowski J, Wojcik S, Pietrzyk E, Frasik W, Drukala J, Dziatkowiak A. Myocardial protection for transplantation. Transplantation proceedings. 1999 Aug;31(5):2079-2083.

Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. Immunology. 1971 Dec;21(6):903-914.

Giannoukakis N, Rudert WA, Ghivizzani SC, Gambotto A, Ricordi C, Trucco M, Robbins PD. Adenoviral gene transfer of the interleukin-1 receptor antagonist protein to human islets prevents IL-1beta-induced beta-cell impairment and activation of islet cell apoptosis in vitro. Diabetes. 1999 Sep;48(9):1730-1736.

Gibelin H, Hauet T, Eugene M, Essique D, Levillain P, Carretier M. Beneficial effects of addition of polyethylene glycol to extracellular type solutions to minimize ischemia/reperfusion injuries in an isolated-perfused rat liver model. Transplantation proceedings. 2002 May;34(3):768.

Gillard P, Lannoo M, Keymeulen B, Mathieu C. Traitement du diabète par la greffe d'îlots. Medecine et Sciences, Actualités nephrologiques 2004.

Giraud S, Bon D, Neuzillet Y, Thuillier R, Eugene M, Hauet T, Barrou B. Concentration and chain length of Polyethylene Glycol in islet isolation solution, evaluation in a pancreatic islet transplantation model. Cell transplantation. 2012 Apr 10.

Giraud S, Claire B, Eugene M, Debre P, Richard F, Barrou B. A new preservation solution increases islet yield and reduces graft immunogenicity in pancreatic islet transplantation. Transplantation. 2007 May 27;83(10):1397-1400.

Gok MA, Buckley PE, Shenton BK, Balupuri S, El-Sheikh MA, Robertson H, Soomro N, Jaques BC, Manas DM, Talbot D. Long-term renal function in kidneys from non-heart-beating donors: A single-center experience. Transplantation. 2002 Sep 15;74(5):664-669.

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Immunologie, le cours de Janis Kuby. Editions Dunod. 2001.

Golshayan D, Buhler L, Lechler RI, Pascual M. From current immunosuppressive strategies to clinical tolerance of allografts. Transpl Int. 2007 Jan;20(1):12-24.

Graca L, Le Moine A, Cobbold SP, Waldmann H. Dominant transplantation tolerance. Opinion. Current opinion in immunology. 2003 Oct;15(5):499-506.

Greenwald RB. PEG drugs: an overview. J Control Release. 2001 Jul 6;74(1-3):159-171.

Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Domb A, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. Poly(ethylene glycol)-coated nanospheres: potential carriers for intravenous drug administration. Pharmaceutical biotechnology. 1997;10:167-198.

Grimaldi A. Guide pratique du diabète. 1998.

Group TDCaCTR. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The New England journal of medicine. 1993 Sep 30;329(14):977-986.
Group TDCaCTR. Hypoglycemia in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Diabetes. 1997 Feb;46(2):271-286.
Group U. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet. 1998 Sep 12;352(9131):837-853.
Group WHIT. Autoimmunity after islet-cell allotransplantation. The New England journal of medicine. 2006 Sep 28;355(13):1397-1399.
Gute D, Korthuis RJ. Role of leukocyte adherence in reperfusion-induced micro-vascular dysfunction and tissue injury. . Oxford University Press, Granger, DN, Schmid-Schonbein, GW (Eds), Leukocyte Adhesion. 1995.
Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. Molecular and cellular biochemistry. 1998 Feb;179(1-2):169-187.
Halloran PF, Homik J, Goes N, Lui SL, Urmson J, Ramassar V, Cockfield SM. The "injury response": a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes. Transplantation proceedings. 1997 Feb-Mar;29(1-2):79-81.
Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG. alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. The Journal of experimental medicine. 1998 Apr 6;187(7):1047-1056.
Han D, Xu X, Baidal D, Leith J, Ricordi C, Alejandro R, Kenyon NS. Assessment of cytotoxic lymphocyte gene expression in the peripheral blood of human islet allograft recipients: elevation precedes clinical evidence of rejection. Diabetes. 2004 Sep;53(9):2281-2290.
Hanley SC, Paraskevas S, Rosenberg L. Donor and isolation variables predicting human islet isolation success. Transplantation. 2008 Apr 15;85(7):950-955.
Hata K, Tolba RH, Wei L, Doorschodt BM, Buttner R, Yamamoto Y, Minor T. Impact of polysol, a newly developed preservation solution, on cold storage of steatotic rat livers. Liver Transpl. 2007 Jan;13(1):114-121.
Hauet T, Baumert H, Amor IB, Goujon JM, Gibelin H, Godart C, Vandewalle A, Carretier M, Eugene M. Protection of autotransplanted pig kidneys from ischemia-reperfusion injury by polyethylene glycol. Transplantation. 2000 Dec 15;70(11):1569-1575.
Hauet T, Eugene M. A new approach in organ preservation: potential role of new polymers. Kidney international. 2008 Oct;74(8):998-1003.
Hauet T, Faure JP, Baumert H, Bardou A, Gibelin H, Beguinot S, Germonville T, Hebrard W, Choulet P, Carretier M, Eugene M. Influence of different colloids on hemodynamic and renal functions: comparative study in an isolated perfused pig kidney model. Transplantation proceedings. 1998 Sep;30(6):2796-2797.
Hauet T, Goujon JM, Baumert H, Petit I, Carretier M, Eugene M, Vandewalle A. Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotransplanted pig kidneys. Kidney international. 2002 Aug;62(2):654-667.
Hauet T, Han Z, Doucet C, Ramella-Virieux S, Hadj Aissa A, Carretier M, Papadopoulos V. A modified University of Wisconsin preservation solution with high-NA+ low-K+ content

reduces reperfusion injury of the pig kidney graft. Transplantation. 2003 Jul 15;76(1):18-27.
Hauet T, Mothes D, Goujon JM, Carretier M, Eugene M. Protective effect of polyethylene glycol against prolonged cold ischemia and reperfusion injury: study in the isolated perfused rat kidney. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2001 Jun;297(3):946-952.
Haug CE, Colvin RB, Delmonico FL, Auchincloss H, Jr., Tolkoff-Rubin N, Preffer FI, Rothlein R, Norris S, Scharschmidt L, Cosimi AB. A phase I trial of immunosuppression with anti-ICAM-1 (CD54) mAb in renal allograft recipients. Transplantation. 1993 Apr;55(4):766-772; discussion 772-763.
Held W, MacDonald HR, Weissman IL, Hess MW, Mueller C. Genes encoding tumor necrosis factor alpha and granzyme A are expressed during development of autoimmune diabetes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1990 Mar;87(6):2239-2243.
Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, Eckman PM, Nakano M, Sawada T, Matsumoto I, Ihm SH, Zhang HJ, Parkey J, Hunter DW, Sutherland DE. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. Jama. 2005 Feb 16;293(7):830-835.
Hernandez-Alejandro R, Caumartin Y, Chent C, Levstik MA, Quan D, Muirhead N, House AA, McAlister V, Jevnikar AM, Luke PP, Wall W. Kidney and liver transplants from donors after cardiac death: initial experience at the London Health Sciences Centre. Canadian journal of surgery. 2010 Apr;53(2):93-102.
Hicks M, Hing A, Gao L, Ryan J, Macdonald PS. Organ preservation. Methods in molecular biology (Clifton, NJ. 2006;333:331-374.
Hill J. Identifying and managing the complications of diabetes. Nursing times. 2004 Aug 24-30;100(34):40-44.
Hoffmann SC, Kampen RL, Amur S, Sharaf MA, Kleiner DE, Hunter K, John Swanson S, Hale DA, Mannon RB, Blair PJ, Kirk AD. Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury. Transplantation. 2002 Oct 15;74(7):916-923.
Homberg JC. Immunologie fondamentale. Editions Estem. 1999;1éme édition:203-208.
Hoogland ER, Snoeijs MG, van Heurn LW. DCD kidney transplantation: results and measures to improve outcome. Current opinion in organ transplantation. 2010 Apr;15(2):177-182.
Hubert T, Gmyr V, Arnalsteen L, Jany T, Triponez F, Caiazzo R, Vandewalle B, Vantyghem MC, Kerr-Conte J, Pattou F. Influence of preservation solution on human islet isolation outcome. Transplantation. 2007 Feb 15;83(3):270-276.
Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, Debes GF, Lauber J, Frey O, Przybylski GK, Niesner U, de la Rosa M, Schmidt CA, Brauer R, Buer J, Scheffold A, Hamann A. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. The Journal of experimental medicine. 2004 Feb 2;199(3):303-313.
Hui SW. Use of poly(ethylene glycol) to control cell aggregation and fusion. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 1999 Jun;14:213-222.
Hunger RE, Carnaud C, Garcia I, Vassalli P, Mueller C. Prevention of autoimmune diabetes mellitus in NOD mice by transgenic expression of soluble tumor necrosis factor receptor p55. European journal of immunology. 1997 Jan;27(1):255-261.
Hwang JW, Jung HS, Lee DY. Inhibition of platelet adhesion onto intrahepatically transplanted islets using PEGylation for attenuating instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR). J Control Release. 2011 Nov 30;152 Suppl 1:e213-214.

Inserm. Transplantation d'organes - Quelles voies de recherche ? Rapport d'expertise Inserm. Editions Inserm. 2009.
Inverardi L, Ricordi C. Tolerance and pancreatic islet transplantation. Philosophical transactions of the Royal Society of London. 2001 May 29;356(1409):759-765.
Itasaka H, Burns W, Wicomb WN, Egawa H, Collins G, Esquivel CO. Modification of rejection by polyethylene glycol in small bowel transplantation. Transplantation. 1994 Mar 15;57(5):645-648.
Itasaka H, Wicomb WN, Burns W, Tokunaga Y, Nakazato P, Collins GM, Esquivel CO. Effect of polyethylene glycol on rat small bowel rejection. Transplantation proceedings. 1992 Jun;24(3):1179-1180.
Iwanaga Y, Sutherland DE, Harmon JV, Papas KK. Pancreas preservation for pancreas and islet transplantation. Current opinion in organ transplantation. 2008 Aug;13(4):445-451.
Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, Eisenbarth SC, Florquin S, Flavell RA, Leemans JC, Sutterwala FS. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009 Dec 1;106(48):20388-20393.
J D. Toxiques non médicamenteux. Urgences en toxicologie. 1992.
Jamart J, Lambotte L. Efficiency and limitation of Euro-Collins solution in kidney preservation. The Journal of surgical research. 1983 Mar;34(3):195-204.
James T, Jin MX, Chowdhury NC, Oluwole SF. Tolerance induction to rat islet allografts by intrathymic inoculation of donor spleen cells. Transplantation. 1993 Nov;56(5):1148-1152.
Jamieson RW, Friend PJ. Organ reperfusion and preservation. Front Biosci. 2008;13:221-235.
Jang JY, Lee DY, Park SJ, Byun Y. Immune reactions of lymphocytes and macrophages against PEG-grafted pancreatic islets. Biomaterials. 2004 Aug;25(17):3663-3669.
Jassem W, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. Kidney international. 2004 Aug;66(2):514-517.
Jayle C, Corbi P, Eugene M, Carretier M, Hebrard W, Menet E, Hauet T. Beneficial effect of polyethylene glycol in lung preservation: early evaluation by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. The Annals of thoracic surgery. 2003 Sep;76(3):896-902.
Jayle C, Hauet T, Menet E, Hebrard W, Hameury F, Eugene M, Carretier M, Corbi P. Beneficial effects of polyethylene glycol combined with low-potassium solution against lung ischemia/reperfusion injury in an isolated, perfused, functional pig lung. Transplantation proceedings. 2002 May;34(3):834-835.
Jeong JH, Hong SW, Hong S, Yook S, Jung Y, Park JB, Khue CD, Im BH, Seo J, Lee H, Ahn CH, Lee DY, Byun Y. Surface camouflage of pancreatic islets using 6-arm-PEG-catechol in combined therapy with tacrolimus and anti-CD154 monoclonal antibody for xenotransplantation. Biomaterials. 2011 Nov;32(31):7961-7970.
Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. Current opinion in immunology. 2004 Oct;16(5):550-557.
Johansson H, Lukinius A, Moberg L, Lundgren T, Berne C, Foss A, Felldin M, Kallen R, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Ekdahl KN, Elgue G, Korsgren O, Nilsson B. Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation. Diabetes. 2005 Jun;54(6):1755-1762.
Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. J Immunol. 2002 May 15;168(10):5233-5239.
Jones ND, Turvey SE, Van Maurik A, Hara M, Kingsley CI, Smith CH, Mellor AL, Morris PJ, Wood KJ. Differential susceptibility of heart, skin, and islet allografts to T cell-mediated rejection. J Immunol. 2001 Feb 15;166(4):2824-2830.

Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. Trends in immunology. 2001 Jul;22(7):394-400.
Jun HS, Chung YH, Han J, Kim A, Yoo SS, Sherwin RS, Yoon JW. Prevention of autoimmune diabetes by immunogene therapy using recombinant vaccinia virus expressing glutamic acid decarboxylase. Diabetologia. 2002 May;45(5):668-676.
Kallerhoff M, Blech M, Kehrer G, Kleinert H, Langheinrich M, Siekmann W, Helmchen U, Bretschneider HJ. Effects of glucose in protected ischemic kidneys. Urological research. 1987;15(4):215-222.
Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. International review of cell and molecular biology. 2012;298:229-317.
Kang Y, Chen CR, Massague J. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. Molecular cell. 2003 Apr;11(4):915-926.
Karcz M, Cook HT, Sibbons P, Gray C, Dorling A, Papalois V. An ex-vivo model for hypothermic pulsatile perfusion of porcine pancreata: hemodynamic and morphologic characteristics. Exp Clin Transplant. 2010 Mar;8(1):55-60.
Kelly KJ, Williams WW, Jr., Colvin RB, Bonventre JV. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994 Jan 18;91(2):812-816.
Killinger WA, Jr., Dorofi DB, Keagy BA, Johnson G, Jr. Endothelial cell preservation using organ storage solutions. Transplantation. 1992 May;53(5):979-982.
Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M, Roberts AB. Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. Molecular and cellular biology. 1990 Apr;10(4):1492-1497.
Kim Y, Kang K, Kim I, Lee YJ, Oh C, Ryoo J, Jeong E, Ahn K. Molecular mechanisms of MHC class I-antigen processing: redox considerations. Antioxidants & redox signaling. 2009 Apr;11(4):907-936.
Kishimoto K, Sandner S, Imitola J, Sho M, Li Y, Langmuir PB, Rothstein DM, Strom TB, Turka LA, Sayegh MH. Th1 cytokines, programmed cell death, and alloreactive T cell clone size in transplant tolerance. The Journal of clinical investigation. 2002 Jun;109(11):1471-1479.
Kisielow P, Bluthmann H, Staerz UD, Steinmetz M, von Boehmer H. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. Nature. 1988 Jun 23;333(6175):742-746.
Kitani A, Fuss I, Nakamura K, Kumaki F, Usui T, Strober W. Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis. The Journal of experimental medicine. 2003 Oct 20;198(8):1179-1188.
Klatzmann D, Cherin P, Bensimon G, Boyer O, Coutellier A, Charlotte F, Boccaccio C, Salzmann JL, Herson S. A phase I/II dose-escalation study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for metastatic melanoma. Study Group on Gene Therapy of Metastatic Melanoma. Human gene therapy. 1998a Nov 20;9(17):2585-2594.
Klatzmann D, Valery CA, Bensimon G, Marro B, Boyer O, Mokhtari K, Diquet B, Salzmann JL, Philippon J. A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. Human gene therapy. 1998b Nov 20;9(17):2595-2604.
Kleinclauss F, Perruche S, Cahn JY, Tiberghien P, Saas P. Administration of donor apoptotic cells: an alternative cell-based therapy to induce tolerance? Transplantation. 2003 May 15;75(9 Suppl):43S-45S.

Knosalla C, Goeau-Brissonniere O, Leflon V, Bruneval P, Eugene M, Pechere JC, Koskas F, Nicolas MH, Leschi JP, Gerota J, Kieffer E. Treatment of vascular graft infection by in situ replacement with cryopreserved aortic allografts: an experimental study. Journal of vascular surgery. 1998 Apr;27(4):689-698.

Kobayashi Y, Yoshimura N, Nakamura K, Yamagishi H, Oka T. Expression of tissue factor in hepatic ischemic-reperfusion injury of the rat. Transplantation. 1998 Sep 27;66(6):708-716.

Kootstra G, Wijnen R, van Hooff JP, van der Linden CJ. Twenty percent more kidneys through a non-heart beating program. Transplantation proceedings. 1991 Feb;23(1 Pt 2):910-911.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annual review of immunology. 2009;27:485-517.

Kruger B, Krick S, Dhillon N, Lerner SM, Ames S, Bromberg JS, Lin M, Walsh L, Vella J, Fischereder M, Kramer BK, Colvin RB, Heeger PS, Murphy BT, Schroppel B. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009 Mar 3;106(9):3390-3395.

Kruger B, Yin N, Zhang N, Yadav A, Coward W, Lal G, Zang W, P SH, Bromberg JS, Murphy B, Schroppel B. Islet-expressed TLR2 and TLR4 sense injury and mediate early graft failure after transplantation. European journal of immunology. 2010 Oct;40(10):2914-2924.

Kuhlicke J, Frick JS, Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Eltzschig HK. Hypoxia inducible factor (HIF)-1 coordinates induction of Toll-like receptors TLR2 and TLR6 during hypoxia. PloS one. 2007;2(12):e1364.

Kukielka GL, Smith CW, LaRosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, Hughes BJ, Youker KA, Hawkins HK, Michael LH, et al. Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. The Journal of clinical investigation. 1995 Jan;95(1):89-103.

Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. The Journal of clinical investigation. 2002 Jan;109(1):131-140.

Kuttler B, Hartmann A, Wanka H. Long-term culture of islets abrogates cytokine-induced or lymphocyte-induced increase of antigen expression on beta cells. Transplantation. 2002 Aug 27;74(4):440-445.

Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes. 1967 Jan;16(1):35-39.

Lammert E, Gu G, McLaughlin M, Brown D, Brekken R, Murtaugh LC, Gerber HP, Ferrara N, Melton DA. Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. Curr Biol. 2003 Jun 17;13(12):1070-1074.

Land W. Postischemic reperfusion injury to allografts -- a case for 'innate immunity'? European surgical research Europaische chirurgische Forschung. 2002 Jan-Apr;34(1-2):160-169.

Land W, Messmer K. The impact of ischemia/reperfusion injury on specific and non-specific, early and late chronic events after organ transplantation. . Transplant Review. 1996;10:108-127.

Land WG. Injury to allografts: innate immune pathways to acute and chronic rejection. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2005a Oct-Dec;16(4):520-539.

Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. Transplantation. 2005b Mar 15;79(5):505-514.

Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, Freigang S, Odermatt B, Conrad C, Ittner LM, Bauer S, Luther SA, Uematsu S, Akira S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. Nature medicine. 2005 Feb;11(2):138-145.

LaRosa DF, Rahman AH, Turka LA. The innate immune system in allograft rejection and tolerance. J Immunol. 2007 Jun 15;178(12):7503-7509.

Lebranchu Y. Tolérance, aspects théoriques et cliniques : implications pour la transplantation. Flammarion Medecine-Sciences - Actualités néphrologiques 2004.

Lee DG. Islet surface PEGylation attenuate the instant blood-mediated inflammatory reaction in intrahepatic islet transplantation Macromolecular Research. 2011;19:904-910.

Lee DY, Nam JH, Byun Y. Effect of polyethylene glycol grafted onto islet capsules on prevention of splenocyte and cytokine attacks. Journal of biomaterials science. 2004;15(6):753-766.

Lee DY, Park SJ, Lee S, Nam JH, Byun Y. Highly poly(ethylene) glycolylated islets improve long-term islet allograft survival without immunosuppressive medication. Tissue engineering. 2007 Aug;13(8):2133-2141.

Lee DY, Park SJ, Nam JH, Byun Y. A new strategy toward improving immunoprotection in cell therapy for diabetes mellitus: long-functioning PEGylated islets in vivo. Tissue engineering. 2006 Mar;12(3):615-623.

Lee DY, Yang K, Lee S, Chae SY, Kim KW, Lee MK, Han DJ, Byun Y. Optimization of monomethoxy-polyethylene glycol grafting on the pancreatic islet capsules. Journal of biomedical materials research. 2002 Dec 5;62(3):372-377.

Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJ, Kirschning CJ, Akira S, van der Poll T, Weening JJ, Florquin S. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. The Journal of clinical investigation. 2005 Oct;115(10):2894-2903.

Legendre C, Atinault A. [Hydroxyethylstarch and osmotic nephrosis]. Annales francaises d'anesthesie et de reanimation. 1994;13(5):766-767.

Legendre C, Thervet E, Page B, Percheron A, Noel LH, Kreis H. Hydroxyethylstarch and osmotic-nephrosis-like lesions in kidney transplantation. Lancet. 1993 Jul 24;342(8865):248-249.

Lehmann R, Spinas GA, Moritz W, Weber M. Has time come for new goals in human islet transplantation? Am J Transplant. 2008 Jun;8(6):1096-1100.

Levi M, van der Poll T, Buller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. Circulation. 2004 Jun 8;109(22):2698-2704.

Li XC, Wells AD, Strom TB, Turka LA. The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance. Current opinion in immunology. 2000 Oct;12(5):522-527.

Linetsky E, Bottino R, Lehmann R, Alejandro R, Inverardi L, Ricordi C. Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. Diabetes. 1997 Jul;46(7):1120-1123.

Liu K, Iyoda T, Saternus M, Kimura Y, Inaba K, Steinman RM. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. The Journal of experimental medicine. 2002 Oct 21;196(8):1091-1097.

Lo D, Freedman J, Hesse S, Palmiter RD, Brinster RL, Sherman LA. Peripheral tolerance to an islet cell-specific hemagglutinin transgene affects both CD4+ and CD8+ T cells. European journal of immunology. 1992 Apr;22(4):1013-1022.

Lodge JP, Perry SL, Skinner C, Potts DJ, Giles GR. Improved porcine renal preservation with a simple extracellular solution--PBS140. Transplantation. 1991 Mar;51(3):574-579.

Ludvigsson J, Krisky D, Casas R, Battelino T, Castano L, Greening J, Kordonouri O, Otonkoski T, Pozzilli P, Robert JJ, Veeze HJ, Palmer J, Samuelsson U, Elding Larsson H, Aman J, Kardell G, Neiderud Helsingborg J, Lundstrom G, Albinsson E, Carlsson A, Nordvall M, Fors H, Arvidsson CG, Edvardson S, Hanas R, Larsson K, Rathsman B,

Forsgren H, Desaix H, Forsander G, Nilsson NO, Akesson CG, Keskinen P, Veijola R, Talvitie T, Raile K, Kapellen T, Burger W, Neu A, Engelsberger I, Heidtmann B, Bechtold S, Leslie D, Chiarelli F, Cicognani A, Chiumello G, Cerutti F, Zuccotti GV, Gomez Gila A, Rica I, Barrio R, Clemente M, Lopez Garcia MJ, Rodriguez M, Gonzalez I, Lopez JP, Oyarzabal M, Reeser HM, Nuboer R, Stouthart P, Bratina N, Bratanic N, de Kerdanet M, Weill J, Ser N, Barat P, Bertrand AM, Carel JC, Reynaud R, Coutant R, Baron S. GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. The New England journal of medicine. 2012 Feb 2;366(5):433-442.

Lukinius A, Jansson L, Korsgren O. Ultrastructural evidence for blood microvessels devoid of an endothelial cell lining in transplanted pancreatic islets. The American journal of pathology. 1995 Feb;146(2):429-435.

Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. Transplantation. 2007 May 27;83(10):1289-1298.

Mack JE, Kerr JA, Vreugdenhil PK, Belzer FO, Southard JH. Effect of polyethylene glycol on lipid peroxidation in cold-stored rat hepatocytes. Cryobiology. 1991 Feb;28(1):1-7.

Macknight AD, Leaf A. Regulation of cellular volume. Physiological reviews. 1977 Jul;57(3):510-573.

Mahnke K, Johnson TS, Ring S, Enk AH. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. Journal of dermatological science. 2007 Jun;46(3):159-167.

Malaise J, Van Deynse D, Dumont V, Lecomte C, Mourad M, Dufrane D, Squifflet JP, Van Ophem D, Verschuren F, Meert P, Thys F, El Gariani A, Wittebole X, Laterre PF, Hantson P. Non-heart-beating donor, 10-year experience in a Belgian transplant center. Transplantation proceedings. 2007 Oct;39(8):2578-2579.

Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? Trends in immunology. 2007 Apr;28(4):184-192.

Marsh DC, Lindell SL, Fox LE, Belzer FO, Southard JH. Hypothermic preservation of hepatocytes. I. Role of cell swelling. Cryobiology. 1989 Dec;26(6):524-534.

Mathur A, Baz M, Staples ED, Bonnell M, Speckman JM, Hess PJ, Jr., Klodell CT, Knauf DG, Moldawer LL, Beaver TM. Cytokine profile after lung transplantation: correlation with allograft injury. The Annals of thoracic surgery. 2006 May;81(5):1844-1849; discussion 1849-1850.

Matsumoto S, Noguichi H, Shimoda M, Ikemoto T, Naziruddin B, Jackson A, Tamura Y, Olson G, Fujita Y, Chujo D, Takita M, Kobayashi N, Onaca N, Levy M. Seven consecutive successful clinical islet isolations with pancreatic ductal injection. Cell transplantation. 2010;19(3):291-297.

Matsumoto S, Takita M, Chaussabel D, Noguchi H, Shimoda M, Sugimoto K, Itoh T, Chujo D, Sorelle J, Onaca N, Naziruddin B, Levy MF. Improving Efficacy of Clinical Islet Transplantation With Iodixanol-Based Islet Purification, Thymoglobulin Induction, and Blockage of IL-1beta and TNF-alpha. Cell transplantation. 2011;20(10):1641-1647.

Matsuno N, Sakurai E, Kubota K, Kozaki K, Uchiyama M, Nemoto T, Degawa H, Kozaki M, Nagao T. Evaluation of the factors related to early graft function in 90 kidney transplants from non-heart-beating donors. Transplantation proceedings. 1997 Dec;29(8):3569-3570.

Matsuyama M, Yoshimura R, Akioka K, Okamoto M, Ushigome H, Kadotani Y, Nakatani T, Yoshimura N. Tissue factor antisense oligonucleotides prevent renal ischemia-reperfusion injury. Transplantation. 2003 Sep 15;76(5):786-791.

Mattsson G. The endothelial cells in islets of langerhans. Upsala journal of medical sciences. 2005;110(1):1-15.

Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. Science (New York, NY. 2002 Apr 12;296(5566):301-305.

McCall M, James Shapiro AM. Update on islet transplantation. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2012 Jul;2(7):a007823.
Menger MD, Yamauchi J, Vollmar B. Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. World journal of surgery. 2001 Apr;25(4):509-515.
Merion RM, Ashby VB, Wolfe RA, Distant DA, Hulbert-Shearon TE, Metzger RA, Ojo AO, Port FK. Deceased-donor characteristics and the survival benefit of kidney transplantation. Jama. 2005 Dec 7;294(21):2726-2733.
Merten OW, Charrier S, Laroudie N, Fauchille S, Dugue C, Jenny C, Audit M, Zanta-Boussif MA, Chautard H, Radrizzani M, Vallanti G, Naldini L, Noguiez-Hellin P, Galy A. Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application. Human gene therapy. 2011 Mar;22(3):343-356.
Merville P. Le donneur « marginal » : Le parcours de l'insuffisant rénal chronique. Nephrologie & therapeutique. 2007;3(54).
Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, Tracey KJ, Chiorazzi N. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. J Immunol. 2004 Jul 1;173(1):307-313.
Min JK, Kim YM, Kim SW, Kwon MC, Kong YY, Hwang IK, Won MH, Rho J, Kwon YG. TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. J Immunol. 2005 Jul 1;175(1):531-540.
Mita A, Ricordi C, Messinger S, Miki A, Misawa R, Barker S, Molano RD, Haertter R, Khan A, Miyagawa S, Pileggi A, Inverardi L, Alejandro R, Hering BJ, Ichii H. Antiproinflammatory effects of iodixanol (OptiPrep)-based density gradient purification on human islet preparations. Cell transplantation. 2011;19(12):1537-1546.
Miura M, Fu X, Zhang QW, Remick DG, Fairchild RL. Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury. The American journal of pathology. 2001 Dec;159(6):2137-2145.
Moberg L, Johansson H, Lukinius A, Berne C, Foss A, Kallen R, Ostraat O, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Elgue G, Nilsson Ekdahl K, Korsgren O, Nilsson B. Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. Lancet. 2002 Dec 21-28;360(9350):2039-2045.
Modigliani Y, Coutinho A, Pereira P, Le Douarin N, Thomas-Vaslin V, Burlen-Defranoux O, Salaun J, Bandeira A. Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymic epithelium. European journal of immunology. 1996 Aug;26(8):1807-1815.
Moen J, Claesson K, Pienaar H, Lindell S, Ploeg RJ, McAnulty JF, Vreugdenhil P, Southard JH, Belzer FO. Preservation of dog liver, kidney, and pancreas using the Belzer-UW solution with a high-sodium and low-potassium content. Transplantation. 1989 Jun;47(6):940-945.
Moers C, Pirenne J, Paul A, Ploeg RJ. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. The New England journal of medicine. 2012 Feb 23;366(8):770-771.
Moers C, Smits JM, Maathuis MH, Treckmann J, van Gelder F, Napieralski BP, van Kasterop-Kutz M, van der Heide JJ, Squifflet JP, van Heurn E, Kirste GR, Rahmel A, Leuvenink HG, Paul A, Pirenne J, Ploeg RJ. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. The New England journal of medicine. 2009 Jan 1;360(1):7-19.
Monroy B, Honiger J, Darquy S, Reach G. Use of polyethyleneglycol for porcine islet cryopreservation. Cell transplantation. 1997 Nov-Dec;6(6):613-621.

Moolten FL, Wells JM, Heyman RA, Evans RM. Lymphoma regression induced by ganciclovir in mice bearing a herpes thymidine kinase transgene. Human gene therapy. 1990 Summer;1(2):125-134.
Morgan DJ, Liblau R, Scott B, Fleck S, McDevitt HO, Sarvetnick N, Lo D, Sherman LA. CD8(+) T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice. J Immunol. 1996 Aug 1;157(3):978-983.
Mosbah IB, Franco-Gou R, Abdennebi HB, Hernandez R, Escolar G, Saidane D, Rosello-Catafau J, Peralta C. Effects of polyethylene glycol and hydroxyethyl starch in University of Wisconsin preservation solution on human red blood cell aggregation and viscosity. Transplantation proceedings. 2006 Jun;38(5):1229-1235.
Mosqueira VC, Legrand P, Gref R, Heurtault B, Appel M, Barratt G. Interactions between a macrophage cell line (J774A1) and surface-modified poly (D,L-lactide) nanocapsules bearing poly(ethylene glycol). Journal of drug targeting. 1999;7(1):65-78.
Moukarzel M, Benoit G, Bensadoun H, Hiesse C, Richard C, Bittard H, Depret J, Verdelli G, Charpentier B, Fries D, et al. Nonrandomized comparative study between University of Wisconsin cold storage and Euro-Collins solution in kidney transplantation. Transplantation proceedings. 1990 Oct;22(5):2289-2290.
Mulivor AW, Lipowsky HH. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 May;286(5):H1672-1680.
Murad KL, Gosselin EJ, Eaton JW, Scott MD. Stealth cells: prevention of major histocompatibility complex class II-mediated T-cell activation by cell surface modification. Blood. 1999a Sep 15;94(6):2135-2141.
Murad KL, Mahany KL, Brugnara C, Kuypers FA, Eaton JW, Scott MD. Structural and functional consequences of antigenic modulation of red blood cells with methoxypoly(ethylene glycol). Blood. 1999b Mar 15;93(6):2121-2127.
Naftanel MA, Harlan DM. Pancreatic islet transplantation. PLoS medicine. 2004 Dec;1(3):e58; quiz e75.
Nakamura K, Kadotani Y, Ushigome H, Akioka K, Okamoto M, Ohmori Y, Yaoi T, Fushiki S, Yoshimura R, Yoshimura N. Antisense oligonucleotide for tissue factor inhibits hepatic ischemic reperfusion injury. Biochemical and biophysical research communications. 2002 Sep 27;297(3):433-441.
Narang AS, Cheng K, Henry J, Zhang C, Sabek O, Fraga D, Kotb M, Gaber AO, Mahato RI. Vascular endothelial growth factor gene delivery for revascularization in transplanted human islets. Pharmaceutical research. 2004 Jan;21(1):15-25.
Narang AS, Mahato RI. Biological and biomaterial approaches for improved islet transplantation. Pharmacological reviews. 2006 Jun;58(2):194-243.
Nath DS, Basha HI, Mohanakumar T. Antihuman leukocyte antigen antibody-induced autoimmunity: role in chronic rejection. Current opinion in organ transplantation. 2010 Feb;15(1):16-20.
Neely JR, Grotyohann LW. Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. Circulation research. 1984 Dec;55(6):816-824.
Niclauss N, Bosco D, Morel P, Demuylder-Mischler S, Brault C, Milliat-Guittard L, Colin C, Parnaud G, Muller YD, Giovannoni L, Meier R, Toso C, Badet L, Benhamou PY, Berney T. Influence of donor age on islet isolation and transplantation outcome. Transplantation. 2011 Feb 15;91(3):360-366.
Nicolls MR, Coulombe M, Gill RG. The basis of immunogenicity of endocrine allografts. Critical reviews in immunology. 2001;21(1-3):87-101.

Nicolls MR, Coulombe M, Yang H, Bolwerk A, Gill RG. Anti-LFA-1 therapy induces long-term islet allograft acceptance in the absence of IFN-gamma or IL-4. J Immunol. 2000 Apr 1;164(7):3627-3634.
Nilsson B. The instant blood-mediated inflammatory reaction in xenogeneic islet transplantation. Xenotransplantation. 2008 Mar-Apr;15(2):96-98.
Nilsson B, Ekdahl KN, Korsgren O. Control of instant blood-mediated inflammatory reaction to improve islets of Langerhans engraftment. Current opinion in organ transplantation. 2011 Dec;16(6):620-626.
Nossal GJ. Cellular mechanisms of immunologic tolerance. Annual review of immunology. 1983;1:33-62.
Nossal GJ. Negative selection of lymphocytes. Cell. 1994 Jan 28;76(2):229-239.
Ohajekwe OA, Chowdhury NC, Fiedor PS, Hardy MA, Oluwole SF. Transplantation tolerance to rat cardiac and islet allografts by posttransplant intrathymic inoculation of soluble alloantigens. Transplantation. 1995 Nov 27;60(10):1139-1143.
Ohno H, Sakai T, Tsuchida E, Honda K, Sasakawa S. Interaction of human erythrocyte ghosts or liposomes with polyethylene glycol detected by fluorescence polarization. Biochemical and biophysical research communications. 1981 Sep 16;102(1):426-431.
Ojo AO. Expanded criteria donors: process and outcomes. Seminars in dialysis. 2005 Nov-Dec;18(6):463-468.
Oliver S, Bubley G, Crumpacker C. Inhibition of HSV-transformed murine cells by nucleoside analogs, 2'-NDG and 2'-nor-cGMP: mechanisms of inhibition and reversal by exogenous nucleosides. Virology. 1985 Aug;145(1):84-93.
Olsson R, Maxhuni A, Carlsson PO. Revascularization of transplanted pancreatic islets following culture with stimulators of angiogenesis. Transplantation. 2006 Aug 15;82(3):340-347.
Oltean M, Joshi M, Bjorkman E, Oltean S, Casselbrant A, Herlenius G, Olausson M. Intraluminal polyethylene glycol stabilizes tight junctions and improves intestinal preservation in the rat. Am J Transplant. 2012 Aug;12(8):2044-2051.
Oluwole SF, Jin MX, Chowdhury NC, James T, Fawwaz RA. Induction of specific unresponsiveness to rat islet allografts by intrathymic UVB donor spleen cells. Transplantation. 1993 Nov;56(5):1142-1147.
Onodera K, Lehmann M, Akalin E, Volk HD, Sayegh MH, Kupiec-Weglinski JW. Induction of "infectious" tolerance to MHC-incompatible cardiac allografts in CD4 monoclonal antibody-treated sensitized rat recipients. J Immunol. 1996 Sep 1;157(5):1944-1950.
Ozmen L, Ekdahl KN, Elgue G, Larsson R, Korsgren O, Nilsson B. Inhibition of thrombin abrogates the instant blood-mediated inflammatory reaction triggered by isolated human islets: possible application of the thrombin inhibitor melagatran in clinical islet transplantation. Diabetes. 2002 Jun;51(6):1779-1784.
Pan F, Barbi J, Pardoll DM. Hypoxia-inducible factor 1: A link between metabolism and T cell differentiation and a potential therapeutic target. Oncoimmunology. 2012 Jul 1;1(4):510-515.
Panes J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. British journal of pharmacology. 1999 Feb;126(3):537-550.
Panza JL, Wagner WR, Rilo HL, Rao RH, Beckman EJ, Russell AJ. Treatment of rat pancreatic islets with reactive PEG. Biomaterials. 2000 Jun;21(11):1155-1164.
Panzera P, Rotelli MT, Salerno AM, Cicco G, Catalano G, D'Elia G, Greco L, Lupo L, Memeo V. Solutions for organ perfusion and storage: haemorheologic aspects. Transplantation proceedings. 2005 Jul-Aug;37(6):2456-2458.
Pavlovic D, van de Winkel M, van der Auwera B, Chen MC, Schuit F, Bouwens L, Pipeleers D. Effect of interferon-gamma and glucose on major histocompatibility complex class I

and class II expression by pancreatic beta- and non-beta-cells. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1997 Jul;82(7):2329-2336.
Penfield JG, Wang Y, Li S, Kielar MA, Sicher SC, Jeyarajah DR, Lu CY. Transplant surgery injury recruits recipient MHC class II-positive leukocytes into the kidney. Kidney international. 1999 Nov;56(5):1759-1769.
Peng Y, Gong JP, Liu CA, Li XH, Gan L, Li SB. Expression of toll-like receptor 4 and MD-2 gene and protein in Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rat liver graft. World J Gastroenterol. 2004 Oct 1;10(19):2890-2893.
Peracchia MT, Harnisch S, Pinto-Alphandary H, Gulik A, Dedieu JC, Desmaele D, d'Angelo J, Muller RH, Couvreur P. Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles. Biomaterials. 1999 Jul;20(14):1269-1275.
Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. Lancet. 2004 Nov 13-19;364(9447):1814-1827.
Perrin H, Thaunat O, Malcus C, Badet L, Hennino A, Codas R, Touraine-Moulin F, Nicolas JF, Morelon E. Immunoprotection by polyethylene glycol in organ preservation solutions is not due to an immunomasking effect. Nephrol Dial Transplant. 2009 May;24(5):1682-1685.
Pileggi A, Molano RD, Berney T, Cattan P, Vizzardelli C, Oliver R, Fraker C, Ricordi C, Pastori RL, Bach FH, Inverardi L. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. Diabetes. 2001 Sep;50(9):1983-1991.
Platts SH, Linden J, Duling BR. Rapid modification of the glycocalyx caused by ischemia-reperfusion is inhibited by adenosine A2A receptor activation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Jun;284(6):H2360-2367.
Ploeg RJ, Goossens D, McAnulty JF, Southard JH, Belzer FO. Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution. Transplantation. 1988 Aug;46(2):191-196.
Ploeg RJ, van Bockel JH, Langendijk PT, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, Thorogood J, Hermans J. Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. The European Multicentre Study Group. Lancet. 1992 Jul 18;340(8812):129-137.
Porte D, Jr., Kahn SE. The key role of islet dysfunction in type II diabetes mellitus. Clinical and investigative medicine. 1995 Aug;18(4):247-254.
Posselt AM, Barker CF, Tomaszewski JE, Markmann JF, Choti MA, Naji A. Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. Science (New York, NY. 1990 Sep 14;249(4974):1293-1295.
Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. The Journal of experimental medicine. 1987 Jan 1;165(1):251-256.
Pratley RE, Weyer C. The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus. Diabetologia. 2001 Aug;44(8):929-945.
Pulskens WP, Teske GJ, Butter LM, Roelofs JJ, van der Poll T, Florquin S, Leemans JC. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. PloS one. 2008;3(10):e3596.
Qian T, Ricordi C, Schachner R, Inverardi L, Alejandro R. Tolerance induction to multiple donor rat islet allografts by intrathymic inoculation of spleen cell membrane antigens. Transplantation proceedings. 1995 Dec;27(6):3390.
Qian T, Schachner R, Brendel M, Kong SS, Alejandro R. Induction of donor-specific tolerance to rat islet allografts by intrathymic inoculation of solubilized spleen cell membrane antigens. Diabetes. 1993 Oct;42(10):1544-1546.

Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, Waldmann H. "Infectious" transplantation tolerance. Science (New York, NY. 1993 Feb 12;259(5097):974-977.
Quellec P, Gref R, Dellacherie E, Sommer F, Tran MD, Alonso MJ. Protein encapsulation within poly(ethylene glycol)-coated nanospheres. II. Controlled release properties. Journal of biomedical materials research. 1999 Dec 5;47(3):388-395.
Radillo O, Nocera A, Leprini A, Barocci S, Mollnes TE, Pocecco M, Pausa M, Valente U, Betterle C, Tedesco F. Complement-fixing islet cell antibodies in type-1 diabetes can trigger the assembly of the terminal complement complex on human islet cells and are potentially cytotoxic. Clinical immunology and immunopathology. 1996 Jun;79(3):217-223.
Rainov NG. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. Human gene therapy. 2000 Nov 20;11(17):2389-2401.
Ram Z, Culver KW, Oshiro EM, Viola JJ, DeVroom HL, Otto E, Long Z, Chiang Y, McGarrity GJ, Muul LM, Katz D, Blaese RM, Oldfield EH. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. Nature medicine. 1997 Dec;3(12):1354-1361.
Rao DA, Pober JS. Endothelial injury, alarmins, and allograft rejection. Critical reviews in immunology. 2008;28(3):229-248.
Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. J Investig Med. 2004 Jul;52(5):299-309.
Registry CIT. Annual repport of Collaborative Islet Transplant Registry 2010.
Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. Pflugers Arch. 2007 Jun;454(3):345-359.
Remuzzi G, Perico N, Carpenter CB, Sayegh MH. The thymic way to transplantation tolerance. J Am Soc Nephrol. 1995 Mar;5(9):1639-1646.
Rengel M, Kanter J, Puerta M, Anaya F, Rodriguez M, Verde E. Kidney transplantation with grafts from non-heart-beating donors. Transplantation proceedings. 2006 Apr;38(3):890-891.
Revillard JP. Immunologie. De Boeck et Larcier, Paris. 1995;2éme édition.
Richer JP, Gibelin H, Planet M, Bardou A, Ben Amor I, Germonville T, Caritez JC, Carretier M, Eugene M, Hauet T. Ischemia-reperfusion injury is associated with inflammatory cell infiltration: evaluation in a pig kidney autotransplant model. Transplantation proceedings. 2000 Mar;32(2):482-483.
Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, Kaufman DB, Warnock GL, Kneteman NM, Lake SP, London NJ, Socci C, Alejandro R, et al. Islet isolation assessment in man and large animals. Acta diabetologica latina. 1990 Jul-Sep;27(3):185-195.
Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. Diabetes. 1988 Apr;37(4):413-420.
Riess ML, Camara AK, Novalija E, Chen Q, Rhodes SS, Stowe DF. Anesthetic preconditioning attenuates mitochondrial Ca2+ overload during ischemia in Guinea pig intact hearts: reversal by 5-hydroxydecanoic acid. Anesthesia and analgesia. 2002 Dec;95(6):1540-1546, table of contents.
Robertson GS, Chadwick DR, Contractor H, James RF, London NJ. The optimization of large-scale density gradient isolation of human islets. Acta diabetologica. 1993;30(2):93-98.
Robinson JR. Colloid osmotic pressure as a cause of pathological swelling of cells. Pathobiology of Cell Membranes. 1975;1:173-189.

Robinson JR. Control of water content of non-metabolizing kidney slices by sodium chloride and polyethylene glycol (PEG 6000). The Journal of physiology. 1971 Feb;213(1):227-234.
Robinson JR. Control of water content of respiring kidney slices by sodium chloride and polyethylene glycol. The Journal of physiology. 1978 Sep;282:285-294.
Rodriguez-Iturbe B, Pons H, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases. Kidney international. 2001 May;59(5):1626-1640.
Roels L, Coosemans W, Donck J, Maes B, Peeters J, Vanwalleghem J, Pirenne J, Vanrenterghem Y. Inferior outcome of cadaveric kidneys preserved for more than 24 hr in histidine-tryptophan-ketoglutarate solution. Leuven Collaborative Group for Transplantation. Transplantation. 1998 Dec 27;66(12):1660-1664.
Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Immunologie. De Boeck et Larcier, Paris. 1997;4éme édition.
Roitt IM, Delves PJ. Transplantation. In: Roitt's essential immunology. Blackwell Science. 2001;10th ed:349-373.
Roos-van Groningen MC, Scholten EM, Lelieveld PM, Rowshani AT, Baelde HJ, Bajema IM, Florquin S, Bemelman FJ, de Heer E, de Fijter JW, Bruijn JA, Eikmans M. Molecular comparison of calcineurin inhibitor-induced fibrogenic responses in protocol renal transplant biopsies. J Am Soc Nephrol. 2006 Mar;17(3):881-888.
Ruzinova MB, Benezra R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. Trends in cell biology. 2003 Aug;13(8):410-418.
Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. Diabetes. 2005 Jul;54(7):2060-2069.
Saborio DV, Chowdhury NC, Hardy MA, Oluwole SF. Maintenance of acquired thymic tolerance to rat islet allografts by regulatory/suppressor T cells. Transplantation proceedings. 1999 Feb-Mar;31(1-2):897.
Sacco MG, Mangiarini L, Villa A, Macchi P, Barbieri O, Sacchi MC, Monteggia E, Fasolo V, Vezzoni P, Clerici L. Local regression of breast tumors following intramammary ganciclovir administration in double transgenic mice expressing neu oncogene and herpes simplex virus thymidine kinase. Gene therapy. 1995 Sep;2(7):493-497.
Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol. 1995 Aug 1;155(3):1151-1164.
Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. American journal of physiology. 2004a Aug;287(2):F181-187.
Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted organs: some new strategies against an old problem. Am J Transplant. 2004b Jan;4(1):1.
Salmon P, Boyer O, Lores P, Jami J, Klatzmann D. Characterization of an intronless CD4 minigene expressed in mature CD4 and CD8 T cells, but not expressed in immature thymocytes. J Immunol. 1996 Mar 1;156(5):1873-1879.
Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. Immunity. 2000 Apr;12(4):431-440.
Sanchez-Fructuoso AI. Kidney transplantation from non-heart-beating donors. Transplantation proceedings. 2007 Sep;39(7):2065-2067.
Sanni AO, Wilson CH, Wyrley-Birch H, Vijayanand D, Navarro A, Gok MA, Sohrabi S, Jaques B, Rix D, Soomro N, Manas D, Talbot D. Non-heart-beating kidney transplantation: 6-year outcomes. Transplantation proceedings. 2006 Dec;38(10):3396-3397.

Savier E, Granger B, Charlotte F, Cormillot N, Siksik JM, Vaillant JC, Hannoun L. Liver preservation with SCOT 15 solution decreases posttransplantation cholestasis compared with University of Wisconsin solution: a retrospective study. Transplantation proceedings. 2010 Nov;43(9):3402-3407.

Sawada S, Littman DR. Identification and characterization of a T-cell-specific enhancer adjacent to the murine CD4 gene. Molecular and cellular biology. 1991 Nov;11(11):5506-5515.

Sawada S, Scarborough JD, Killeen N, Littman DR. A lineage-specific transcriptional silencer regulates CD4 gene expression during T lymphocyte development. Cell. 1994 Jun 17;77(6):917-929.

Sawada T, Matsumoto I, Nakano M, Kirchhof N, Sutherland DE, Hering BJ. Improved islet yield and function with ductal injection of University of Wisconsin solution before pancreas preservation. Transplantation. 2003 Jun 27;75(12):1965-1969.

Sayegh MH, Fine NA, Smith JL, Rennke HG, Milford EL, Tilney NL. Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the same donors. Annals of internal medicine. 1991 Jun 1;114(11):954-955.

Schiller LR, Emmett M, Santa Ana CA, Fordtran JS. Osmotic effects of polyethylene glycol. Gastroenterology. 1988 Apr;94(4):933-941.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nature protocols. 2008;3(6):1101-1108.

Schreinemachers MC, Doorschodt BM, Florquin S, Idu MM, Tolba RH, van Gulik TM. Improved renal function of warm ischemically damaged kidneys using Polysol. Transplantation proceedings. 2009a Jan-Feb;41(1):32-35.

Schreinemachers MC, Doorschodt BM, Florquin S, van den Bergh Weerman MA, Reitsma JB, Lai W, Sitzia M, Minor TM, Tolba RH, van Gulik TM. Improved preservation and microcirculation with POLYSOL after transplantation in a porcine kidney autotransplantation model. Nephrol Dial Transplant. 2009b Mar;24(3):816-824.

Scott MD, Bradley AJ, Murad KL. Camouflaged blood cells: low-technology bioengineering for transfusion medicine? Transfusion medicine reviews. 2000 Jan;14(1):53-63.

Scott MD, Chen AM. Beyond the red cell: pegylation of other blood cells and tissues. Transfus Clin Biol. 2004 Feb;11(1):40-46.

Scott MD, Murad KL. Cellular camouflage: fooling the immune system with polymers. Current pharmaceutical design. 1998 Dec;4(6):423-438.

Scott MD, Murad KL, Koumpouras F, Talbot M, Eaton JW. Chemical camouflage of antigenic determinants: stealth erythrocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997 Jul 8;94(14):7566-7571.

Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. Nature. 1993 Oct 14;365(6447):654-657.

Sellers MT, Deierhoi MH, Curtis JJ, Gaston RS, Julian BA, Lanier DC, Jr., Diethelm AG. Tolerance in renal transplantation after allogeneic bone marrow transplantation-6-year follow-up. Transplantation. 2001 Jun 15;71(11):1681-1683.

Sepa A, Wahlberg J, Vaarala O, Frodi A, Ludvigsson J. Psychological stress may induce diabetes-related autoimmunity in infancy. Diabetes care. 2005 Feb;28(2):290-295.

Shand N, Weber F, Mariani L, Bernstein M, Gianella-Borradori A, Long Z, Sorensen AG, Barbier N. A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group. Human gene therapy. 1999 Sep 20;10(14):2325-2335.

Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. The New England journal of medicine. 2000 Jul 27;343(4):230-238.

Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbutt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. The New England journal of medicine. 2006 Sep 28;355(13):1318-1330.

Shirali AC, Goldstein DR. Activation of the innate immune system by the endogenous ligand hyaluronan. Current opinion in organ transplantation. 2008 Feb;13(1):20-25.

Shoskes DA, Halloran PF. Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. The Journal of urology. 1996 Jun;155(6):1831-1840.

Sibley RK, Sutherland DE, Goetz F, Michael AF. Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft. A light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1985 Aug;53(2):132-144.

Siebers U, Endl U, Horcher A, Bretzel RG, Federlin K, Zekorn T. Evaluation of the effect of microencapsulation and immuno-modulation on islet immunogenicity in vitro. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 1995;103 Suppl 2:140-142.

Siu G, Wurster AL, Duncan DD, Soliman TM, Hedrick SM. A transcriptional silencer controls the developmental expression of the CD4 gene. The EMBO journal. 1994 Aug 1;13(15):3570-3579.

Southard JH. Advances in organ preservation. Transplantation proceedings. 1989 Feb;21(1 Pt 2):1195-1196.

Southard JH, Belzer FO. New concepts in organ preservation. Clinical transplantation. 1993 Feb;7(1 part 2):134-137.

Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. Annual review of medicine. 1995;46:235-247.

St Clair MH, Lambe CU, Furman PA. Inhibition by ganciclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpesvirus genetic information. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1987 Jun;31(6):844-849.

Stefanovich P, Ezzell RM, Sheehan SJ, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. Effects of hypothermia on the function, membrane integrity, and cytoskeletal structure of hepatocytes. Cryobiology. 1995 Aug;32(4):389-403.

Stegall MD, Lafferty KJ, Kam I, Gill RG. Evidence of recurrent autoimmunity in human allogeneic islet transplantation. Transplantation. 1996 Apr 27;61(8):1272-1274.

Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. Nature. 2007 Sep 27;449(7161):419-426.

Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002 Jan 8;99(1):351-358.

Stock PG, Ascher NL, Chen S, Field J, Bach FH, Sutherland DE. Evidence for direct and indirect pathways in the generation of the alloimmune response against pancreatic islets. Transplantation. 1991 Oct;52(4):704-709.

Stock PG, Ascher NL, Kaufman DB, Chen S, Meloche M, Field MJ, Sutherland DE. In vitro generated allospecific cytolytic T lymphocytes injure pancreatic islets. The Journal of surgical research. 1988 Jul;45(1):74-81.

Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. Science (New York, NY. 2009 Jul 31;325(5940):612-616.

Sykes M, Sheard M, Sachs DH. Effects of T cell depletion in radiation bone marrow chimeras. I. Evidence for a donor cell population which increases allogeneic chimerism but which lacks the potential to produce GVHD. J Immunol. 1988 Oct 1;141(7):2282-2288.

t Hart NA, Leuvenink HG, Ploeg RJ. New Solutions in Organ Preservation. Transplant rev. 2002;16 131-141.

Taylor MJ, Baicu S, Greene E, Vazquez A, Brassil J. Islet isolation from juvenile porcine pancreas after 24-h hypothermic machine perfusion preservation. Cell transplantation. 2010;19(5):613-628.

Tesar BM, Jiang D, Liang J, Palmer SM, Noble PW, Goldstein DR. The role of hyaluronan degradation products as innate alloimmune agonists. Am J Transplant. 2006 Nov;6(11):2622-2635.

Thaunat O. Pathophysiologic significance of B-cell clusters in chronically rejected grafts. Transplantation. 2011 Jul 27;92(2):121-126.

Thomas D, Zaccone P, Cooke A. The role of regulatory T cell defects in type I diabetes and the potential of these cells for therapy. Rev Diabet Stud. 2005 Spring;2(1):9-18.

Thomas G, Balk EM, Jaber BL. Effect of intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation on acute kidney injury in severe sepsis. Am J Kidney Dis. 2008 Jul;52(1):13-17.

Thuillier R, Giraud S, Favreau F, Goujon JM, Desurmont T, Eugene M, Barrou B, Hauet T. Improving long-term outcome in allograft transplantation: role of ionic composition and polyethylene glycol. Transplantation. 2011a Mar 27;91(6):605-614.

Thuillier R, Renard C, Rogel-Gaillard C, Demars J, Milan D, Forestier L, Ouldmoulene A, Goujon JM, Badet L, Hauet T. Effect of polyethylene glycol-based preservation solutions on graft injury in experimental kidney transplantation. The British journal of surgery. 2011b Mar;98(3):368-378.

Tiberghien P, Reynolds CW, Keller J, Spence S, Deschaseaux M, Certoux JM, Contassot E, Murphy WJ, Lyons R, Chiang Y, et al. Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo donor T-cell depletion after bone marrow transplantation? Blood. 1994 Aug 15;84(4):1333-1341.

Tjernberg J, Ekdahl KN, Lambris JD, Korsgren O, Nilsson B. Acute antibody-mediated complement activation mediates lysis of pancreatic islets cells and may cause tissue loss in clinical islet transplantation. Transplantation. 2008 Apr 27;85(8):1193-1199.

Todo S, Nery J, Yanaga K, Podesta L, Gordon RD, Starzl TE. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. Jama. 1989 Feb 3;261(5):711-714.

Tojimbara T, Fuchinoue S, Iwadoh K, Koyama I, Sannomiya A, Kato Y, Nanmoku K, Kai K, Nakajima I, Toma H, Teraoka S. Improved outcomes of renal transplantation from cardiac death donors: a 30-year single center experience. Am J Transplant. 2007 Mar;7(3):609-617.

Tokunaga Y, Wicomb WN, Garcia-Kennedy R, Esquivel CO, Collins GM. The immunosuppressive effect of polyethylene glycol in a flush solution for rat liver transplantation. Transplantation. 1992 Oct;54(4):756-758.

Tong JC, Myers MA, Mackay IR, Zimmet PZ, Rowley MJ. The PEVKEK region of the pyridoxal phosphate binding domain of GAD65 expresses a dominant B cell epitope for type 1 diabetes sera. Annals of the New York Academy of Sciences. 2002 Apr;958:182-189.

Ushigome H, Sano H, Okamoto M, Kadotani Y, Nakamura K, Akioka K, Yoshimura R, Ohmori Y, Yoshimura N. The role of tissue factor in renal ischemic reperfusion injury of the rat. The Journal of surgical research. 2002 Feb;102(2):102-109.

Vajkoczy P, Olofsson AM, Lehr HA, Leiderer R, Hammersen F, Arfors KE, Menger MD. Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin. The American journal of pathology. 1995 Jun;146(6):1397-1405.

van der Plaats A, t Hart NA, Morariu AM, Verkerke GJ, Leuvenink HG, Ploeg RJ, Rakhorst G. Effect of University of Wisconsin organ-preservation solution on haemorheology. Transpl Int. 2004 Jun;17(5):227-233.

VanTeeffelen JW. How to prevent leaky vessels during reperfusion? Just keep that glycocalyx sealant in place! Critical care (London, England). 2008;12(4):167.

Vasir B, Aiello LP, Yoon KH, Quickel RR, Bonner-Weir S, Weir GC. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene and protein expression in cultured rat islet cells. Diabetes. 1998 Dec;47(12):1894-1903.

Vasir B, Jonas JC, Steil GM, Hollister-Lock J, Hasenkamp W, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC. Gene expression of VEGF and its receptors Flk-1/KDR and Flt-1 in cultured and transplanted rat islets. Transplantation. 2001 Apr 15;71(7):924-935.

Vasir B, Reitz P, Xu G, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC. Effects of diabetes and hypoxia on gene markers of angiogenesis (HGF, cMET, uPA and uPAR, TGF-alpha, TGF-beta, bFGF and Vimentin) in cultured and transplanted rat islets. Diabetologia. 2000 Jun;43(6):763-772.

Vivot K, Identification des mecanismes et moleculaires à l'origine de la perte precose des îlots pancréatiques au cours de la transplantation, Thèse, Université de Strasbourg, 2012

Vizler C, Bercovici N, Heurtier A, Pardigon N, Goude K, Bailly K, Combadiere C, Liblau RS. Relative diabetogenic properties of islet-specific Tc1 and Tc2 cells in immunocompetent hosts. J Immunol. 2000 Dec 1;165(11):6314-6321.

Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. The Journal of experimental medicine. 1993 Aug 1;178(2):605-613.

Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. Nature. 1997 Nov 27;390(6658):350-351.

Von Gaudecker B, Ulrichs K, Muller-Ruchholtz W. Immunoelectron microscopic localization of MHC structures in isolated pancreatic rat islets. Diabetes. 1989 Jan;38 Suppl 1:150-153.

Vreugdenhil PK, Marsh DC, Belzer FO, Southard JH. Urea and protein synthesis in cold-preserved isolated rat hepatocytes. Hepatology (Baltimore, Md. 1992 Jul;16(1):241-246.

Waddell TK, Gorczynski RM, DeCampos KN, Patterson GA, Slutsky AS. Major histocompatibility complex expression and lung ischemia-reperfusion in rats. The Annals of thoracic surgery. 1996 Sep;62(3):866-872.

Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1987 Aug;84(16):5788-5792.

Wahlberg JA, Love R, Landegaard L, Southard JH, Belzer FO. 72-hour preservation of the canine pancreas. Transplantation. 1987 Jan;43(1):5-8.

Waldmann H. Transplantation tolerance-where do we stand? Nature medicine. 1999 Nov;5(11):1245-1248.

Waldmann H, Cobbold S. Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells? Immunity. 2001 Apr;14(4):399-406.

Wang D, Toyofuku WM, Chen AM, Scott MD. Induction of immunotolerance via mPEG grafting to allogeneic leukocytes. Biomaterials. 2011 Dec;32(35):9494-9503.
Watson CJ, Bradley JA. Cold storage of deceased donor kidneys: does the solution matter or is the solution elsewhere? Am J Transplant. 2012 Apr;12(4):806-807.
Wicomb WN, Hill JD, Avery J, Collins GM. Optimal cardioplegia and 24-hour heart storage with simplified UW solution containing polyethylene glycol. Transplantation. 1990 Feb;49(2):261-264.
Wicomb WN, Wood J, Hill JD, Bry WI, Collins GM. Value of polyethylene glycol (PEG) and horseradish peroxidase (HRP) for hypothermic rabbit heart perfusion. Transplantation proceedings. 1989 Feb;21(1 Pt 2):1366-1368.
Wilson JT, Chaikof EL. Challenges and emerging technologies in the immunoisolation of cells and tissues. Advanced drug delivery reviews. 2008 Jan 14;60(2):124-145.
Win TS, Rehakova S, Negus MC, Saeb-Parsy K, Goddard M, Conlon TM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Donor CD4 T cells contribute to cardiac allograft vasculopathy by providing help for autoantibody production. Circ Heart Fail. 2009 Jul;2(4):361-369.
Winer S, Tsui H, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, Sampson A, Afifiyan F, Elford A, Jackowski G, Becker DJ, Santamaria P, Ohashi P, Dosch HM. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. Nature medicine. 2003 Feb;9(2):198-205.
Wojtusciszyn A, Bosco D, Morel P, Baertschiger R, Armanet M, Kempf MC, Badet L, Toso C, Berney T. A comparison of cold storage solutions for pancreas preservation prior to islet isolation. Transplantation proceedings. 2005 Oct;37(8):3396-3397.
Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS, van 't Veer C. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. J Immunol. 2002 Feb 1;168(3):1286-1293.
Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. Nature reviews. 2003 Mar;3(3):199-210.
Worcester-Human-Islet-Transplantation-Group. Autoimmunity after islet-cell allotransplantation. The New England journal of medicine. 2006 Sep 28;355(13):1397-1399.
Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, Alexander SI, Sharland AF, Chadban SJ. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. The Journal of clinical investigation. 2007 Oct;117(10):2847-2859.
Wu H, Ma J, Wang P, Corpuz TM, Panchapakesan U, Wyburn KR, Chadban SJ. HMGB1 contributes to kidney ischemia reperfusion injury. J Am Soc Nephrol. 2010 Nov;21(11):1878-1890.
Xing Y, Hogquist KA. T-cell tolerance: central and peripheral. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2012 Jun;4(6).
Xu H, Kaar JL, Russell AJ, Wagner WR. Characterizing the modification of surface proteins with poly(ethylene glycol) to interrupt platelet adhesion. Biomaterials. 2006 Jun;27(16):3125-3135.
Yagi S, Doorschodt BM, Afify M, Klinge U, Kobayashi E, Uemoto S, Tolba RH. Improved preservation and microcirculation with POLYSOL after partial liver transplantation in rats. The Journal of surgical research. 2011 May 15;167(2):e375-383.
Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. Journal of leukocyte biology. 2007 Jan;81(1):59-66.

Yang L, Bailey L, Baltimore D, Wang P. Targeting lentiviral vectors to specific cell types in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006 Aug 1;103(31):11479-11484.

Young KJ, Yang L, Phillips MJ, Zhang L. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. Blood. 2002 Nov 1;100(9):3408-3414.

Zeng Y, Gage A, Montag A, Rothlein R, Thistlethwaite JR, Bluestone JA. Inhibition of transplant rejection by pretreatment of xenogeneic pancreatic islet cells with anti-ICAM-1 antibodies. Transplantation. 1994 Sep 27;58(6):681-689.

Zhai Y, Shen XD, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttil RW, Cheng G, Kupiec-Weglinski JW. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. J Immunol. 2004 Dec 15;173(12):7115-7119.

Zhang N, Kruger B, Lal G, Luan Y, Yadav A, Zang W, Grimm M, Waaga-Gasser AM, Murphy B, Bromberg JS, Schroppel B. Inhibition of TLR4 signaling prolongs Treg-dependent murine islet allograft survival. Immunology letters. 2012 Jan 4;127(2):119-125.

Zhao WY, Xiong HY, Yuan Q, Zeng L, Wang LM, Zhu YH. In vitro effects of polyethylene glycol in University of Wisconsin preservation solution on human red blood cell aggregation and hemorheology. Clinical hemorheology and microcirculation. 2011;47(3):177-185.

Zheng TL, Lanza RP, Soon-Shiong P. Prolonged pancreas preservation using a simplified UW solution containing polyethylene glycol. Transplantation. 1991 Jan;51(1):63-66.