

2711.3019.9

Université de Montréal

**Impact des changements de solution et/ou température de  
reperfusion sur l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique dans les  
cellules sinusoïdales endothéliales préservées à froid**

par

**Stéphanie Auger**

Département de pharmacologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc.)  
en pharmacologie

Avril 2002



© Stéphanie Auger, 2002

W

4

U58

2002

N. 125

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Impact des changements de solution et/ou température de  
reperfusion sur l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique dans les  
cellules sinusoidales endothéliales préservées à froid**

présenté par :

**Stéphanie Auger**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Rousseau  
président rapporteur

Pierre S. Haddad  
directeur de recherche

Daniel Lajeunesse  
membre du jury

## Résumé

Les cellules endothéliales sinusoïdales (CES) sont très sensibles aux dommages induits par la préservation hypothermique. Elles peuvent alors exprimer, suite à une augmentation de leur  $Ca^{2+}_i$ , des molécules d'adhésion perturbant la microcirculation et engendrant des dysfonctions primaires des greffons. Le présent travail a pour but l'étude des effets des changements de composition/température des solutions de reperfusion sur le  $Ca^{2+}_i$  dans les CES isolées de rat. Les cellules ont été préservées à froid dans la solution de l'Université du Wisconsin (UW) puis réchauffées et reperfusées dans le tampon physiologique HEPES ou dans le UW à 20 ou 37°C. Les changements de température et de solution ou seulement de solution ont induit, chez les CES préservées ou non, une importante augmentation transitoire du  $Ca^{2+}_i$ . Le changement de la température seulement dans le UW ou l'HEPES n'a pas eu d'effet significatif sur le  $Ca^{2+}_i$ . D'autre part, la préservation froide atténuait beaucoup la fréquence et l'intensité de la réponse des CES à l'agoniste ATP. Par ailleurs, une coloration des CES au Hoechst et à l'iodure de propidium démontrait des taux d'apoptose et de nécrose augmentant proportionnellement au temps de préservation. Les taux d'apoptose étaient plus importants que ceux de nécrose. Ainsi, les changements de composition des solutions de reperfusion ont un plus grand effet sur le  $Ca^{2+}_i$  des CES que les changements de température. Les temps de préservation hypothermique n'ont pas d'impacts importants sur le  $Ca^{2+}_i$ , mais affectent une réponse à l'agoniste ATP, et induisent des taux d'apoptose et de nécrose augmentant graduellement.

Mots clés : Solution de l'Université du Wisconsin, Fura-2AM, ATP, Hoechst, iodure de propidium, ischémie froide/ré-oxygénation chaude

## Abstract

Increases in sinusoidal endothelial cell (SEC) intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  may play a crucial role in mediating the expression of adhesion molecules and hence contribute to the microcirculatory disturbances observed in primary graft dysfunction. The effect that changes in the composition/temperature of reperfusion solution have on cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  were therefore studied in isolated rat SEC. Cells were preserved in cold University of Wisconsin (UW) solution and then re-warmed and reperfused at 20 or 37°C in HEPES-buffered physiological solution or in UW. Changing reperfusion solution and temperature, or only reperfusion solution, induced a large transient rise in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  of preserved or non-preserved SEC. Changing temperature only, 20 to 37°C, in UW or HEPES had a much smaller effect on SEC  $\text{Ca}^{2+}$ . On the other hand, prior cold preservation greatly attenuated both the frequency of appearance and the intensity of ATP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses. A second part of the study, using Hoechst and propidium iodide fluorescent dyes, demonstrated that levels of apoptosis and necrosis in SEC were increasing proportionally with the hypothermic preservation time. Apoptosis levels were also higher than necrosis levels. In conclusion, changing reperfusion solution composition has a greater impact on SEC steady-state  $\text{Ca}^{2+}$  than changing temperature. Prior cold preservation does not significantly affect changes in SEC steady-state  $\text{Ca}^{2+}$ , but greatly impairs the capacity of SEC to subsequently respond to  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing agonists and induces increasing levels of apoptosis and necrosis.

Index terms: University of Wisconsin solution, Fura-2AM, ATP, Hoechst, propidium iodide, cold ischemia/warm re-oxygenation

## Table des matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>III</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>VII</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>IX</b>
<b>DÉDICACE</b> .....	<b>X</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1 LE FOIE.....	1
1.1.1 <i>Anatomie macroscopique</i> .....	1
1.1.2 <i>Anatomie microscopique</i> .....	1
1.1.3 <i>Fonctions hépatiques et types cellulaires</i> .....	3
1.2 LA TRANSPLANTATION HÉPATIQUE .....	6
1.2.1 <i>Historique de la transplantation hépatique</i> .....	6
1.2.2 <i>Problématique de la transplantation hépatique</i> .....	7
1.3 LA PRÉSERVATION HYPOTHERMIQUE DU FOIE .....	9
1.3.1 <i>La solution UW</i> .....	11
1.3.1.1 L'acide lactobionique .....	12
1.3.1.2 Le glutathion (GSH).....	14
1.3.1.3 L'adénosine .....	15
1.3.1.4 Le raffinose.....	16

1.3.1.5	L'hydroxyéthyle d'amidon modifié (HEA).....	16
1.3.1.6	Les cations sodium et potassium .....	17
1.3.1.7	Autres composantes : phosphate, dexaméthasone, antibiotiques et autres... 19	19
1.3.2	<i>Les autres solutions de préservations</i> .....	20
1.4	L'ISCHÉMIE-REPERFUSION DE LA TRANSPLANTATION HÉPATIQUE.....	21
1.4.1	<i>L'ischémie froide (IF)</i> .....	21
1.4.1.1	Généralités.....	21
1.4.1.2	Les effets cellulaires de l'IF .....	22
1.4.2	<i>Le réchauffement</i> .....	24
1.4.3	<i>La reperfusion chaude (RC)</i> .....	25
1.4.4	<i>Les effets cellulaires de l'ischémie froide et de la reperfusion chaude sur le foie</i> .....	25
1.4.4.1	Dommages aux hépatocytes .....	26
1.4.4.2	Effets de l'IF-RC sur les cellules de Kupffer .....	27
1.4.4.3	Dommages aux cellules endothéliales sinusoidales (CES) .....	28
1.4.4.4	Molécules d'adhésion des CES, leucocytes et plaquettes .....	31
1.4.4.5	Voie d'activation de l'inflammation et obstruction passive de la microcirculation.....	33
1.4.5	<i>Effets de l'IF-RC sur le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire des CES et rôle du Ca<sup>2+</sup> dans les dommages de l'IF-RC</i> .....	36
1.4.5.1	Rôle physiologique du calcium .....	36
1.4.5.2	L'homéostasie du calcium et l'IF-RC .....	37
1.4.5.3	ATP en tant qu'agoniste extracellulaire .....	38
1.4.6	<i>Les effets de l'IF-RC sur la viabilité-apoptose/nécrose des CES</i> .....	39

1.5	PRÉMISSES DE LA PRÉSENTE ÉTUDE.....	40
<b>2</b>	<b>MESURES D' APOPTOSE ET DE NÉCROSE.....</b>	<b>43</b>
2.1	MÉTHODOLOGIE.....	43
2.2	ANALYSE ET STATISTIQUES.....	45
<b>3</b>	<b>PRÉSENTATION DU MANUSCRIT .....</b>	<b>46</b>
3.1	ABSTRACT.....	48
3.2	ABREVIATIONS.....	49
3.3	INTRODUCTION.....	50
3.4	EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	52
	3.4.1 <i>Cell isolation, culture and preservation</i> .....	52
	3.4.2 <i>Intracellular Calcium Measurement</i> .....	53
	3.4.3 <i>Data analysis and statistics</i> .....	55
3.5	RESULTS .....	55
3.6	DISCUSSION.....	65
3.7	ACKNOWLEDGEMENTS.....	69
3.8	REFERENCES .....	69
<b>4</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>75</b>
4.1	EFFETS DE LA COMPOSITION ET TEMPÉRATURE DES SOLUTIONS DE REPERFUSION SUR LA MORPHOLOGIE, L' APOPTOSE ET LA NÉCROSE DES CES PRÉSERVÉES .....	75
	4.1.1 <i>Viabilité des CES préservées-reperfusées</i> .....	77
	4.1.2 <i>Apoptose des CES préservées-reperfusées</i> .....	79
	4.1.3 <i>Nécrose des CES préservées-reperfusées</i> .....	80
4.2	EFFETS DE LA COMPOSITION ET TEMPÉRATURE DES SOLUTIONS DE REPERFUSION SUR L' HOMÉOSTASIE CALCIQUE INTRACELLULAIRE DES CES PRÉSERVÉES.....	82

4.3	EFFET DE LA COMPOSITION ET TEMPÉRATURE DES SOLUTIONS DE REPERFUSION SUR LA RÉPONSE DES CES PRÉSERVÉES À L'ATP.....	86
4.4	CRITIQUE DU MODÈLE EXPÉRIMENTAL UTILISÉ .....	87
4.5	INVESTIGATIONS FUTURES .....	88
<b>5</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>92</b>

## Liste des tableaux

Tableau I – Composition de la solution UW.....	11
Tableau II – Protocoles expérimentaux de réchauffement des CES pour la mesure d'apoptose et de nécrose.....	44
Table III – Experimental protocols for the measurement of intracellular SEC $\text{Ca}^{2+}$ after changes in composition and/or temperature of re-oxygenation solutions.....	54
Table IV – Basal steady-state intracellular SEC $\text{Ca}^{2+}$ (nM) in the various experimental protocols.....	57
Table V – Peak increase in SEC $\text{Ca}^{2+}$ (nM) induced by changes in solution composition and temperature after CI/WR.....	58
Table VI – Intensity of SEC $\text{Ca}^{2+}$ response ( $\mu\text{M}$ ) to purinergic agonist ATP after CI/WR.	63
Table VII – Frequency of SEC $\text{Ca}^{2+}$ response to agonist ATP after CI/WR.....	64

## Liste des figures

Figure 1 – Anatomie microscopique du foie.....	2
Figure 2 – Organisation structurale des types cellulaires dans un lobule hépatique.....	5
Figure 3 – Étapes du recrutement des leucocytes par l'endothélium.....	34
Figure 4 – Morphological changes induced by cold preservation <i>in vitro</i> in isolated rat liver SEC.....	56
Figure 5 – Effects of changes in solution composition and/or temperature on steady-state intracellular $Ca^{2+}$ in SEC .....	60
Figure 6 – Response of SEC $Ca^{2+}$ ( $\mu M$ ) to purinergic agonist ATP after CI/WR.....	62
Figure 7 – Aspect des CES viables, apoptotiques et nécrotiques, colorées au HO 342 (4 $\mu M$ ) et à l'IP (1,5 $\mu M$ ) après préservation hypothermique et ré-oxygénation. ....	77
Figure 8 – Effets des changements de composition et/ou température de réchauffement sur la viabilité des CES préalablement préservées à froid. ....	79
Figure 9 – Effets des changements de composition et/ou température de réchauffement sur l'apoptose des CES préalablement préservées à froid.....	80
Figure 10 – Effets des changements de composition et/ou température de réchauffement sur la nécrose des CES préalablement préservées à froid. ....	81

## Liste des abréviations

CE : Cellules endothéliales

CES : Cellules sinusoïdales endothéliales

DAG : Diacylglycérol

ELAM-1 : « Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 »

GSH : Glutathion réduit

GSSH : Glutathion oxydé

HEA : Hydroxyéthyle d'amidon modifié

HGF : « Hepatocyte growth factor »

HO 342 : Hoechst 33342

ICAM-1 : « Intracellular adhesion molecule-1 »

IF : Ischémie froide

IF-RC : Ischémie froide – reperfusion/ré-oxygénation chaude

IL-1 : Interleukine-1

INF- $\gamma$  : Interféron- $\gamma$

IP : Iodure de propidium

IP<sub>3</sub>: Inositol triphosphate

MMP: Métalloprotéinases matricielles

NO : « Nitric oxide »

PADGEM : « Platelet activation-dependent granule-external membrane protein »

PAF : « Platelet activating factor »

PIP<sub>2</sub>: Phosphoinositol-biphosphate

PLA<sub>2</sub>: Phospholipase A<sub>2</sub>

PMN: Polymorphonucléaire

RC: Reperfusion/ré-oxygénation chaude

TNF- $\alpha$ : « Tumor necrosis factor- $\alpha$  »

UW : « Solution de l'Université du Wisconsin »

VCAM-1: « Vascular cell adhesion molecule-1 »

VEGF : « Vascular endothelial growth factor »

## Dédicace

À ma sœur Sonia,  
mon modèle de force, de détermination  
et de joie de vivre. Comme lorsque nous étions petites,  
je n'ai jamais cessé de tenir ta main  
pour suivre mon chemin.

## Remerciements

Quelle aventure fut pour moi celle de la maîtrise ! C'est un parcours parsemé d'embûches, mais couronné de succès qui m'a fait grandir énormément à plusieurs niveaux. Ce fut également les 3 années de ma vie où j'ai senti plusieurs personnes autour de moi, plus proches que jamais, pour m'accompagner à relever ce beau défi. Aujourd'hui je tiens à leur témoigner ma reconnaissance.

En premier lieu, un grand merci à Pierre Haddad, mon directeur de recherche. Merci de ton accueil chaleureux, de m'avoir dirigée à travers ces chemins sinueux et de m'avoir fait confiance jusqu'au bout. Merci également pour ta grande compréhension et ton support constant.

Merci à Julien, qui occupe une grande partie de moi. Nous avons vécu presque en même temps chaque étape de nos études. À travers ces moments bien occupés, nous avons toujours su nous donner tout le support et les petites attentions nécessaires dans les moments les plus difficiles comme les meilleurs. Merci pour tout l'aide et l'amour que tu m'as apporté pendant ce projet et tous les autres, merci d'être là avec moi.

Un énorme merci à mes parents à qui je dois tant ! Toujours prêts à appuyer mes décisions et à m'accompagner dans mes choix. Merci pour les belles valeurs que vous m'avez transmises. Grâce à vous et votre exemple, je suis une personne qui sait remplir ses engagements jusqu'au bout, mais surtout qui aime la vie et les gens qui en font partie. Merci aussi de laisser toute grande ouverte les portes de la «maison de repos» où il fait bon se ressourcer !!

Si loin mais pourtant si près... Merci à ma sœur Sonia et sa petite famille, Dan, Sophia et les compagnons à quatre pattes ! Merci pour toutes les petites et grandes attentions à mon égard, les téléphones, les colis, les photos ou encore les voyages toujours remplis d'aventures ! Avec vous tous les moyens sont bons pour m'accompagner dans les plus grands défis et me soutenir quoi qu'il arrive. Merci Sonia de croire en moi, ça me donne la plus forte énergie du monde.

Enfin mais non les moindres, merci à tous mes amis qui ont été présents pendant ces trois ans, mais surtout merci à mes deux imbattables comparses, Diane et Anne-Julie. Toujours disponibles pour une session de support moral, de détente mais surtout de rire intensif, vous êtes les meilleures ! J'ai découvert en vous des personnes formidables sur qui je peux toujours compter. Longue vie à notre amitié !

# 1 INTRODUCTION

## 1.1 Le foie

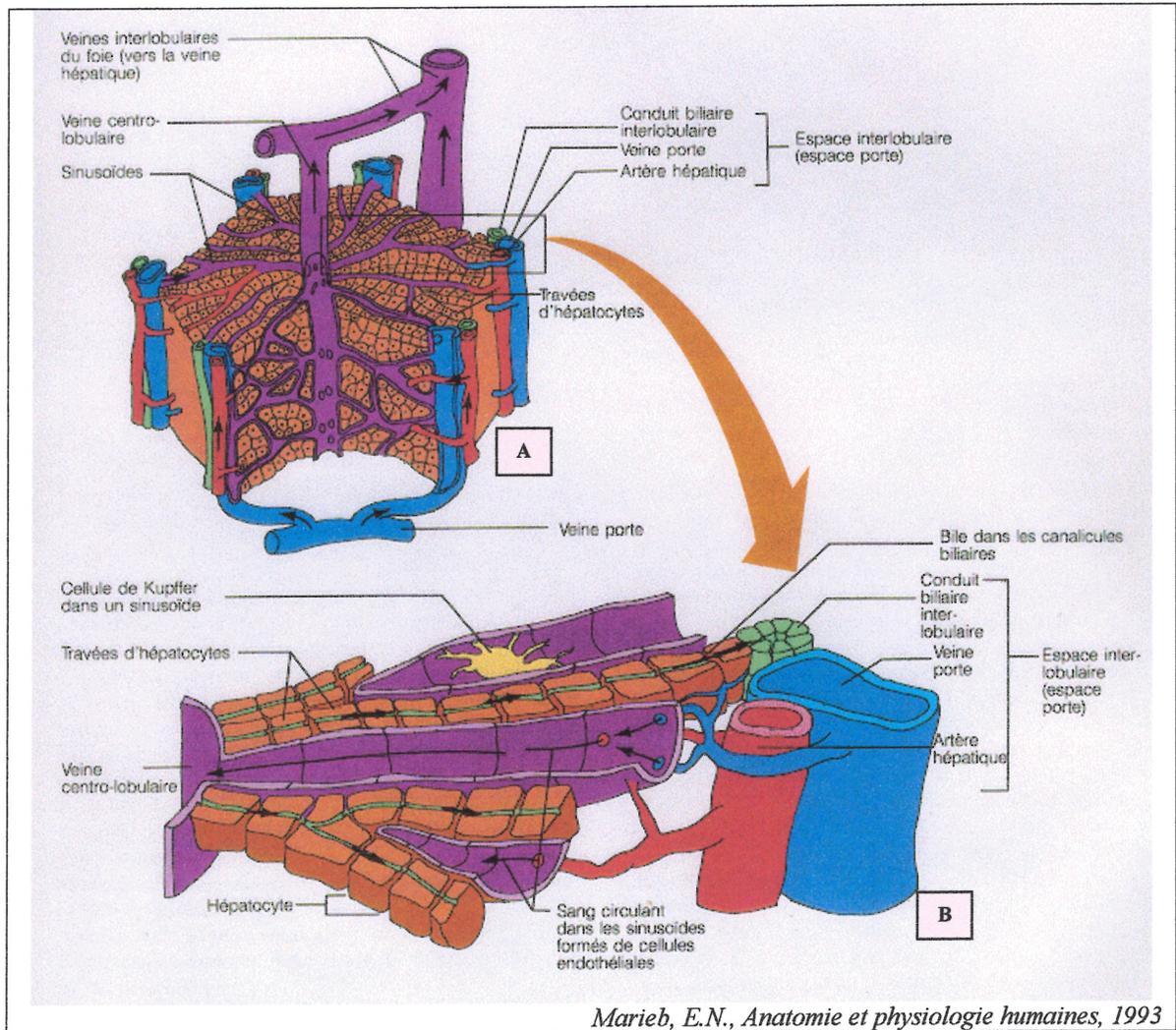
### 1.1.1 Anatomie macroscopique

Parmi tous les organes du corps humain, on décrit le foie comme étant la plus grosse glande endocrine annexée au tube digestif. Situé à l'intérieur de la cage thoracique, cet organe est placé sous le diaphragme et couvre la presque totalité de l'estomac auquel il est relié, tout comme à l'intestin grêle, par un mésentère dorsal. Notons également que sa surface externe est presque entièrement recouverte d'un péritoine viscéral. Le foie est par ailleurs composé de 4 lobes, le *droit*, soit le plus volumineux, le *gauche*, séparé du précédent par le ligament falciforme, le *caudé*, en position postérieure, et enfin le *carré*, situé sous le lobe gauche. Hautement vascularisé par du sang provenant de l'artère hépatique et de la veine porte hépatique, on estime le poids du foie à environ 1,4 kg chez l'adulte moyen. On compte également différents conduits hépatiques, soit le droit et le gauche, se rejoignant en un point pour former le conduit hépatique commun qui, unit au conduit cystique chemineront vers la vésicule biliaire, localisée sous le lobe droit (2;54;73).

### 1.1.2 Anatomie microscopique

Chaque lobe du foie est composé d'une multitude de sous-unités fonctionnelles nommées lobules hépatiques (Figure 1A). Ces lobules sont en fait un arrangement hexagonal de tissu entourant une veine centrale, la veine centro-lobulaire. Chaque lobule consiste en un agencement de plusieurs travées de cellules épithéliales, les hépatocytes (Figure 1B). Les hépatocytes sont donc alignés en deux travées parallèles. La face externe de chaque travée est en contact avec un capillaire sanguin, spécifiquement appelé sinusoiïde dans le foie.

L'autre face des travées d'hépatocytes, soit sa face interne, est en contact avec un canalicule biliaire, servant à transporter la bile produite par les hépatocytes vers la vésicule biliaire (2;54;73).



**Figure 1 – Anatomie microscopique du foie.**

A) Lobule hépatique B) Travées d'hépatocytes

Par ailleurs, on retrouve aux six coins de chacun des lobules une triade porte composée d'une branche de l'artère hépatique, d'une branche de la veine porte hépatique et d'un

conduit biliaire interlobulaire. Ainsi, le sang artériel et le sang veineux, riche en nutriments provenant de la digestion, circulent de la périphérie du lobule vers la veine centro-lobulaire. Cependant, il en va de la direction contraire pour le flot de bile dans les canalicules biliaires qui recueillent les déchets métaboliques et composantes biliaires produits par les hépatocytes pour les conduire vers le duodénum (2;54;73).

### **1.1.3 Fonctions hépatiques et types cellulaires**

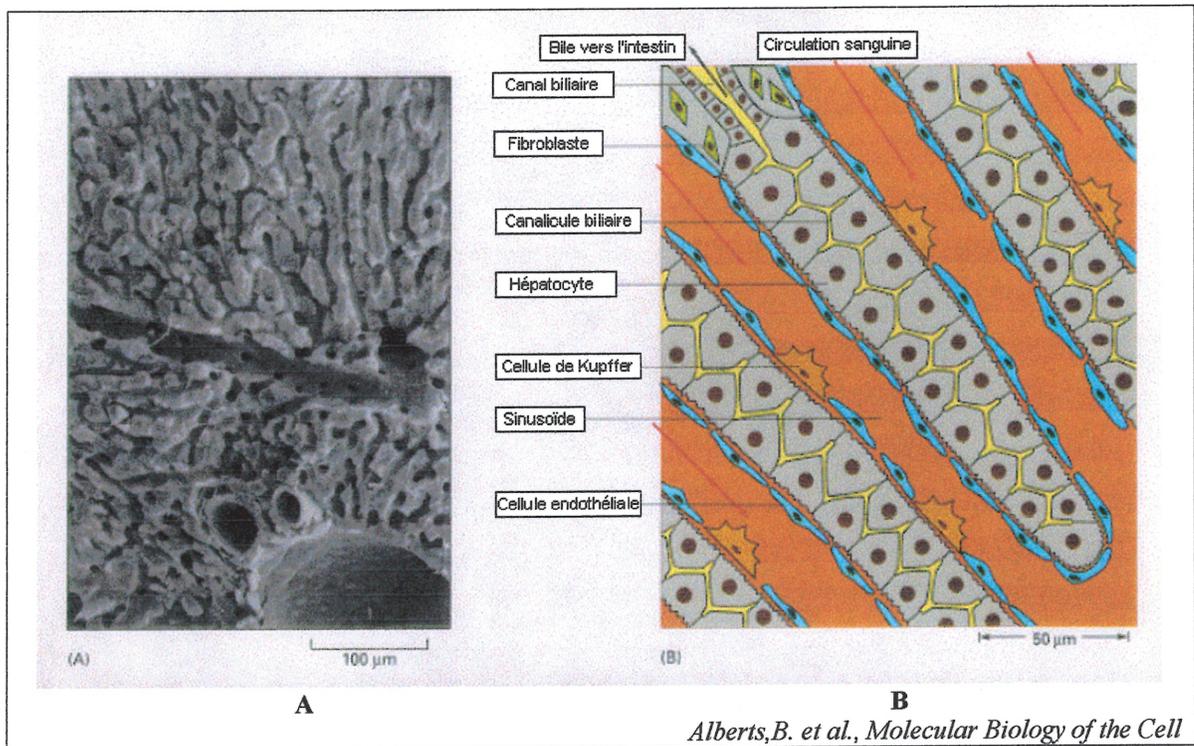
Les fonctions hépatiques sont principalement d'ordre métabolique et régulateur mais également digestif. De par sa morphologie, on comprend que le foie est à l'interface entre le tractus digestif et le sang. Pendant la digestion, différentes substances ingérées par l'organisme se retrouvent sous une forme ou une autre dans l'estomac et dans la lumière intestinale. Bon nombre d'entre elles seront transportées dans le sang via la veine porte en direction du foie. C'est à ce moment que se produit la fonction primaire hépatique soit celle d'échanger des métabolites entre les hépatocytes et le sang. Le foie est en quelque sorte le site où les nutriments sont transformés pour être utilisés éventuellement par d'autres cellules du corps. C'est également dans les lobules hépatiques que sera produite la bile, un agent émulsifiant capable d'aider à l'absorption de gras, de là la fonction digestive du foie (2;54;73). Voyons maintenant plus spécifiquement les types cellulaires responsables de telles fonctions.

Le foie compte quatre principaux types cellulaires, soient : les hépatocytes, les cellules endothéliales sinusoidales (CES), les cellules de Kupffer et les cellules fibroblastiques organisés à l'intérieur d'un lobule hépatique (Figure 2).

Les *hépatocytes*. Ce sont des cellules parenchymateuses qui constituent 92,5% du poids du foie et représentent 65% du nombre de cellules hépatiques totales. Ils sont considérés comme les « usines biochimiques » du foie. C'est leur large variété d'organelles qui leur donne leur spécialisation. Les hépatocytes sont tout d'abord reconnus pour leur capacité à synthétiser la bile pour faciliter la digestion des gras, et à synthétiser et sécréter la majeure partie des protéines plasmatiques, telles l'albumine et les facteurs de coagulation. Ils sont également en mesure de dégrader un grand nombre de substances ou de les transformer, comme le glucose en glycogène, et même d'entreposer une grande quantité de ces substances, comme les hydrates de carbone, les vitamines liposolubles ainsi que le fer. Les cellules hépatiques, grâce à leurs cytochromes P-450, peuvent également détoxifier certaines molécules, comme par exemple l'ammoniac ou différents médicaments. Elles peuvent également, grâce à cette fonction, rendre hydrosolubles (et facile à éliminer par les reins) des substances liposolubles produites par le corps qui autrement pourraient s'accumuler dangereusement dans les membranes. Ce ne sont là que quelques fonctions accomplies par les hépatocytes (2;54;61;73).

Les *cellules endothéliales sinusoidales*. Ce type cellulaire constitue 3,3% du poids du foie et représente 21% du nombre de cellules hépatique totales. Le rôle essentiel des CES est d'effectuer la surveillance et le contrôle du sang qui circule dans les sinusoides. En effet, tapissant en une couche unicellulaire les parois de ces derniers (Figure 2B), les CES contrôlent le passage de globules blancs du sang vers le liquide extracellulaire par d'étroits passages formés entre chacune d'elles. Elles dégradent également des complexes immuns ou des enzymes lysosomiales qui pourraient se retrouver dans le sang et nuire aux fonctions

hépatocytaires. Elles sont en fait une barrière physique entre les hépatocytes et le sang, sans pour autant entraver les échanges (2;61).



**Figure 2 – Organisation structurale des types cellulaires dans un lobule hépatique.**

- A) Portion de foie vue par microscopie à balayage électronique démontrant les couches d'hépatocytes et le grand nombre de sinusoides qu'elles forment.
- B) Schématisation de l'organisation structurale des types cellulaires d'un lobule hépatique.

Les *cellules de Kupffer*. Ce sont des phagocytes résidents spécialisés qui constituent 2,5% du poids du foie et représentent 8,5% du nombre total de cellules hépatiques. Reposant sur les CES dans les sinusoides (Figure 2B), les Kupffer ont également pour but de surveiller et de contrôler les constituants du sang, en particulier les corps étrangers tels les bactéries, globules rouges trop vieux, cellules mortes, et autres macromolécules défraîchies (2;54;61;73).

Les *cellules fibroblastiques*. Ces cellules constituent 1,7% du poids du foie et représentent 5,5% du nombre total de cellules hépatiques. Leur principal rôle est d'offrir un fin support de tissu conjonctif aux lobules hépatiques (Figure 2B) (2;61).

Notons par ailleurs que le foie est un organe capable de se reconstituer. En effet, lorsqu'un dommage est causé au foie, les cellules de ce dernier envoient et reçoivent des signaux d'alerte (hepatocyte growth factor, HGF) à travers le sang, et par simple réplication dissociation et migration, de nouvelles cellules pourront reconstituer de nouvelles parties du foie. Ainsi, il est prouvé que si l'on enlève le 2/3 d'un foie de rat, ce dernier se régénèrera à l'intérieur de 2 semaines (2;54;61;73).

## **1.2 La transplantation hépatique**

### **1.2.1 Historique de la transplantation hépatique**

La transplantation hépatique est une technique chirurgicale exercée depuis maintenant presque 35 ans (44). L'allogreffe du foie, c'est-à-dire la greffe du foie d'un individu à un autre à l'intérieur de la même espèce, est devenu une issue thérapeutique reconnue par le NIH depuis 1983 afin de pallier à des maladies graves du foie (44;54). En effet, certaines affections du foie telles les hépatites fulminantes, les métastases malignes, les cirrhoses ou autres anomalies métaboliques engendrées, par exemple, par l'alcool entraînent une dégénérescence des tissus hépatiques. Très souvent une mort certaine attend les patients qui en souffrent s'ils ne peuvent pas recevoir un nouveau foie (9;15;54).

C'est au milieu des années 1980 que l'on connut une très grande amélioration du succès des transplantations hépatiques (9;20). Ceci a tout d'abord été relié à l'apparition de la cyclosporine, un immunosuppresseur sélectif puissant améliorant les chances de reprise du greffon après l'intervention (6;54). Il y eut également l'amélioration des techniques chirurgicales et, surtout, l'amélioration des solutions de préservation hypothermique du greffon (9). Au tout début, la transplantation du foie était effectuée comme une opération d'urgence, souvent de nuit, où l'on utilisait deux équipes chirurgicales, une pour le donneur et une pour le receveur, et ce dans le même hôpital pour éviter de laisser le foie trop longtemps en état de préservation (6;44). Maintenant cette opération est réalisée de jour avec un support maximal et les meilleurs services hospitaliers. Le temps compte toujours comme facteur de réussite, mais la préservation du foie peut maintenant s'étendre de 6-8 heures à 12-24 heures depuis que le UW, devenu le standard des solutions de préservation de plusieurs organes vitaux, est utilisé (20;44)

### **1.2.2 Problématique de la transplantation hépatique**

La transplantation orthotopique compte 85% de patients qui ont retrouvé une vie normale avec leur travail, enfants et activités quotidiennes. Cependant, il subsiste toujours 6% des greffes qui présentent un non-fonctionnement et 15% qui présentent des dysfonctions primaires, et ce sans compter les thromboses de l'artère hépatique, où les strictions du canal biliaire (7;9;81). Le non-fonctionnement primaire, engendré par un endommagement sévère du foie pendant sa manipulation demande généralement une nouvelle transplantation. La dysfonction primaire se traduit par une fonction minimale de l'organe et demande plutôt des soins prolongés en milieu hospitalier. Il y a 10 ans, on comptait de 4000 à 4500 transplantations réalisées par année aux États-Unis (5). Parmi celles-ci, 15 à 25% se soldaient par la mort du patient 1 à 2 ans après l'intervention, et environ 30% des

greffés avec non-fonction ou dysfonctions primaires avaient besoin d'une nouvelle transplantation à l'intérieur de 3 mois (20;50). Il est donc devenu essentiel pour les chercheurs de se pencher sur les causes possibles de ces dysfonctions afin de trouver des solutions pour augmenter le taux de réussite de la transplantation.

Abordons en premier lieu le système immunitaire, jouant un très grand rôle dans le processus de rejet du greffon. En effet, dès que le système immunitaire reconnaît des tissus étrangers au soi, il envoie un assaut de lymphocytes T cytotoxiques pour les détruire. Une réaction immunitaire est ainsi déclenchée contre le nouvel organe. On doit donc s'assurer avant tout d'un minimum d'histocompatibilité entre les donneurs et les receveurs avant de procéder à la transplantation, et prescrire des traitements immunosuppresseurs suite à l'intervention (37;54).

Par ailleurs, il est établi scientifiquement que lorsque le foie est conservé plus de 12h dans le UW, les facteurs de risque de rejet deviennent significatifs (78). On croit que la majeure partie du problème vient du fait que le foie est soumis à une période d'ischémie froide (IF) (préservation froide) – reperfusion/réoxygénation chaude (RC) (rebranchement de l'organe dans le corps). En effet, l'IF-RC endommage de façon évidente la microvasculature du foie, plus particulièrement les CES, initiant une réaction inflammatoire menant au rejet du greffon dans une grande majorité des cas (20). Il est donc important de préserver le foie le moins longtemps possible avant de procéder à sa transplantation afin de diminuer les risques de complications postopératoires. Notons que les principes d'IF-RC seront élaborés dans une section ultérieure.

Enfin, un autre facteur pouvant nuire au succès d'une greffe est la ré-infection du foie nouvellement transplanté. Par exemple une hépatite B peut refaire surface ou une cirrhose peut se ré-installer. Il y a également les infections bactériennes de tous genres qui peuvent quant à elles être maîtrisées grâce à des antibiotiques (6;54).

Ainsi, malgré un succès sans cesse grandissant de la transplantation hépatique, il n'en reste pas moins qu'un fort taux de rejet, de non-fonction ou de faible fonctionnalité immédiate et d'infection peuvent survenir au niveau du greffon. De plus, nous assistons à un manque d'organes pour faire face à une demande 10 fois plus grande que l'offre. L'attention est donc tournée vers l'amélioration des techniques de préservation, de réchauffement et de fabrication d'organes par génie tissulaire. La xénotransplantation fait également partie des solutions étudiées pour pallier à la problématique du manque de foies disponibles (73).

### **1.3 La préservation hypothermique du foie**

Depuis l'essor de la transplantation hépatique dans les années 1980, les scientifiques se sont penchés sur le développement de diverses solutions de préservation hypothermique afin de conserver le foie en attente d'un receveur potentiel. Ainsi, il y a une dizaine d'années, F.O. Belzer et J. H. Southard ont vu leur solution UW devenir le standard de préservation des organes abdominaux transplantables, et ce, après 15 à 20 ans de travail (22;78). Cette solution a été développée à partir d'observations faites en 1969 (22), par des chercheurs qui conservaient des foies dans la glace, après les avoir rincés dans une solution ressemblant au milieu intracellulaire dans le but de réduire les échanges de constituants intracellulaires avec l'extérieur pendant la période de conservation. Des solutés supplémentaires tel le glucose étaient également ajoutés afin de contrôler le gonflement

cellulaire. C'est donc dans cette optique que le UW a été développé. Il peut servir autant à la préservation statique qu'à la perfusion continue(78).

Plusieurs constituants font partie du UW : l'acide lactobionique, le glutathion (GSH), l'adénosine, le raffinose, l'hydroxyéthyle d'amidon modifié (HEA), les cations sodium et potassium, le phosphate, le dexaméthasone, la pénicilline et l'insuline (Tableau I) (78). Ces multiples composantes peuvent-être retirées une à la fois du UW sans trop nuire à la qualité de la préservation, cependant, elles font partie d'un tout qui interagit étroitement. De plus, le UW est une solution conçue pour préserver différents organes, soient le foie, les reins, le pancréas, les intestins, le cœur et les poumons, bien que le succès de la préservation ne soit pas si grand dans le cas des trois derniers organes (78;98).

**Tableau I – Composition de la solution UW.**

Composition	Concentration (mM)	Fonction
K <sup>+</sup> -lactobionate <sup>a</sup>	100	} Lutte contre le gonflement cellulaire
Raffinose	30	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>a</sup>	25	} Tamponne l'acidité intracellulaire
MgSO <sub>4</sub>	5	
Glutathion	3	} Antioxydant
Allopurinol	1	
Adénosine	5	Substrat pour générer l'ATP
Hydroxyéthyle d'amidon	50 g/L	Maintient de la pression oncotique
Insuline	100 U/L	Inconnue
Dexaméthasone	8 mg/L	↓ relâche d'enzymes lysosomiales lors d'ischémie
Pénicilline	40 U/L	↓ infections bactériennes
pH <sup>b</sup>	7,4	
Osmolarité	320 ± 5 mOsmol/L	

<sup>a</sup>La concentration finale en K<sup>+</sup> est de 125 ± 5 mM et Na<sup>+</sup> <sup>b</sup> est de 30 ± 5 mM

<sup>b</sup>Le pH du UW est ajusté avec du NaOH

Le temps de préservation limite du foie dans le UW est cliniquement de 24 heures et expérimentalement 48h à 4°C (5). Cependant, bien que le UW ait été développé en tentant de donner à l'organe le nécessaire dont il a besoin pour éviter les dommages dus à la préservation, les risques de non-fonctions ou de dysfonctions primaires ne sont pas totalement éliminés suite à de si longues périodes de conservation à froid (78).

### 1.3.1 La solution UW

Les composantes de la solution UW ont été largement étudiées, et ont pour fonctions principales de 1) minimiser les effets négatifs de l'hypothermie tels le gonflement cellulaire et l'œdème interstitiel, 2) prévenir l'acidose, 3) fournir des antioxydants contre les radicaux libres et 4) fournir des substrats pour la production d'ATP au moment de la reperfusion du

foie (6;19). Ces fonctions ont pour but de garantir une tolérance du foie à long terme contre l'ischémie froide (59). Les principaux ingrédients permettant d'atteindre ces objectifs sont les suivants :

#### *1.3.1.1 L'acide lactobionique*

L'acide lactobionique, sans doute le plus important constituant du UW, est en fait une molécule de lactose oxydée de 358 daltons qui comporte une charge négative. Agent osmotique puissant, il supprime en grande partie l'effet de gonflement cellulaire induit par l'hypothermie (78). Le principe du gonflement réside ici dans le fait que le refroidissement à 4°C arrête en grande partie les échanges ioniques provenant des pompes sodiques ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase) qui n'ont plus d'ATP en quantité suffisante pour fonctionner. L'ATP devient insuffisant en raison des conditions anaérobiques (diminution de la phosphorylation oxydative) qu'engendre la préservation, de la privation en substrats de la cellule et de la diminution de l'activité enzymatique capable de dégrader ces substrats. Ainsi, la grande majorité des pompes  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPases cessent de fonctionner et il en résulte une diminution du potentiel membranaire plasmatique permettant une entrée de sodium et de chlore par gradient de concentration suivie d'eau, ce qui fait gonfler la cellule. C'est pourquoi il est nécessaire d'imposer un certain contrôle osmotique en introduisant environ 100 mM de lactobionate dans le milieu de préservation. Le lactobionate est une substance imperméable, de large poids moléculaire et non-métabolisable (contrairement au glucose), ce qui incite l'eau à demeurer à l'extérieur de la cellule et prévient ainsi le gonflement cellulaire (6;22;59).

L'acide lactobionique est également considéré comme un chélateur efficace de  $\text{Ca}^{2+}$  ce qui permet de diminuer de façon très importante sa concentration libre (jusqu'à 90%) dans les cellules hypothermiques du foie. Les effets du  $\text{Ca}^{2+}$  seront discutés plus en détails dans une section ultérieure. De par sa capacité de chélater le zinc, le lactobionate est également en mesure d'inhiber certaines métalloprotéinases matricielles (MMPs), une fonction tout récemment découverte (19). Il a été établi récemment que les MMPs, plus spécifiquement les gélatinases sont impliquées dans les dommages relatifs à l'ischémie froide. En effet, les gélatinases digèrent la fibronectine, tissu conjonctif reliant les CES aux couches de collagène sous-jacentes. Ceci qui provoque l'arrondissement et le détachement des CES du tissu matriciel pendant la préservation. Le lactobionate contenu dans le UW, capable de chélater l'atome de zinc au centre des MMPs, peut ainsi inhiber leur activité néfaste sur les CES, tant à 4°C (en préservation), qu'à 37°C (en reperfusion). L'étude de cette fonction n'était pas visée au départ par les chercheurs ayant développé le UW, le rôle dommageable des MMPs dans la préservation n'étant même pas connu à ce moment (19;87). Notons par ailleurs la capacité du lactobionate à chélater aussi le fer, ce qui suggère une diminution des dommages causés par la production de radicaux libres (78).

Ainsi, par ses fonctions d'agent osmotique diminuant le gonflement cellulaire et par sa capacité d'inactivation des MMPs, l'acide lactobionique est reconnu comme étant le constituant le plus important de la solution UW. D'autres chercheurs, comme Jamieson (45) et Sumimoto (83) et leurs équipes, ont tenté sans succès de remplacer le lactobionate par un autre anion comme le gluconate ou, par le chlore. Le lactobionate demeure donc le constituant le plus efficace du UW pour lutter contre certains dommages de l'IF-RC du foie.

### 1.3.1.2 *Le glutathion (GSH)*

Le GSH, antioxydant efficace, est une composante très importante de la solution UW. En effet, il permet d'éliminer une grande quantité d'agents cytotoxiques tels les peroxydes d'hydrogène, peroxydes lipidiques, disulfides et radicaux libres ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ). Ces molécules sont engendrées lors de la préservation, mais surtout de la reperfusion, principalement par les granulocytes, ce qui rend les tissus préservés très sensibles à plusieurs formes de dommages (6;78). D'autre part, le GSH est reconnu pour être un agent chélateur de métaux lourds, comme par exemple le mercure, le cuivre ou le zinc, via un groupe sulfhydrile de la cystéine qu'il contient. Il est également capable d'inhiber l'activité des MMPs, tout comme l'acide lactobionique (87). Par ailleurs, le GSH est un tripeptide antioxydant endogène présent en concentrations millimolaires dans pratiquement toutes les cellules de mammifères (8;78;87). Cependant, des études ont démontré que le GSH cellulaire était assez rapidement éliminé lors des périodes d'IF-RC. Il passe ainsi de sa forme réduite (GSH) à sa forme oxydée (GSSG) ou est converti en ses acides aminés constituants, soient la glycine, la cystéine et le glutamate. Notons ici que la glycine peut jouer un rôle cytoprotecteur des hépatocytes, ce qui rend le GSH d'autant plus important dans la composition du UW. En raison de cette rapide élimination du GSH, il devient important d'en ajouter une quantité suffisante, soit environ 3 mM (concentration optimale) avant chaque période de préservation hépatique de longue durée (22;78). Cependant, on croit que le GSSG peut également être métabolisé en acides aminés par les tissus et être aussi efficace que sa forme réduite GSH (79). Selon certaines études, l'omission de GSH dans le UW entraînerait de plus grands risques de dommages aux hépatocytes à long terme et un plus faible taux de survie des greffons (78;87). Le GSH est donc nécessaire dans la préservation pour maintenir l'intégrité membranaire tout en aidant à restaurer le

métabolisme cellulaire normal en supprimant le stress oxydatif suivant la transplantation (79).

### 1.3.1.3 *L'adénosine*

Le phénomène de préservation/transplantation est connu pour engendrer une crise énergétique dans le foie due à une perte d'ATP et à son catabolisme en purines (adénosine, inosine et xanthine). Les purines diffusent à travers la membrane plasmique et sont évacuées du tissu après reperfusion, engendrant ainsi un manque de précurseurs pour la formation d'ATP servant entre autres à remettre les pompes  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPases}$  en marche et autres fonctions nécessitant l'ATP le plus rapidement possible après reperfusion. Les mitochondries se retrouvent ainsi en problème de fonctionnement et l'apport d'oxygène peut s'en trouver perturbé. Il devient donc important de fournir un précurseur de synthèse d'ATP disponible juste avant ou lors de la reperfusion (6;78). En fait, il est prouvé qu'une meilleure restauration de l'organe survient si une production d'ATP se fait tout de suite après la reperfusion. En effet, cette remise en circulation rapide de composés riches énergétiquement restaure les composantes de l'homéostasie métabolique cellulaire. Par exemple, le gradient électrique de la membrane qui contrôle de façon indirecte le gonflement cellulaire et assure ainsi la survie des cellules dans l'organe préservé – reperfusé (15;78).

En général, l'adénosine est considérée comme essentielle à la composition du UW et plusieurs chercheurs suggèrent que la survie des greffons, et par conséquent du receveur, est diminuée s'il n'y a pas d'adénosine présente dans l'UW. Cependant, d'autres chercheurs, comme Jamieson et Sumimoto soutiennent que l'adénosine n'est pas une

composante essentielle de l'UW et que sa suppression n'engendre pas de conséquences graves à court terme pour les greffons (22;78;84;98).

#### *1.3.1.4 Le raffinose*

Le raffinose, un trisaccharide actif osmotiquement et faiblement perméable aux membranes cellulaires (fort poids moléculaire de 594 daltons), est considéré comme un support osmotique additionnel au lactobionate dans le UW. Il joue en fait le rôle d'agent supprimeur de gonflement cellulaire pendant la préservation du foie (5;6;78). Cependant, le raffinose n'est pas considéré comme une composante essentielle du UW. En effet, il peut tout aussi bien être remplacé par d'autres saccharides comme le glucose ou le sucrose sans engendrer de problèmes supplémentaires au greffon préservé (78;98).

#### *1.3.1.5 L'hydroxyéthyle d'amidon modifié (HEA)*

L'HEA fait partie d'une catégorie de substances nommées colloïdes, c'est-à-dire des molécules formant des micelles imperméables à la membrane cellulaire. En fait, l'HEA retrouvé dans l'UW est une pentafraction d'HEA dialysée pour enlever des toxines potentielles. Les colloïdes sont nécessaires pendant le rinçage initial de l'organe avant sa préservation. En effet, ils préviennent l'expansion de l'espace extracellulaire (oedème interstitiel) pendant le rinçage en empêchant les molécules d'eau poussées par la pression hydrostatique de la pompe de perfusion de traverser les capillaires et de s'accumuler dans l'espace interstitiel. Ce phénomène engendrerait alors une compression du système capillaire et une mauvaise répartition de la solution de rinçage dans tout l'organe. Ainsi, la perfusion vasculaire se trouve grandement améliorée lorsque l'HEA est présent dans le UW

(6;22;78). De plus, l'HEA prévient le gonflement des CES et les autres changements des cellules vasculaires pendant la préservation à froid (78).

Encore ici, plusieurs chercheurs concluent que l'HEA n'est pas nécessaire à la composition du UW surtout pour conserver le foie ou les reins. Il s'avère plus important dans la préservation du cœur et du pancréas (78;98). De plus, l'équipe de Jamieson a démontré que l'omission d'HEA n'entraîne aucun effet néfaste et permet une reperfusion du foie beaucoup plus rapide en raison d'une viscosité moins grande de la solution de préservation en l'absence du colloïde (82;84). Cependant, il est suggéré que la présence d'HEA dans la solution de préservation fait en sorte que la production de bile est mieux rétablie. Une plus faible relâche d'enzymes par le foie est aussi enregistrée dans le perfusé, expliquant une diminution des dommages hépatocellulaires suite aux étapes initiales de préservation et de rinçage du foie (78).

#### *1.3.1.6 Les cations sodium et potassium*

La composition de base en cations de la solution UW est généralement de 125 mM de potassium et 35 mM de sodium (22). Notons cependant que les avis divergent énormément en ce qui concerne le ratio idéal de ces cations dans le UW. Suite à des années de recherche, il s'avère clair que les milieux hyperkalémiques, c'est-à-dire reconstituant la composition du milieu intracellulaire, sont satisfaisants pour la préservation de plusieurs organes. En effet, l'étude de Keeler et al. a démontré qu'en conditions hypothermiques, une forte concentration d'ions potassium s'échappait hors de la cellule selon le gradient de concentration, et que cet effet pouvait être contré par l'augmentation des concentrations extracellulaires en potassium (78). Le milieu intracellulaire préserve donc ses

concentrations de potassium à un niveau normal, les cellules minimisent alors leurs pertes en cations intracellulaires. Ainsi les pertes d'énergie de la cellule sont réduites considérablement (21;22;78).

Cependant, certains inconvénients peuvent survenir suite à l'utilisation d'un si fort taux d'ions potassium dans la solution de préservation. Par exemple, l'augmentation du taux de potassium systémique chez le receveur après reperfusion de l'organe peut engendrer des arrêts cardiaques (58;78). De plus, le potassium en grande quantité peut causer la vasoconstriction des vaisseaux sanguins de l'organe préservé et par le fait même restreindre l'efficacité du nettoyage du greffon avant et après préservation. Il peut également diminuer le volume de distribution de la solution de préservation (déjà très visqueuse) dans l'organe entier, ce qui diminue également l'efficacité de la préservation (78). Notons par ailleurs que des dommages aux cellules endothéliales ont également été observés en présence de trop fortes concentrations de potassium extracellulaire (58).

Certaines études ont donc été menées, par exemple par Jamieson, Sumimoto et Marshall, dans le but d'étudier la possibilité d'inverser ce ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  à environ 140 mM  $\text{Na}^+$  et 9 mM  $\text{K}^+$  (78). Or, il s'est avéré que l'efficacité de la préservation du foie dans le UW ne semblait pas trop affectée dans ces nouvelles conditions. Les concentrations de sodium-potassium, semblent donc interchangeable, du moins pour des périodes de préservation inférieures à 48h (58;78). Ce phénomène étant expliqué en partie par une amélioration de la perfusion initiale de l'organe évitant les vasospasmes produits par une forte concentration de potassium (82). Une étude suggère même qu'il y aurait amélioration de la

viabilité de l'organe lors d'une préservation en présence de beaucoup de sodium, cependant, il n'est pas encore clair pourquoi ce phénomène se produit (84).

En somme, un rapport favorisant le potassium (135 mM) au détriment du sodium (35 mM) est en général utilisé dans la composition du UW, bien que cette composition paraisse interchangeable sans trop affecter l'efficacité de la préservation du foie, du rein ou du pancréas à court terme (78;82;84).

#### *1.3.1.7 Autres composantes : phosphate, dexaméthasone, antibiotiques et autres*

Plusieurs autres composantes entrent dans la composition de la solution UW, dont voici un bref survol. Tout d'abord, le **phosphate** retrouvé à une concentration de 25 mM, sert à la prévention de l'acidose intracellulaire, par son pouvoir tampon sur les ions hydrogène. En effet, l'ischémie stimule la glycolyse et la glycogénolyse, toutes deux productrices d'acide lactique et d'ions hydrogène, ce qui engendre de l'acidose. Cette acidose peut induire la déstabilisation et l'activation d'enzymes lysosomiales, qui à leur tour peuvent altérer les propriétés mitochondriales de la cellule et ainsi endommager cette dernière. De plus, il est important de noter que le contrôle de ce phénomène se gère différemment selon le type d'organe préservé. Par exemple, le foie a le potentiel de produire beaucoup plus d'ions hydrogène que le rein de par ses plus grandes réserves de glycogène. De plus, le foie possède une plus grande perméabilité membranaire au glucose que les autres organes, ce qui signifie que l'apport d'un tampon est d'autant plus important. De là également émane l'importance de ne pas utiliser directement du glucose dans la solution de préservation. Le lactobionate et le raffinose sont préférables afin d'éviter ces problèmes d'acidose

métabolique. Certains vont jusqu'à dire qu'un pH alcalin peut améliorer la préservation hypothermique (6).

Le **dexaméthasone** fait également partie des composantes du UW. Un peu comme le phosphate, il sert à supprimer la relâche d'enzymes lysosomiales pendant la période d'ischémie et sert donc de stabilisateur de membrane. On le retrouve à une concentration de 8 mg/L dans le UW. Cependant, sa présence n'est pas estimée essentielle à la bonne préservation du foie (78).

La **pénicilline** est un antibiotique présent dans le UW pour diminuer les chances d'infections bactériennes dans l'organe préservé, mais qui peut, semble-t-il, être enlevé du milieu sans conséquences dramatiques sur la préservation, toujours selon Jamieson (78;84).

L'**insuline** et le **MgSO<sub>4</sub>** sont des composés présents croit-on plus pour des raisons théoriques que bénéfiques. Ils peuvent également être retranchés sans trop de problèmes (6;84;98). Notons par contre que l'insuline pourrait avoir des effets bénéfiques surtout lors de la préservation du cœur (79).

### 1.3.2 Les autres solutions de préservations

Plusieurs autres solutions de préservation existent en ce moment, dont certaines sont utilisées cliniquement et d'autres demeurent en développement.

Entre autres, on retrouve les solutions HTK (Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate), Euro-Collins, HL (Histidine-Lactobionate), Cardiosol, Celsior et SLS (Sodium-Lactobionate-

Sucrose). Ces solutions sont presque toutes, soient des précurseurs ou des dérivées directs ou indirects de la solution UW. Elles possèdent en général des agents tampon, diminuant l'acidose, et à fort pouvoir osmotique pour éviter le gonflement cellulaire pendant la préservation. Elles sont également moins visqueuses à froid, offrant donc une meilleure perfusion tissulaire, éliminent les composantes non-essentiels, et sont fabriquées à moindre coût que le UW. Cependant, aucune d'elles n'offre des résultats de préservation largement supérieurs au UW. Ainsi, la solution UW demeure le premier choix des solutions de préservation des organes abdominaux.

#### **1.4 L'ischémie-reperfusion de la transplantation hépatique**

Le taux d'échec des transplantations du foie est en grande partie engendré par le phénomène d'IF-RC auquel il est soumis. En fait, ces étapes de la préservation et de la transplantation engendrent souvent des dommages très importants aux différents types cellulaires. Ceci déclenche une réaction immunitaire au sein de l'organe greffé qui atteint un point tel qu'il devient incapable de fonctionner adéquatement. Il en résulte un rejet progressif de l'organisme (20).

##### **1.4.1 L'ischémie froide (IF)**

###### *1.4.1.1 Généralités*

Lorsqu'un foie est retiré d'un organisme donneur afin d'être transplanté à un receveur, la première étape qui prévaut bien souvent est la préservation du foie. En effet, le donneur et le receveur ne se trouve généralement pas dans le même lieu au même moment. Il devient donc nécessaire d'immerger le foie dans une solution de préservation et de le placer à une température de 4°C. Le but de cette étape est de permettre le ralentissement du

métabolisme hépatique. On dit donc de l'organe qu'il est en ischémie froide (20). Une période d'ischémie chaude survient tout de même avant celle d'ischémie froide, en particulier au moment où le cœur du donneur cesse de battre, ou du moins au moment où la circulation sanguine s'arrête ou ralentie de façon importante dans le foie (ou tout autre organe).

Le phénomène d'IF engendre différents effets au niveau cellulaire dans le foie. En fait, l'hypothermie diminue le taux de métabolisme des tissus, et prolonge la période d'anoxie cellulaire où des métabolites essentiels sont retenus. D'autre part, l'hypothermie interfère avec les mécanismes d'homéostasie régissant ces métabolites. Ceci peut entraîner la diminution de production d'ATP suite à la perte de respiration mitochondriale, le déséquilibre du pH intracellulaire, la protéolyse non-lysosomiale, le gonflement cellulaire, la production de radicaux libres, la dérégulation de l'homéostasie calcique et autres phénomènes semblables (20;41).

#### *1.4.1.2 Les effets cellulaires de l'IF*

Tout d'abord, rappelons que l'IF est requise pour diminuer au minimum le métabolisme cellulaire de l'organe, sans toutefois l'arrêter complètement. Ainsi, dès que la période d'ischémie commence, un manque d'oxygène survient dans l'organe. Les mitochondries ralentissent donc leur fonctionnement (67), ce qui engendre une **baisse de production d'ATP**, donc une baisse d'énergie disponible au fonctionnement cellulaire (20;41). Aussi, ce principe force-t-il les cellules à continuer leur métabolisme par voie de glycolyse anaérobie, ce qui engendre l'accumulation d'acide lactique et d'ions hydrogène et provoque une **acidose intracellulaire** importante (6;16). Cette acidose peut également

engendrer la relâche d'**enzymes protéolytiques non-lysosomiales** comme, par exemple, les calpaïnes. Ces dernières sont capables de dégrader la spectrine et autres structures du cytosquelette cellulaire, induisant la formation de boursouffures membranaires (communément appelées « blebbing »). Les effets peuvent même aller jusqu'à la lyse cellulaire (12;19). Ces changements de forme des cellules peuvent également provenir d'un réarrangement des filaments d'actine causé par le déséquilibre de pH. D'autres facteurs perturbateurs comme la diminution de température, un dérèglement des niveaux intracellulaires de calcium ou encore l'apparition de métabolites pro-inflammatoires (cytokines, interleukines, facteurs de nécrose (TNF), etc.) peuvent aussi contribuer à ces modifications du cytosquelette (20).

Le **gonflement cellulaire** est également un phénomène observé et bien expliqué en période d'IF. En fait, le problème provient de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase qui est inhibée à basse température, suite à la perte de formation d'ATP. Son rôle est d'équilibrer l'effet osmotique de macromolécules intracellulaires imperméables en excréant des ions  $\text{Na}^+$  hors de la cellule. Ainsi, lorsqu'elle se retrouve bloquée, les ions  $\text{Na}^+$  s'accumulent à l'intérieur de la cellule ce qui résulte en une nette augmentation de la charge positive intracellulaire, incitant les ions  $\text{Cl}^-$  à entrer et chassant les ions  $\text{K}^+$  à l'extérieur. Le tout est accompagné d'un influx d'eau provoqué par une forte osmolarité intracellulaire. On peut alors observer un gonflement cellulaire entraînant des dommages aux cellules affectées, voir même leur lyse (6;20).

Pendant ce temps, la **production de radicaux libres** débute. La dégradation d'ATP résulte en l'accumulation d'hypoxanthine en concomitance avec la transformation de la xanthine

déhydrogénase (XD) en xanthine oxydase (XO) probablement associés à de forts taux de calcium intracellulaire et à l'activation de protéases. Les radicaux libres ne peuvent être produits en grande quantité tant qu'il n'y a pas reperfusion avec une solution oxygénée. Cependant, les dommages cellulaires sont en grande partie initiés par la période de refroidissement lors de la transformation de XD en XO et par la dégradation d'adénine en substrat pour les radicaux libres. En bout de ligne, la quantité de radicaux libres est grandement influencée par la durée de préservation à froid de l'organe (20). Les radicaux libres étant très instables, donc hautement réactifs, sont enclins à attaquer la plupart des composantes biochimiques à proximité. Il s'agit en général de la membrane cellulaire à fort contenu lipidique. Les radicaux libres peuvent également réagir avec d'autres lipides, des protéines de toutes sortes ou des acides nucléiques en propageant une cascade de transfert d'électrons capable d'oxyder et éventuellement de dénaturer leurs substrats, d'où l'importance des dommages rencontrés suite à l'IF-RC (20).

Presque toutes ces perturbations cellulaires dues à l'IF-RC surviennent dans les différents types cellulaires du foie.

#### **1.4.2 Le réchauffement**

Tout d'abord, mentionnons qu'avant la période de RC, il y a un temps de réchauffement; période d'augmentation de température entre la préservation froide et la reperfusion par la veine porte hépatique à la température physiologique. Ce changement amène dans l'organe préservé une activation du système enzymatique, d'où la production d'un stress sur la disponibilité énergétique de la cellule (20). Il devient alors important de rincer le foie avant son implantation dans un nouvel organisme avec une solution physiologique (par exemple le Carolina Rinse dont il sera question plus loin), afin de prévenir d'autres dommages et de

protéger les cellules contre les futurs dommages de reperfusion (23). Ainsi, la préservation froide et le réchauffement sont des événements qui induisent et préparent les cellules à faire face à d'autres dommages qui surviendront lors de la reperfusion (20).

### **1.4.3 La reperfusion chaude (RC)**

#### *Généralités*

La période de reperfusion chaude survient lorsque le foie est ré-intégré dans un nouvel organisme et que la circulation sanguine est rétablie. Cependant, d'importants problèmes surviennent à cette étape, à moins que l'organe n'ait été préservé que pour une courte période à froid (20). En effet, comme du sang chaud oxygéné est remis en circulation dans le réseau vasculaire de l'organe, un grand stress oxydatif est engendré au niveau cellulaire. En fait, les dommages qui se préparaient en période d'IF, et de réchauffement, se manifestent ou augmentent à cette étape de reperfusion. Ils sont surtout caractérisés par la production de radicaux libres préparés en phase d'IF et relâchés entre autres par l'activation des cellules de Kupffer, macrophages et neutrophiles. Survient aussi l'augmentation des molécules d'adhésion à la surface des CES, puis la séquestration et l'infiltration des neutrophiles et des plaquettes en grande quantité. Ceci peut mener au blocage de la microcirculation de l'organe et, éventuellement, au rejet de la greffe (20;41).

### **1.4.4 Les effets cellulaires de l'ischémie froide et de la reperfusion chaude sur le foie**

Les effets majeurs de l'IF-RC peuvent se diviser en cinq étapes principales, soient : les dommages aux hépatocytes, les effets sur les cellules de Kupffer, les dommages aux CES, l'induction des molécules d'adhésion au niveau des CES, des leucocytes et des plaquettes,

et enfin, l'activation de l'inflammation et l'obstruction passive de la microcirculation hépatique.

#### *1.4.4.1 Dommages aux hépatocytes*

Bien que les cellules parenchymateuses soient de nature beaucoup plus résistantes à une période d'IF que les CES, elles demeurent en comparaison plus affectées par la RC (41;57). Or, des dommages énumérés précédemment dans la section portant sur les effets cellulaires de l'IF, sont aussi induits au niveau des hépatocytes lors de la RC. Par exemple, notons la perte des fonctions mitochondriales (67), la baisse de production d'ATP (1845-35), l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (27;35), la relâche d'enzymes protéolytiques non-lysosomiales (induisant des boursoufflures membranaires) (12;19) et la production de radicaux libres (20). D'autres changements sont également observés dans les hépatocytes. Tout d'abord, une diminution du nombre de certains transporteurs présents à la membrane, comme l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE1) (36). Combiné à la diminution d'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, ce manque de transporteurs NHE1 engendre la déstabilisation du pH intracellulaire induite par l'IF-RC (31). Aussi, une étude menée par notre laboratoire (72) a démontré que les mécanismes de régulation du volume et de la captation d'acides aminés par la cellule sont dérégulés après IF-RC. Ces déséquilibres de différents transporteurs protéiques membranaires peuvent conduire à une déstabilisation électrochimique et osmotique de la cellule, induisant son gonflement. Or, il a été prouvé qu'une corrélation directe existe entre le gonflement induit par l'hypothermie et la mort cellulaire (55).

Une autre fonction très affectée par l'IF-RC chez les hépatocytes est la synthèse de protéines essentielles au fonctionnement de l'organisme, comme l'albumine ou les facteurs de coagulation. Selon les résultats d'une étude, la synthèse protéique diminuerait de 16%,

54% et 69% suite à des périodes de préservation hypothermique respectives de 24, 48 et 72 heures (92). Toujours au niveau des fonctions protéiques des hépatocytes, des études effectuées par Izuishi et al. (40) et notre laboratoire (71), démontrent que des hépatocytes soumis à une période d'IF-RC, connaissent une détérioration de certains isoformes de cytochrome P-450, ainsi que de la perte de capacité à métaboliser et détoxifier certains médicaments et xénobiotiques comme les immunosuppresseurs. Cette dysfonction peut devenir un grave danger puisque le patient transplanté doit recevoir une thérapie immunosuppressive pour le reste de ses jours. Des problèmes majeurs peuvent aussi survenir lors de médication pour n'importe quel problème de santé, et que certains cytochromes P-450 soient devenus non-fonctionnels après la greffe.

#### *1.4.4.2 Effets de l'IF-RC sur les cellules de Kupffer*

Les cellules de Kupffer sont considérées comme des cellules plutôt dommageables aux autres lors d'une période d'IF-RC. Cependant elles subissent elles-mêmes des changements morphologiques, soient la rétractation et la dégranulation, signes de leur activation pendant la reperfusion oxygénée du foie. D'autres changements homéostatiques sont eux aussi observés comme par exemple une augmentation du  $Ca^{2+}$  après l'IF (14;35). Par ailleurs, Jaeschke et al. (42;43) ont démontré que les cellules de Kupffer sont une source de radicaux libres pendant la période de reperfusion/réoxygénation du foie, ce qui les rend en partie responsables d'importants dommages engendrés au greffon. En effet, elles relâcheraient des molécules d'oxygène réactif, radicaux libres, capables de s'attaquer aux cellules environnantes, hépatocytes et CES, et d'activer des neutrophiles circulants qui auront également un rôle dommageable dans une seconde étape du processus de reperfusion/réoxygénation (42). Les cellules de Kupffer activées peuvent également

relâcher d'autres substances toxiques ou actives biologiquement comme par exemple le Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine-1 (IL-1), des enzymes lysosomiales ou encore des éicosanoïdes, pouvant également contribuer aux dommages causés au foie préservé/transplanté (63;65).

#### *1.4.4.3 Dommages aux cellules endothéliales sinusoidales (CES)*

Tout d'abord, plusieurs études démontrent que les cellules endothéliales sont les plus fragiles, et donc les plus affectées par la période IF-RC à laquelle un foie peut être soumis (13;20;41). Par exemple, Chazouillères et al. ont démontré qu'il y avait une corrélation entre la durée de préservation à froid et l'importance des dommages causés aux CES (19;20). En effet, la période de préservation à froid est très dommageable pour les CES puisqu'elle induit leur gonflement, tel qu'expliqué précédemment, les poussent à modifier leur cytosquelette, à s'arrondir et éventuellement à se détacher dans la lumière sinusoidale. On croit même à un certain point que les CES peuvent toutes se détacher de leur matrice abîmée et laisser une bordure de cellules parenchymateuses exposée directement à la lumière sinusoidale (13;14;20;26;57). Cependant, les CES détachées de leur matrice ont été identifiées en grande partie comme étant toujours vivantes. Leur mort semblerait survenir au moment de la reperfusion/réoxygénation seulement. Ceci arriverait directement ou par relâche de certains médiateurs comme des radicaux libres endogènes ou exogènes (66;99), ou même en raison des plaquettes qui empêcheraient le réattachement des CES à leur matrice (13;20;57). Notons également que le gonflement des CES peut nuire à la circulation intrahépatique lors de la reperfusion, en raison d'une résistance vasculaire causée par les CES de trop grand volume (16).

Par ailleurs, d'autres dommages pourraient être observés au niveau des organelles des CES. Par exemple, une étude démontre une diminution de fonctionnement des mitochondries dans des cultures de cellules endothéliales de veines ombilicales humaines même si leur membrane plasmique demeure intacte (80). Un phénomène semblable pourrait survenir chez les CES. De plus, d'autres anomalies au niveau des contacts entre cellules endothéliales, de la forme de leurs mitochondries ou du cytosquelette ont été étudiées dans les mêmes types cellulaires. On a découvert que les dommages étaient réversibles après au moins 6h de reperfusion (26).

Ces modifications structurales de l'endothélium seraient engendrées par des facteurs angiogéniques, sécrétés par les cellules de Kupffer activées. Ceux-ci sont capables d'induire la relâche de protéases destructrices du cytosquelette cellulaire et de la matrice extracellulaire (19). En effet, une augmentation de l'activité des métallo- et aspartate-protéases a été observée lors de la préservation à froid (30), ainsi qu'une action néfaste des calpaïnes (48;49). Au niveau des facteurs angiogéniques, certains candidats sont retenus, par exemple, le « vascular endothelial growth factor » (VEGF), le « basic fibroblast growth factor (bFGF) » ou encore le « hepatocyte growth factor » (HGF) (19). Or, la production de ces facteurs de croissance ne semble pas être inhibée par la préservation à froid, au contraire de la prolifération des CES qui est arrêtée par le ralentissement de leur métabolisme en préservation froide. Ces facteurs sont donc toujours sécrétés, de même que les protéases. Ceux-ci prennent donc part aux dommages ischémiques des CES. Les cellules de Kupffer ne sont pas les seules à être suspectées dans la production de ces facteurs dommageables. En effet, les cellules fibroblastiques et les CES elles-même font partie des candidates (19). L'apoptose est également considérée comme une possibilité de

dommage d'IF-RC engendré au niveau des CES. En effet, certaines molécules apparaissent suite à la reperfusion/réoxygénation comme par exemple, les radicaux libres, TNF- $\alpha$ , augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, calpaïnes, et autres molécules produites par les neutrophiles et plaquettes circulants activés. Ces composantes sont considérées comme des molécules potentiellement inductrices d'apoptose des CES (19;35).

Une des sections suivantes abordera un autre phénomène affectant également les CES suite à l'IF-RC, soit l'apparition de molécules d'adhésion à leur surface, signe précurseur du déclenchement d'une réaction immunitaire au sein de l'organe.

#### *L'oxyde nitrique (« nitric oxide » -NO)*

La production de NO par les CES fait également partie des processus affectés par le phénomène d'IF-RC du foie. Le NO est en fait un radical libre gazeux réactif et toxique, mais qui agit tout de même à titre de signal intracellulaire régulateur de la vasodilatation (89). Certains signaux hormonaux, comme l'acétylcholine et la bradykinine peuvent avoir un effet sur les CE intacts en induisant une augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire qui va agir directement sur la calmoduline. Cette dernière active la NO-synthétase pour produire le NO. Le NO peut ensuite induire une augmentation de la GMP<sub>c</sub>, qui à son tour active certaines kinases pour engendrer une relaxation des muscles lisses. Une dilatation des vaisseaux sanguins s'ensuit et le flot sanguin est ainsi augmenté (89). Or, en période d'IF, la production de plusieurs molécules est diminuée, voire même arrêtée. En effet, il y a diminution de production et d'apport en NADPH et O<sub>2</sub>, les cofacteurs essentiels à la synthèse de NO. Ainsi, le NO devient insuffisant en période d'IF (70). Les vaisseaux sanguins avoisinants ne subissent donc plus l'effet vasodilatateur bénéfique du NO. Ceci

rendrait encore plus difficile la perfusion de la solution de préservation, comme le UW à consistance plutôt visqueuse, et nuirait également à la bonne reperfusion/réoxygénation (41). Cependant, il a été démontré qu'après 6 heures de reperfusion/réoxygénation chaude de l'organe, les processus de formation du NO se remettent en branle et on observe une augmentation de ce dernier dans l'endothélium. Ceci offre une forme de protection à l'organe (39;47;64;70).

Tous ces dommages engendrés aux CES font partie des événements primaires conduisant à la perte de viabilité de l'organe transplanté suivant une période de préservation hypothermique (57).

#### *1.4.4.4 Molécules d'adhésion des CES, leucocytes et plaquettes*

Clavien et al. ont démontré en 1992 que l'IF engendrait l'accumulation de leucocytes en diverses concentrations au niveau des sinusoides du foie; donc avant qu'il n'y ait eu reperfusion. De plus, ils ont observé qu'après reperfusion, le taux d'adhésion des leucocytes dans les sinusoides était proportionnel au temps d'IF et que cette adhésion survenait à l'intérieur des 10 premières minutes de reperfusion. En effet, leurs résultats démontrent qu'après 45 minutes de préservation à froid, il y avait 40% d'adhésion lymphocytaire, et qu'après 30 heures, ce taux passait à 80% (20).

Cette adhésion leucocytaire confirme que la surface des CES est effectivement endommagée. Malheureusement peu de choses ont été éclaircies au niveau des effets de l'IF sur l'expression des molécules d'adhésion (20). Néanmoins, on croit que la période d'IF-RC déclencherait la relâche de médiateurs pro-inflammatoires solubles par les cellules

de Kupffer, les leucocytes environnants, les hépatocytes et les CES endommagés. Les principaux médiateurs relâchés sont le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 ou l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et d'autres cytokines. Les radicaux libres joueraient également un rôle à ce niveau. De plus, plusieurs études, dont une provenant de notre laboratoire (3), ont démontré que l'IF-RC pouvait causer une augmentation de la relâche du facteur de croissance VEGF par les cellules parenchymateuses. Or, on suggère que ce facteur de croissance pourrait, comme les médiateurs précédents, avoir un rôle dans l'induction de molécules d'adhésion en grande quantité à la surface des CES, initiant ainsi une réaction inflammatoire marquée au sein de l'organe préservé/transplanté (1;20;41;93).

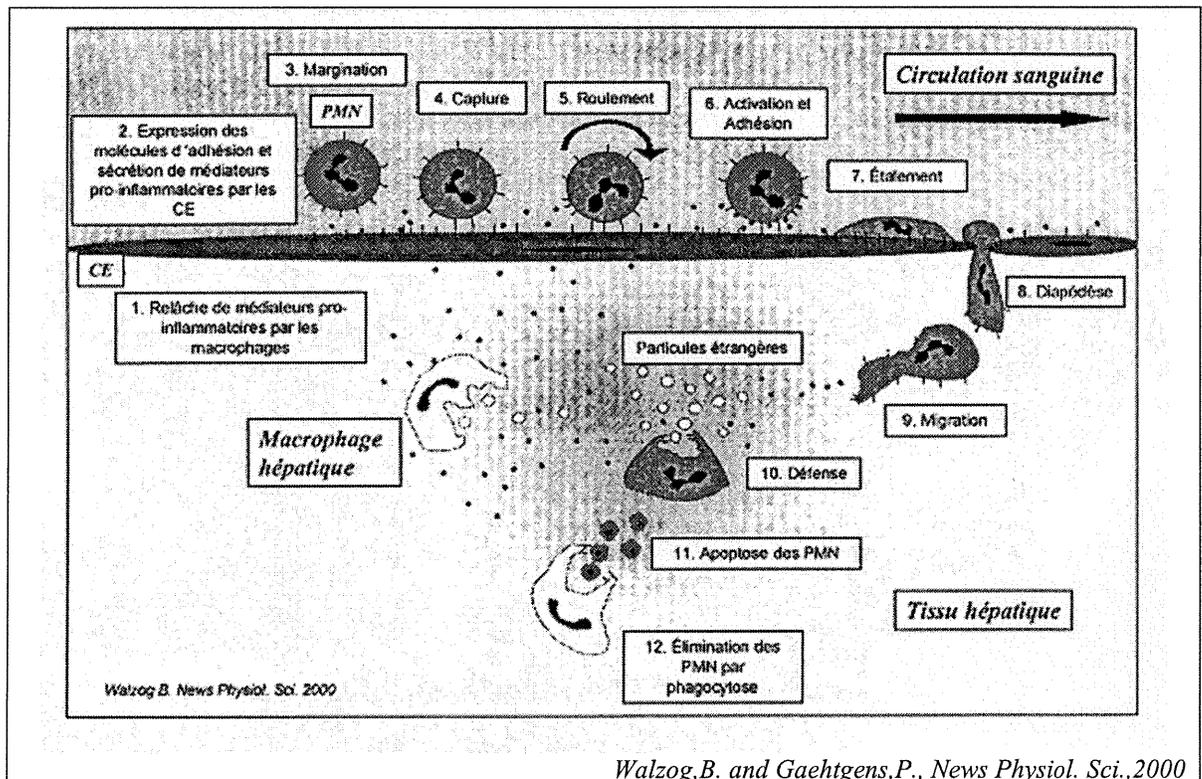
Les mécanismes impliqués dans l'adhésion leucocyte-endothélium sont mieux compris. Par exemple, sur les leucocytes, les plus importants groupes de récepteurs à être induit à la surface cellulaire sont principalement ceux des L-sélectines et des intégrines- $\beta_2$  (surtout CD11b/CD18). Sur les cellules endothéliales, on retrouve plutôt les P et E-sélectines ainsi que les ICAM-1 (« intercellular adhesion molecule-1 »), membres de la famille des immunoglobulines et ligands majeurs des intégrines- $\beta_2$  leucocytaires. On retrouve aussi, à la surface des CES, les VCAM-1 (« vascular cell adhesion molecule-1 ») qui ont une haute affinité pour les récepteurs intégrines des lymphocytes et des monocytes (20;93). La membrane plasmique des CES contient également des ELAM-1 (« endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 ») dont les contre-récepteurs sont les CD11/CD18 des neutrophiles. Finalement, une protéine membranaire granulaire de 140 kD de la famille des P-sélectines, le GMP140 est aussi présent. Ces molécules et d'autres encore font en sorte que les leucocytes vont se lier aux CES très tôt avant leur migration transendothéliale (20;25;51).

Au niveau des plaquettes, il y a aussi apparition de molécules d'adhésion à leur surface suite à une stimulation inflammatoire extérieure. Il s'agit des P-sélectines PADGEM (« platelet activation-dependent granule-external membrane proteine ») tels que les GMP 140. Ces dernières vont permettre l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles, aux monocytes et aux CES (52).

#### *1.4.4.5 Voie d'activation de l'inflammation et obstruction passive de la microcirculation*

Une fois les molécules d'adhésion induites à la surface des cellules endothéliales et des globules blancs, un nouveau phénomène se met en branle. C'est le recrutement des leucocytes vers les sites endommagés (Figure 3) (93). La première étape de ce processus consiste en la capture des leucocytes par les CES. Ainsi, les CES préalablement activées par des médiateurs pro-inflammatoires exhibent leurs P et E-sélectines. Ceci attire les leucocytes passant dans la circulation sanguine. Ces leucocytes adhèrent aux CES à l'aide de leurs L-sélectines. Il y a donc diminution de la vitesse de passage des leucocytes qui se mettent à rouler sur l'endothélium en effectuant des liaisons cellule à cellule. Ce ralentissement permet une adhésion plus ferme entre les deux types cellulaires. Cette nouvelle interaction se fait par l'entremise des ICAM-1 et des intégrines- $\beta_2$ . Les polymorphonucléaires peuvent ainsi s'étaler sur la surface de l'endothélium. Vient ensuite l'étape de la diapédèse transendothéliale qui est contrôlée par des signaux chémoattracteurs. Ces derniers sont en fait des médiateurs inflammatoires tels que le « platelet-activating factor » (PAF), les leucotriènes B<sub>4</sub> ou l'interleukine-8. Tous sont capables de se lier à un récepteur membranaire à la surface des leucocytes adhérents et de les activer afin qu'ils développent des moyens de suivre ce gradient chimiotactique à travers la monocouche de cellules endothéliales. Ainsi, les cellules endothéliales et les cellules parenchymateuses

ayant subi un dommage ischémique ou de reperfusion se font envahir par les globules blancs. Ceux-ci ont pour rôle d'éliminer les déchets résultants ou encore de réparer les dommages causés (1;38;93).



**Figure 3 – Étapes du recrutement des leucocytes par l'endothélium.**

PMN : Polymorphonucléaires; CE : cellules endothéliales

De son côté, le VEGF est capable d'induire une réponse inflammatoire dans l'organe en se liant aux récepteurs membranaires de type Flt-1 ou Flk-1 (97) activant ainsi les CES (4). Cette activation serait causée par un influx de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (77), qui induirait la phospholipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ) et la synthèse de PAF, un médiateur inflammatoire responsable d'une augmentation de perméabilité vasculaire (4). Ceci permet aux neutrophiles activés de s'insérer dans les tissus parenchymateux.

Sous l'influence du processus inflammatoire les plaquettes entrent aussi en contact avec l'endothélium ainsi qu'avec les leucocytes recrutés aux sites endommagés. La liaison se fait par l'entremise des P-sélectines plaquettaires. Dans un premier temps, les plaquettes, riches en protéases et cytokines pro-apoptotiques, peuvent fusionner avec les CES et leur transférer leur contenu cytoplasmique. Ceci pousse les CES vers davantage de dommages et entraîne même leur mort (19). Dans un deuxième temps, il peut y avoir agrégation des plaquettes qui favorise ainsi la séquestration des leucocytes dans le système vasculaire hépatique. Ces événements engendrent alors une obstruction partielle ou même complète de certains sinusoides. C'est alors que l'organe a le plus de chance de subir un rejet de son organisme hôte en raison de ces dysfonctions microvasculaires (19;91;95).

La production de NO peut également faire partie des phénomènes très dommageables pour la microcirculation du foie préservé. En effet, nous avons vu que la formation de NO dépend généralement du  $Ca^{2+}$  intracellulaire et de la calmoduline. Cependant, il existe également une voie de production du NO indépendante de la calmoduline et du  $Ca^{2+}$ . En fait, il a été démontré que les CE, cellules musculaires lisses, macrophages et neutrophiles exposés pendant de longues périodes à des cytokines, (comme en période d'inflammation et d'obstruction de la microcirculation) deviennent capables de produire de fortes quantités de NO pendant plusieurs heures. Les macrophages et neutrophiles produisent aussi des radicaux superoxydes ( $O_2^-$ ) se combinant chimiquement au NO pour former des molécules encore plus toxiques, les peroxy-nitrites ( $OONO^-$ ). Ces substances sont instables et se décomposent rapidement en radicaux hydroxydes ( $OH^*$ ) pouvant causer de graves ravages aux cellules environnantes (89). On dit également que les plaquettes expriment constitutivement la NO-synthétase et produisent du NO. Une fois en contact avec les

radicaux libres relâchés par les cellules de Kupffer, les neutrophiles ou les CES lors de la reperfusion, ce NO produirait des peroxynitrites, capables d'induire rapidement l'apoptose cellulaire (76).

#### **1.4.5 Effets de l'IF-RC sur le $Ca^{2+}$ intracellulaire des CES et rôle du $Ca^{2+}$ dans les dommages de l'IF-RC**

Une des premières études qui nous a permis d'établir un lien entre l'IF-RC, le  $Ca^{2+}$  et les dommages ischémiques, a été celle utilisant les inhibiteurs des canaux calciques voltage-dépendants de type L, comme le nisoldipine ou le vérapamil, pour améliorer la préservation du foie de rat (17;85). Mais avant de se pencher plus longuement sur les effets du  $Ca^{2+}$  et les dommages qu'il peut engendrer suite à la préservation du foie, voyons tout d'abord son rôle physiologique dans la cellule et sa régulation homéostatique.

##### *1.4.5.1 Rôle physiologique du calcium*

Dans la cellule normale, le  $Ca^{2+}$  joue plusieurs rôles régulateurs très importants. En effet, il peut être responsable 1) du couplage excitation-contraction dans les cellules musculaires (lisses ou squelettiques) par interaction avec la calmoduline, 2) de la régulation de plusieurs enzymes et cascades du métabolisme cellulaire, 3) de la régulation de l'endocytose et l'exocytose, 4) de la transmission du signal pour différentes hormones telles que la norépinéphrine, le glucagon et la vasopressine, 5) de la relâche de neurotransmetteurs, 6) de l'activation de facteurs de coagulation comme la prothrombine et 7) de la production de NO dépendante de la calmoduline dans les CE (18;89). On comprend donc qu'une fine régulation de sa concentration intracellulaire est impérative.

#### 1.4.5.2 L'homéostasie du calcium et l'IF-RC

Les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires sont normalement maintenues à des niveaux très bas ( $10^{-7}\text{M}$ ) en comparaison au milieu extracellulaire ( $10^{-3}\text{M}$ ) (18). Ces concentrations sont régulées par 1) une compartimentalisation ATP-dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  libre de la cellule dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique (RE), 2) son extrusion à travers la membrane plasmique par les pompes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases et les échangeurs  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  et 3) sa chélation par des protéines intracellulaires et des anions (18;20). Cependant, lors de la préservation hypothermique, la production d'ATP est arrêtée au niveau des mitochondries, ce qui interrompt l'extrusion de  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule par les pompes ATP-dépendantes. De plus, le  $\text{Ca}^{2+}$  devient libre de voyager vers l'intérieur de la cellule via des canaux membranaires ou encore de sortir de ses sites de stockage mitochondriaux ou du RE. Les radicaux libres produits pendant la réoxygénation par les plaquettes et les cellules de Kupffer peuvent également causer un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule lors de la reperfusion de l'organe (20;29;53).

Cette augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans les CES peut activer de multiples cascades moléculaires. Certaines mènent à la translocation et/ou à la formation de molécules adhésives, comme celles vues précédemment, à la surface des cellules. En effet, certaines études ont démontré que l'augmentation du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  favorisait la fusion avec la membrane plasmique des corps de Weibel-Palade, une organelle sécrétoire de l'endothélium. Les GMP-140 (P-sélectines) qu'ils contiennent se trouvent donc relocalisés à la membrane (20;56). De plus, une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  active la  $\text{PLA}_2$ , enzyme responsable de la relâche de PAF, un lipide pro-inflammatoire déjà mentionné (2586).

Ainsi, l'apparition des P-sélectines et du PAF à la surface de l'endothélium engendre une interaction avec les polymorphonucléaires et plaquettes circulants (33;90;93;95). Ce processus inflammatoire pourrait donc causer l'accumulation de globules blancs au site des dommages cellulaires (90;91;95) et, comme décrit précédemment, induire l'occlusion des sinusoides. Ceci empêche la reperfusion complète de l'organe avec du sang lors de la transplantation, tel qu'observé dans l'ischémie du myocarde (28;74). De plus, la relâche de médiateurs cytotoxiques comme les radicaux libres en grande quantité dans cette « congestion inflammatoire » peut devenir encore plus dommageable pour les cellules avoisinantes (20), menant même au détachement des CES de la surface de leur matrice comme nous l'avons vu précédemment (14;20;57). Ces effets réunis peuvent donc mener à la dysfonction du greffon, voir même éventuellement à sa perte de viabilité et à son rejet.

#### *1.4.5.3 ATP en tant qu'agoniste extracellulaire*

L'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire peut par ailleurs être modulée par divers stimuli extracellulaires, tels que l'ATP, la bradykinine, l'histamine et la thrombine au niveau des CES (69). Par ailleurs, l'ATP joue un rôle dans la stimulation de la glycogénolyse chez les hépatocytes, ou encore dans la propagation d'un signal intercellulaire entre les hépatocytes et les cellules du conduit biliaire du foie de rat (27). Au niveau des CES, l'ATP stimule la production de NO (10).

Le mode d'action de l'ATP sur une cellule hépatique est le suivant. L'ATP va se lier à un récepteur membranaire purinergique couplé à la protéine  $G_q$ , ce qui stimule la dissociation de la sous-unité  $\alpha_q$  activée. Cette dernière se lie à la phospholipase C et l'active. Ceci provoque une augmentation de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate ( $\text{PIP}_2$ )

pour libérer l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le diacylglycérol (DAG). L'augmentation de l'IP<sub>3</sub> cause ensuite la relâche rapide et transitoire des réserves internes de Ca<sup>2+</sup> de la cellule se traduisant graphiquement par un pic prononcé. Cette étape est suivie, généralement, d'une phase plus soutenue se traduisant par l'entrée de Ca<sup>2+</sup> à partir du milieu extracellulaire (69;96). Notons par ailleurs que la réponse à l'agoniste purinergique ATP est fréquemment utilisée comme moyen de vérifier les fonctions de cellules auxquelles on aurait fait subir certaines perturbations physiques ou métaboliques.

#### **1.4.6 Les effets de l'IF-RC sur la viabilité-apoptose/nécrose des CES**

Des études ont démontré qu'après 20 à 24 heures de préservation hypothermique du foie suivies de 8 minutes de RC, 4% des cellules non-parenchymateuses étaient mortes selon la coloration au Bleu de Trypan (16). Par contre, après 20 à 24 heures de préservation et 15 minutes de reperfusion, 33% des cellules non-parenchymateuses étaient mortes. Notons que 80% des cellules non-parenchymateuses colorées au Bleu de Trypan sont d'origine endothéliale, soient des CES. Ces résultats laissent donc présager le rôle très important que joue la reperfusion/ré-oxygénation dans la mort des CES, phénomène également observé par d'autres chercheurs (24). On a longtemps cru, et certains croient encore, que cette mort des CES suite à une période d'IF-RC est due à la nécrose, qu'on appelle aussi nécrose coagulative, mort accidentelle ou oncose (19;34). Plusieurs évidences démontrent maintenant que les CES mourraient plutôt par apoptose (32). En effet, ce constat fait suite à des marquages cellulaires, ou encore à l'ajout d'agents anti-apoptotiques dans la solution de préservation de foies de rats ayant eu un effet protecteur (19). De plus, une corrélation inverse a été établie entre le nombre de cellules apoptotiques et la viabilité du greffon (32).

De son côté, l'apoptose peut être provoquée de plusieurs manières. En premier lieu l'activation des caspases représente une voie très courante d'apoptose (60). Tel que décrit plus haut, des évidences ont aussi démontré que les plaquettes, riches en protéases et en cytokines pro-apoptotiques seraient elles aussi en partie responsables de l'apoptose des CES (19;76). Enfin, les calpaïnes, des protéines non-lysosomales dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  et capables de s'attaquer au cytosquelette et aux protéines membranaires, sont les autres médiateurs impliqués dans ce phénomène (48;49;75). On peut donc comprendre que l'apoptose des CES suite à une période d'IF-RC est un autre facteur de très grande importance participant aux dysfonctions du foie transplanté.

### **1.5 Prémisses de la présente étude**

Quelques études ont démontré qu'une hypothermie aiguë engendre une augmentation du niveau basal de calcium intracellulaire chez les hépatocytes de rat isolés (35;46). Nous avons également observé le même phénomène chez les CES isolées (35). Cependant il n'existe aucune étude sur l'homéostasie calcique des CES pendant la période de reperfusion/réoxygénation. Notre laboratoire a récemment démontré que l'IF-RC entraîne une augmentation du niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  basal et une exagération de la réponse à l'ATP, agoniste mobilisateur de  $\text{Ca}^{2+}$  (27) dans les hépatocytes. Il était donc pertinent d'évaluer l'impact de l'IF-RC sur l'homéostasie calcique des CES, compte tenu de tous les éléments discutés plus haut reliant le  $\text{Ca}^{2+}$  à plusieurs phénomènes dommageables.

Le but du présent projet était donc de déterminer l'effet des changements de la composition et de la température des solutions de reperfusion/ré-oxygénation sur le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  basal dans des CES isolées de rat. Nous voulions également évaluer la réponse calcique à

l'agoniste purinergique ATP. Cette étude permettrait donc de mettre en lumière les changements d'homéostasie calcique engendrés au niveau des CES suite à l'IF-RC et éventuellement d'élucider leur part de responsabilité dans les dommages causés à l'organe qui finissent souvent par provoquer leur dysfonction et même leur rejet suite à la transplantation. Nous voulions également, à l'aide d'une étude préliminaire, mesurer les effets de la reperfusion/ré-oxygénation sur les taux d'apoptose et de nécrose dans les CES.

Le chapitre qui suit décrit le protocole utilisé afin d'évaluer les pourcentages de viabilité, apoptose et nécrose au niveau des CES préservées/reperfusées. Les résultats et l'analyse de ces manipulations seront abordés dans la section « Discussion » du présent ouvrage. Le manuscrit faisant état des résultats et de l'analyse obtenus lors des expérimentations sur l'homéostasie calcique des CES est présenté au chapitre 3. Il a été soumis à la revue scientifique *Liver Transplantation* à des fins de publication. L'ensemble de toutes ces manipulations et résultats ont été réalisés au cours de cette maîtrise en pharmacologie.

## 2 MESURES D' APOPTOSE ET DE NÉCROSE

Une étude préliminaire a été effectuée afin d'évaluer les taux d'apoptose et de nécrose chez les CES isolées soumises à des conditions d'IF-RC. Nous avons eu recours à une technique de double coloration au Hoechst 33342 (HO 342) et à l'iodure de propidium (IP). Dans un premier temps, le HO 342, un fluorochrome capable de pénétrer librement à travers la membrane plasmique des cellules vivantes, colore leur ADN en bleu. De son côté, l'IP est beaucoup plus polaire, donc incapable de pénétrer dans les cellules dont les membranes plasmiques sont intactes. Il ne colore ainsi que l'ADN des cellules nécrotiques dont la membrane commence à s'altérer. La coloration est alors rouge-orangée. Pendant l'apoptose, la membrane plasmique demeure intacte, mais le noyau se condense ou se fragmente. On remarque ainsi des noyaux bleus plus brillants ou fragmentés. On peut également distinguer des noyaux roses, qui représentent des cellules apoptotiques dans une phase tardive menant vers la nécrose.

### 2.1 Méthodologie

Les cellules ont été isolées, ensemencées et préservées selon la méthode décrite à la section 3.4.1 de « Experimental procedures » du manuscrit du chapitre 3. Les préparations de CES, ensemencées entre 1 et  $2 \times 10^6$  cellules/ml, ont donc été préservées à 4°C dans le UW pendant 0 (témoins non-préservés), 12 et 24 heures. De plus, un autre groupe de cellules témoins ont été mises en culture dans le milieu RPMI à 37°C, afin d'être testé aux mêmes temps que les autres, mais sans préservation hypothermique. Trois protocoles ont ensuite été appliqués pour le réchauffement et la coloration des préparations comme l'indique le Tableau II. Les solutions de réchauffement à 20°C et 37°C utilisées (UW, HEPES, HEPES

sans  $\text{Ca}^{2+}$ , ainsi que le milieu de culture RPMI) sont les mêmes que celles décrites aux sections 3.4.1 et 3.4.2 de « Experimental procedures » du manuscrit du chapitre 3. Au niveau de la coloration cellulaire, chaque préparation contenait une concentration finale de  $4\mu\text{M}$  de HO 342 et de  $1,5\mu\text{M}$  d'IP (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Les cellules en phase de coloration étaient maintenues dans un incubateur à  $37^\circ\text{C}$  pendant 30 à 45 minutes sous atmosphère humidifiée de 95%  $\text{O}_2$  - 5%  $\text{CO}_2$ .

**Tableau II – Protocoles expérimentaux de réchauffement des CES pour la mesure d'apoptose et de nécrose.**

<b>A</b>	UW ( $20^\circ\text{C}$ ) [Réchauffement 30']	→	HEPES ( $37^\circ\text{C}$ ) [Charge colorants 30-45']	→	Compte cellulaire
<b>B</b>	UW ( $20^\circ\text{C}$ ) [Réchauffement 30']	→	HEPES sans $\text{Ca}^{2+}$ ( $37^\circ\text{C}$ ) [Charge colorants 30-45']	→	Compte cellulaire
<b>C</b>	HEPES ( $20^\circ\text{C}$ ) [Réchauffement 30']	→	HEPES ( $37^\circ\text{C}$ ) [Charge colorants 30-45']	→	Compte cellulaire
<b>F</b>			RPMI ( $37^\circ\text{C}$ ) [Charge colorants 30-45']	→	Compte cellulaire

Suite à la réalisation de ces différents protocoles, les lamelles comportant les CES adhérees étaient placées sur la platine d'un microscope inversé Nikon Eclipse TE-200. Elles étaient ensuite observées et comptées manuellement sous lumière fluorescente. Un cube NARUV comportant un filtre d'excitation D365/10X et un filtre d'émission GG400 longpass a servi à distinguer la fluorescence bleue de la coloration de Hoechst. Un cube HQ R/D11 comportant un filtre d'excitation 530-545 nm et un filtre d'émission 610-675 nm a servi à distinguer la coloration rouge-orangée de la coloration à l'iodure de propidium. Les images de fluorescence ont été acquises par une caméra digitale Hamamatsu Orca-II CCD et un ordinateur Inovision géré par un logiciel Isee (Inovision Corporation, Raleigh, NC, USA).

## **2.2 Analyse et statistiques**

Chaque groupe expérimental comptait de 3 à 7 préparations cellulaires. Les résultats ont été analysés par une analyse de variance factorielle (Two-way ANOVA). Une valeur de  $P < 0,05$  était considérée comme significative.

### 3 PRESENTATION DU MANUSCRIT

#### **COLD ISCHEMIA/WARM RE-OXYGENATION PERTURBS CYTOSOLIC $Ca^{2+}$ HOMEOSTASIS IN RAT LIVER SINUSOIDAL ENDOTHELIAL CELLS**

Stéphanie Auger, Diane Vallerand and Pierre Selim Haddad

Department of Pharmacology and Membrane Transport Research Group, Université de  
Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Running Title : Liver endothelial cell  $Ca^{2+}$  in cold ischemia-reperfusion

Keywords : Fura-2AM, ATP, University of Wisconsin solution, reperfusion injury

**Address correspondance to :**

Pierre S. Haddad, Ph.D.  
Department of Pharmacology  
Université de Montréal  
P.O. Box 6128, Downtown Station  
Montreal, QC, H3C 3J7  
Canada  
Tel. : 514-343-6590  
Fax : 514-343-2291  
E-mail : pierre.haddad@umontreal.ca

**Grants and financial support**

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (MOP14579). S. Auger was the recipient of studentships from the Groupe de Recherche en Transport Membranaire, Montréal and the Faculty of Graduate Studies of the Université de Montréal. P.S. Haddad is a National Research Scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

### 3.1 Abstract

Increases in sinusoidal endothelial cell (SEC) intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  may play a crucial role in mediating the expression of adhesion molecules and hence contribute to the microcirculatory disturbances observed in primary graft dysfunction. The effect that changes in the composition/temperature of reperfusion solution have on cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  were therefore studied in isolated rat SEC. Cells were preserved in cold University of Wisconsin (UW) solution for 0, 12 or 24 hrs, loaded with Fura-2AM at 20°C in HEPES-buffered physiological solution (H-20) or in UW (UW-20). SEC  $\text{Ca}^{2+}$  was measured by cytofluorimetry. Basal steady-state  $\text{Ca}^{2+}$  was much lower when SEC were loaded in UW-20 ( $37 \pm 2$  nM) than in HEPES-20 ( $114 \pm 32$  nM). In unstored controls (0 hr), going from UW-20 to HEPES 37°C (H-37) induced a large transient rise ( $185 \pm 31$  nM) in SEC  $\text{Ca}^{2+}$ , which was greatly inhibited ( $43 \pm 13$  nM) in  $\text{Ca}^{2+}$ -free H-37. A similar large transient was observed when going from UW-20 to H-20 ( $163 \pm 22$  nM). Changing temperature only (20 to 37°C) in UW or HEPES had a much smaller effect on SEC  $\text{Ca}^{2+}$  ( $14 \pm 2$  nM and  $60 \pm 18$  nM, respectively). These changes were similar in cold-preserved cells. In unstored controls, solution changes greatly attenuated the intensity of subsequent  $\text{Ca}^{2+}$  responses to the purinergic agonist ATP. Prior cold preservation greatly attenuated both the frequency of appearance and the intensity of ATP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses. Hence, changing reperfusion solution composition has a greater impact on SEC steady-state  $\text{Ca}^{2+}$  than changing temperature. Prior cold preservation does not significantly affect changes in SEC steady-state  $\text{Ca}^{2+}$ , but greatly impairs the capacity of SEC to subsequently respond to  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing agonists.

### **3.2 Abbreviations**

CI/WR: Cold Ischemia/Warm Re-oxygenation

SEC: Sinusoidal Endothelial Cell

UW: University of Wisconsin solution

### 3.3 Introduction

Orthotopic liver transplantation has emerged as the most effective mean of treatment for end stage liver disease over the last 15-20 years. Unfortunately, liver graft failure remains a significant problem because approximately 15% of grafts still show primary dysfunction or nonfunction, which cause serious morbidity and mortality (1). It is now widely suggested that this dysfunction may be due to organ injuries caused during the process of cold ischemia and warm re-oxygenation (CI/WR) necessitated by the transplantation procedure (1-3). The precise mechanisms of these injuries are still unclear, but sinusoidal endothelial cells (SEC) appear to be particularly vulnerable to cold ischemic storage of the liver and could be implicated in local inflammatory reactions (4-6). In fact, during CI/WR events, SEC undergo dramatic morphological changes (6-8) and they express adhesion molecules that contribute to the microcirculatory occlusion observed during primary dysfunction (1;7;9). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  could play a key role in this disorder.

In general,  $\text{Ca}^{2+}$  is usually maintained at very low levels in the cytoplasm ( $10^{-7}\text{M}$ ) compared with the extracellular medium ( $10^{-3}\text{M}$ ) (10). These low concentrations are maintained by the compartmentalization of free  $\text{Ca}^{2+}$  into the mitochondria and endoplasmic reticulum, its active extrusion across the plasma membrane and its chelation by cell proteins (1). However, hypothermic preservation reduces the production of ATP by the mitochondria, which limits the extrusion/storage of cell  $\text{Ca}^{2+}$  by ATP-dependent pumps. Hypothermia also induces an imbalance of the electrical potential of the cell that can lead to an uncontrolled influx of  $\text{Ca}^{2+}$  through plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channels (1). Moreover, the reactive oxygen intermediates released during reperfusion (1;11) are known to cause  $\text{Ca}^{2+}$  influx (12).

Such alterations in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in preserved SEC could activate multiple intracellular cascades leading, among other events, to translocation and expression of adhesive molecules on the surface of the cells. Indeed, increases in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  trigger the fusion of Weibel-Palade bodies, the secretory organelles of the endothelium, with the plasma membrane. This results in the translocation of GMP-140 (P-selectins) proteins that they contain (1;13). On an other hand, cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  increase is known to activate phospholipase  $\text{A}_2$ , the enzyme releasing platelet activating factor, a pro-inflammatory lipid (9). The appearance of P-selectin and platelet activating factor on the surface of the SEC can mediate the interaction between the hepatic microvasculature and the circulating blood cells and platelets (14-17). For instance, such an inflammatory process causes an accumulation of white cells at the site of injury (14;16;18), and may induce the occlusion of microvessels causing areas of no reflow during reperfusion, as observed in myocardial ischemia (19;20). In the liver, it appears that platelets are more involved in this phenomenon at intrahepatic sites (14). Finally, the release of cytotoxic mediators like reactive oxygen intermediates at the site of inflammation can be harmful for the surrounding cells (1), even leading to the detachment of SEC from the extracellular matrix (1;4;7). Altogether, these effects may participate in graft dysfunction, but the exact role of  $\text{Ca}^{2+}$  has not yet been elucidated.

Different studies have begun exploring the role of  $\text{Ca}^{2+}$  in CI/WR injury. For instance, the use of inhibitors of L-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels (e.g. nisoldipine or verapamil) to improve preservation of rat livers, has been one of the first elements suggesting the important role of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in liver preservation injury (21;22). However, SEC do

not seem to be the target of these drugs (23;24). Studies from Kim and Southard (25) and from our laboratory (24) have shown that acute hypothermia causes an increase in steady-state  $\text{Ca}^{2+}$  in isolated hepatocytes. We also observed the same process in isolated SEC (24). In hepatocytes subjected to transplantation-like conditions (cold ischemia and warm re-oxygenation), our laboratory recently found an increase in steady-state  $\text{Ca}^{2+}$  and an exaggeration of the response to a  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing agonist (26).

However, studies on SEC  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis after cold ischemia and warm re-oxygenation have never been presented. The aim of this study was therefore to determine the effect that changes in the composition and temperature of re-oxygenation solutions have on steady-state intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in cold-preserved liver SEC, as well as on their response to the purinergic  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing agonist, ATP.

### **3.4 Experimental procedures**

#### **3.4.1 Cell isolation, culture and preservation**

Animals used in this study were treated in accordance with the guidelines of the Canadian Council on the Care of Animals, and all experimental protocols were approved by our university's ethics committee. SEC were isolated from livers of fed male Wistar rats weighing 250-300 g (Charles River, St-Constant, QC, Canada) by a variation of the method of SEC isolation proposed by Braet et al. (27). Briefly, rats were anesthetized with intraperitoneal injections of 50 mg/kg sodium pentobarbital (Centre de Distribution de Médicaments Vétérinaires, Ste-Hyacinthe, QC, Canada) before surgery. Livers were digested with a 0.035% collagenase-A (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) in a 5%

FCS-HI-GBSS solution (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.84 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.28 mM MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 1 mM MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 5.5 mM D-glucose, 2.7 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O). SEC were then purified on a discontinuous Percoll gradient (25% top – 50% bottom), and plated at a concentration of about 1 to 2 x 10<sup>6</sup> cells/ml onto collagen S-coated round glass coverslips. The purity of SEC cell preparations were assessed by FACS Scan using fluorescently-labeled LDL, and exceeded 82.5% (result not illustrated). SEC were then incubated for 8 hrs in RPMI 1640 medium (pH 7.4 at 37°C) supplemented with 2% FCS-HI (Sigma-Aldrich, Mississauga, ON, Canada), NaHCO<sub>3</sub> (24 mM), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) in a humidified atmosphere of 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>, to allow the cells to recover from the isolation procedure. Culture medium was then changed for cold UW solution (Du Pont Pharma, Mississauga, ON, Canada) and cells were kept at 4°C for 0 (unstored controls), 12 and 24 hrs. This step reproduced the period of cold ischemia of a liver transplantation.

### **3.4.2 Intracellular Calcium Measurement**

Cells were loaded with 2.5 µM of the fluorochrome Fura-2AM (Cedarlane, Eugene, OR, USA) for 30 minutes at 20°C in UW solution (UW 20°C) or in a HEPES-buffered solution (HEPES 20°C) (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 3.8 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 5 mM D-glucose, 1 mM Na-Pyruvate, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O, pH 7.4 at 20°C). Preliminary experiments showed that dye loading was impossible at 4°C. Coverslips with adhered SEC were then placed in a specially-designed 100 µl plastic chamber (Groupe de Recherche en Transport Membranaire, Montréal, QC, Canada) on the stage of an inverted microscope (Olympus IMT-2, Carsen Medical, Markham, ON, Canada) coupled to a spectrofluorimeter (Deltascan RF-D4010, Photon Technology International, London, ON,

Canada). Excitation wavelengths were 350 and 380 nm, and fluorescence emission was measured at 505 nm. Intracellular dye calibration was performed *in situ* on each preparation by perfusion of ionomycin-containing solutions, as previously described (28). The OSCAR software supplied by Photon Technology International was used to convert fluorescence ratios (F350/F380 - values corrected for autofluorescence) into intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . After the dye-loading period, cells were perfused at a flow rate of 2-3 ml/min with solutions of different composition (UW, HEPES, HEPES  $\text{Ca}^{2+}$ -free (containing 4 mM EGTA) or HEPES with 100  $\mu\text{M}$  ATP) and different temperature (20°C or 37°C), as described in Table III. Changes of solution were made with an eight-way solenoid valve (General Valve, Fairfield, NJ, USA) having zero dead space. When used, physiological temperature was maintained at 37°C  $\pm$  1°C with a custom-made heating tube (Groupe de Recherche en Transport Membranaire, Montréal, QC, Canada). This step reproduced the warm re-oxygenation step of a liver transplantation.

**Table III – Experimental protocols for the measurement of intracellular SEC  $\text{Ca}^{2+}$  after changes in composition and/or temperature of re-oxygenation solutions**

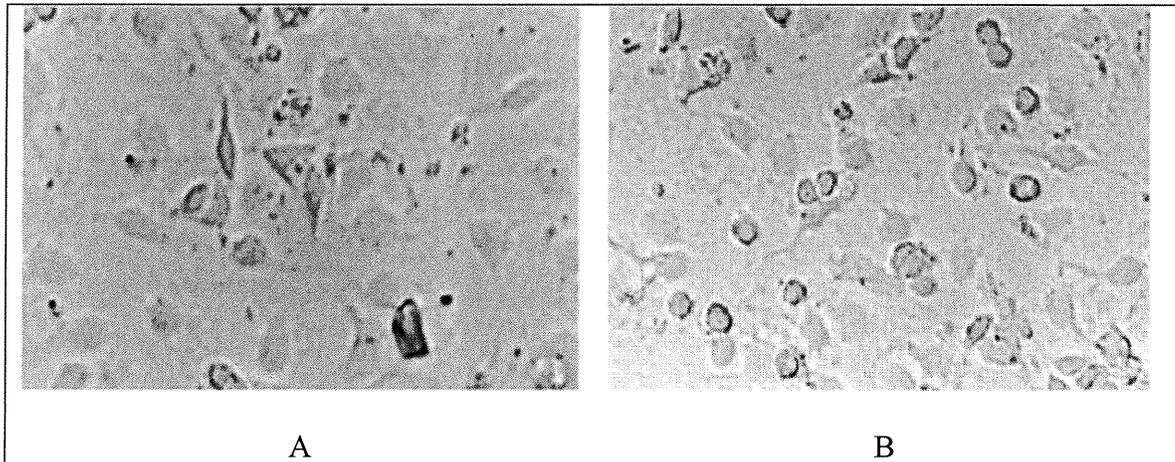
<b>A</b>	UW (20°C) →	UW (20°C) →	HEPES (37°) →	ATP Response	
	[Dye loading 30']	[2-3']	[10']	[1']	
<b>B</b>	UW (20°C) →	UW (20°C) →	$\text{Ca}^{2+}$ free HEPES (37°C) →	$\text{Ca}^{2+}$ free ATP Response	
	[Dye loading 30']	[2-3']	[10']	[1']	
<b>C</b>	HEPES (20°C) →	HEPES (20°C) →	HEPES (37°C) →	ATP Response	
	[Dye loading 30']	[2-3']	[10']	[1']	
<b>D</b>	UW (20°C) →	UW (20°C) →	UW (37°C) →	HEPES (37°C) →	ATP Response
	[Dye Loading 30']	[2-3']	[5']	[10']	[1']
<b>E</b>	UW (20°C) →	UW (20°C) →	HEPES (20°C) →	HEPES (37°C) →	ATP Response
	[Dye Loading 30']	[2-3']	[10']	[5']	[1']

### 3.4.3 Data analysis and statistics

Each experiment was performed with at least 10 to 15 cells in the microscopic field per experimental protocol and per SEC preparation. Values are presented as means  $\pm$  SEM of the indicated number of cell preparations (n) and thus encompass averages of a much larger number of cells. Results were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA), except for the frequency of SEC  $\text{Ca}^{2+}$  responses to ATP that was analyzed by a Chi-square test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3.5 Results

Isolated SEC displayed a typical elongated morphology when put in culture for 8 hr after the isolation procedure (Figure 4A). Preservation of the cells in cold UW solution for 12 hrs causes a great proportion of the cells to adopt a more rounded morphology (Figure 4B). Such rounding up was seen previously in the whole organ (7) and confirms the validity of our *in vitro* model.



**Figure 4 – Morphological changes induced by cold preservation *in vitro* in isolated rat liver SEC.**

- A) Isolated SEC adhered to collagen-S-coated glass coverslips and allowed to recover for 8 hrs in RPMI medium display the typical elongated morphology of cultured endothelial cells. (400X magnification)
- B) After 12 hrs in UW solution at 4°C, isolated SEC take on a more rounded appearance, reproducing the morphological changes induced by cold storage of the whole organ (4). (400X magnification)

Steady-state intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration before re-oxygenation with solutions of different composition and temperature was higher in SEC loaded with Fura-2AM in HEPES buffer 20°C ( $114 \pm 32$  nM, n = 10 preparations) than in counterparts loaded in UW 20°C ( $37 \pm 2$  nM, n = 44 preparations,  $p < 0.05$ ). These values were not affected by prior cold preservation time (Table IV).

**Table IV – Basal steady-state intracellular SEC Ca<sup>2+</sup> (nM) in the various experimental protocols.**

Experimental Protocol	Cold Preservation Time		
	0 hr	12 hrs	24 hrs
<b>A</b> UW (20°C) → HEPES (37°C)	37 ± 4 (n=16)	28 ± 6 (n=13)	33 ± 7 (n=8)
<b>B</b> UW (20°C) → Ca <sup>2+</sup> free HEPES (37°C)	35 ± 4 (n=11)	23 ± 4 (n=15)	31 ± 8 (n=9)
<b>C</b> HEPES (20°C) → HEPES (37°C)	114 ± 32* (n=10)	112 ± 19* (n=8)	98 ± 19* (n=7)
<b>D</b> UW (20°C) → UW (37°C)	33 ± 3 (n=9)	27 ± 5 (n=14)	41 ± 8 (n=8)
<b>E</b> UW (20°C) → HEPES (20°C)	42 ± 4 (n=8)	29 ± 6 (n=11)	37 ± 9 (n=7)

Values are means ± SEM of the specified number of cell preparation (n). SEC intracellular Ca<sup>2+</sup> levels (nM) were measured after a Fura-2AM dye loading of 30 min in UW or HEPES 20°C followed by one of the different indicated protocols (A to E) after 0, 12 or 24 hrs of cold preservation (4°C) in UW. \*Significantly different from all other groups (p < 0.05).

Unstored controls (0hr) loaded in UW 20°C and re-oxygenated with HEPES 37°C, showed a large transient rise in SEC Ca<sup>2+</sup> (increase of 185 ± 31 nM, n = 16 preparations, Table V, protocol A). This rise was greatly inhibited when a Ca<sup>2+</sup>-free HEPES 37°C solution (4 mM EGTA) was used to re-oxygenate the preparations (increase of only 43 ± 13 nM, n = 11 preparations, Table V, protocol B, p<0.05). Similarly, a very weak increment of cytosolic Ca<sup>2+</sup> was observed when SEC were perfused with UW at 37°C, a medium also nominally exempt of Ca<sup>2+</sup> (rise of 14 ± 2 nM, n = 9 preparations, Table V, protocol D, p<0.05). The

temporal changes in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in these conditions are depicted in Figure 5A (protocols A, B and D).

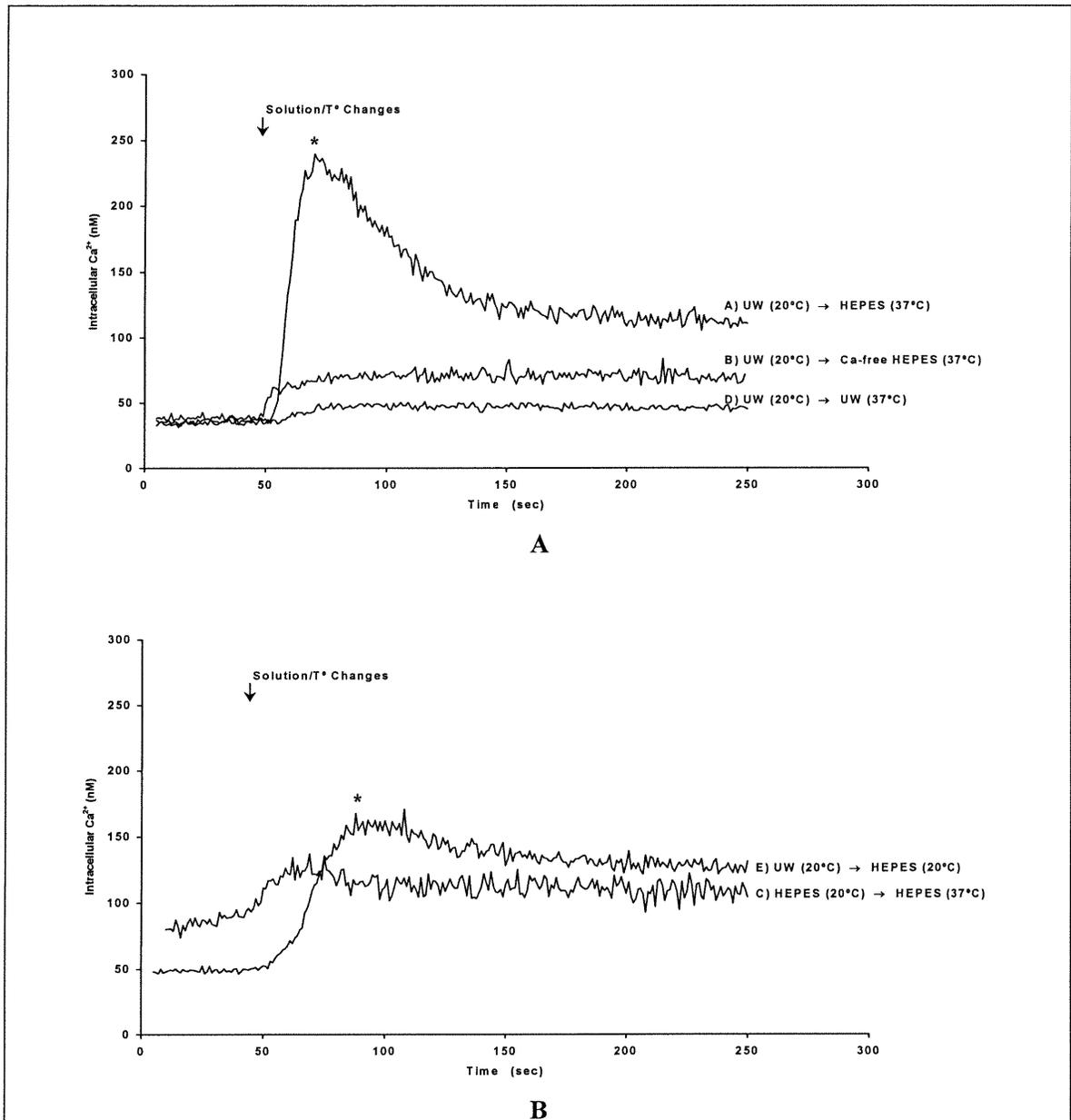
**Table V – Peak increase in SEC  $\text{Ca}^{2+}$  (nM) induced by changes in solution composition and temperature after CI/WR.**

Experimental Protocol	Cold Preservation Time		
	0 hr	12 hrs	24 hrs
<b>A UW (20°C) → HEPES (37°C)</b>	185 ± 31 (n=16)	118 ± 35 (n=13)	108 ± 19 (n=8)
<b>B UW (20°C) → <math>\text{Ca}^{2+}</math> free HEPES (37°C)</b>	43 ± 13* (n=11)	47 ± 10* (n=15)	90 ± 12* (n=7)
<b>C HEPES (20°C) → HEPES (37°C)</b>	60 ± 18* (n=9)	68 ± 25* (n=8)	46 ± 16* (n=7)
<b>D UW (20°C) → UW (37°C)</b>	14 ± 2† (n=9)	6 ± 2† (n=11)	1 ± 7† (n=8)
<b>E UW (20°C) → HEPES (20°C)</b>	163 ± 22 (n=8)	138 ± 28 (n=11)	123 ± 12 (n=7)

Values are means ± SEM of the specified number of cell preparation (n). SEC intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels (nM) were measured after a Fura-2AM dye loading of 30 min in UW or HEPES 20°C followed by one of the different indicated protocols (A to E) after 0, 12 or 24 hrs of cold preservation (4°C) in UW. \* Significantly different from groups A and E ( $p < 0.05$ ); † significantly different from all other groups ( $p < 0.05$ ).

Changing only the temperature (20 to 37°C) of HEPES buffer induced a rapid, transient but significantly smaller increase of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations (60 ± 18 nM, n = 9 preparations, Table V) than that caused by the change of both solution and temperature – UW 20°C to HEPES 37°C buffer ( $p < 0.05$ , protocol C versus protocol A). On the other

hand, changing solution composition (UW to HEPES), while keeping the temperature constant at 20°C, elevated SEC intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration by  $163 \pm 22$  nM (n = 8 preparations, Table V, protocol E, NS), which was not statistically different from the UW 20°C to HEPES 37°C group (protocol A). The temporal changes in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in these conditions are depicted in Figure 5A and 5B (protocols A, C and E).

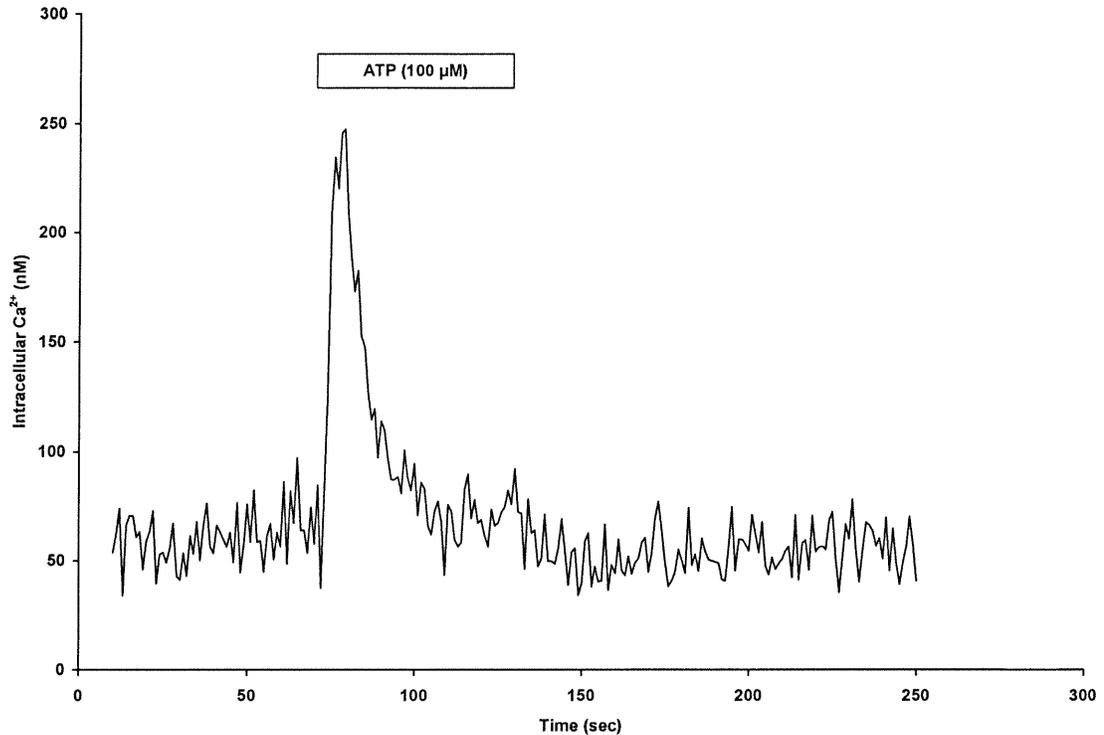


**Figure 5 – Effects of changes in solution composition and/or temperature on steady-state intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in SEC**

- A) SEC intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels (nM) were measured after a Fura-2AM dye loading period of 30 min in UW 20°C followed by HEPES 37°C (curve A),  $\text{Ca}^{2+}$ -free HEPES 37°C (curve B) or UW 37°C (curve D). \* The peak increase in SEC  $\text{Ca}^{2+}$  for protocol A is significantly higher than peak increases of protocols B and D ( $p < 0.05$ ).
- B) SEC intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels (nM) were measured after a Fura-2AM dye loading period of 30 min in UW 20°C followed by HEPES 20°C (curve E). In curve C, cells were loaded with Fura-2AM in HEPES 20°C and re-oxygenated with HEPES 37°C. \* The peak increase in SEC  $\text{Ca}^{2+}$  for protocol C is significantly lower than peak increases of protocols E ( $p < 0.05$ ).

Cold preservation for 12 and 24 hrs, prior to all solution composition/temperature changes, did not significantly affect basal steady-state  $\text{Ca}^{2+}$  levels in SEC (Table IV). Nor did prior cold storage in UW solution modify the response of SEC cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  to subsequent changes in reperfusion solution composition and/or temperature (Table V, all protocols).

Once SEC  $\text{Ca}^{2+}$  stabilized to a new steady-state after solution/temperature changes (and always eventually back to HEPES 37°C buffer – see Table III), cells were challenged with the purinergic agonist ATP. The response was quantified by analyzing the area under the  $\text{Ca}^{2+}$ -versus-time curve (Figure 6). We observed that when the SEC were loaded with Fura-2AM in HEPES 20°C buffer, and then reperfused at 37°C in the same solution, the response was significantly higher ( $1.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ,  $n = 8$  preparations,  $p < 0.05$ ) than under the other protocols (ranging from 0.6 to 0.9  $\mu\text{M}$ , see Table VI). In EGTA-chelated  $\text{Ca}^{2+}$ -free buffer, SEC were particularly perturbed, as evidenced by the weak frequency or absence of response to the  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing agonist (Table VII). In contrast to results on steady-state SEC  $\text{Ca}^{2+}$  presented above, prior cold preservation significantly attenuated the intensity and the frequency of appearance of SEC  $\text{Ca}^{2+}$  responses to ATP ( $p < 0.01$ , Table VII). This was most prominent for groups preserved 24 hrs in UW solution and reperfused with  $\text{Ca}^{2+}$ -free buffers (EGTA-containing HEPES) or UW.



**Figure 6 – Response of SEC Ca<sup>2+</sup> (μM) to purinergic agonist ATP after CI/WR.**

SEC intracellular Ca<sup>2+</sup> responses to agonist ATP were measured once SEC cytosolic Ca<sup>2+</sup> stabilized to a new steady-state after a Fura-2AM dye loading of 30 min in UW or HEPES 20°C followed by different established protocols (A to E, see Table 1) previously preserved for 0, 12 or 24 hrs in cold (4°C) UW. The curve is representative of responses obtained within experimental protocols C.

**Table VI – Intensity of SEC Ca<sup>2+</sup> response (μM) to purinergic agonist ATP after CI/WR.**

Experimental Protocol	Cold Preservation Time		
	0 hr	12 hrs	24 hrs
<b>A UW (20°C) → HEPES (37°C)</b>	0.9 ± 0.2 (n=15)	0.4 ± 0.1 (n=13)	0.6 <sup>†</sup> (n=8)
<b>B UW (20°C) → Ca<sup>2+</sup> free HEPES (37°C)</b>	0.6 / 0.6 (n=11)	NR (n=15)	NR <sup>†</sup> (n=7)
<b>C HEPES (20°C) → HEPES (37°C)</b>	1.4 ± 0.3* (n=8)	1.6 ± 0.2* (n=8)	<sup>†</sup> 0.5 ± 0.2* (n=7)
<b>D UW (20°C) → UW (37°C)</b>	0.6 ± 0.1 (n=9)	0.4 / 0.2 (n=11)	NR <sup>†</sup> (n=8)
<b>E UW (20°C) → HEPES (20°C)</b>	0.6 ± 0.1 (n=8)	0.6 ± 0.1 (n=11)	NR <sup>†</sup> (n=7)

Values are means ± SEM of the specified number of cell preparation (n). SEC intensity of Ca<sup>2+</sup> response (μM) to purinergic agonist ATP, were measured after a Fura-2AM dye loading of 30 min in UW or HEPES 20°C followed by one of the different indicated protocols (A to E) after 0, 12 or 24 hrs of cold preservation (4°C) in UW. ATP stimulation (1 minute) was applied once SEC Ca<sup>2+</sup> stabilized in HEPES 37°C to a new steady-state after solution/temperature changes. The intensity of Ca<sup>2+</sup> response to ATP was measured by the area under the Ca<sup>2+</sup>-versus-time curve. The values represent the mean ± SEM for the experiments where a response was observed. When less than 3 responses were observed, actual values observed are given alone (only one response) or separated by slash (two responses); n thus refers to the number of experiments performed, not to the number of responders (that value can be found in Table VII which presents the frequencies of response to ATP). NR: No response; \* Significantly different from all other groups within a given cold preservation time (p < 0.05); † Significantly different from all other preservation times within an experimental protocol (p < 0.05).

**Table VII – Frequency of SEC Ca<sup>2+</sup> response to agonist ATP after CI/WR.**

Experimental Protocol	Cold Preservation Time			P <sub>Time</sub>
	0 hr	12 hrs	24 hrs	
<b>A UW (20°C) → HEPES (37°C)</b>	80% (n=15)	54% (n=13)	13% (n=8)	< 0.01
<b>B UW (20°C) → Ca<sup>2+</sup> free HEPES (37°C)</b>	18% (n=11)	0% (n=15)	0% (n=7)	N.S.
<b>C HEPES (20°C) → HEPES (37°C)</b>	100% (n=8)	63% (n=8)	57% (n=7)	N.S.
<b>D UW (20°C) → UW (37°C)</b>	78% (n=9)	18% (n=11)	0% (n=8)	< 0.01
<b>E UW (20°C) → HEPES (20°C)</b>	100% (n=8)	64% (n=11)	0% (n=7)	< 0.01
<b>P<sub>Protocol</sub></b>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	

Values represent the proportion of responses (in percent) observed in the total number of experimental series (n) for each experimental protocol and at each cold preservation time. Statistical significance was evaluated by Chi square analysis for the various experimental protocols (P<sub>Protocol</sub>) and preservation times (P<sub>Time</sub>).

### 3.6 Discussion

In this study, we measured intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in sinusoidal endothelial cells after cold ischemia and warm re-oxygenation (CI/WR), steps that mimic *in vitro* the conditions that the grafted liver is subjected to during the *in vivo* transplantation procedure. Our model appropriately reproduced the morphological changes (rounding up) induced to SEC by cold storage, as previously observed in the isolated perfused rat liver (7). On the other hand, we demonstrate for the first time that  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in SEC is significantly perturbed after CI/WR. Steady-state cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in SEC is affected by changes in the composition and temperature of the reperfusion solution, as is the subsequent response to a  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing agonist.

The largest response of basal steady-state SEC cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  to solution changes was observed when UW at 20°C was changed to physiological HEPES buffer at 37°C. This large transient was due in major part to an influx of  $\text{Ca}^{2+}$  from the external milieu. Indeed, it was greatly inhibited by chelation of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  with EGTA and was absent when warm UW (a nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution) was used. The small increase in SEC cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  that was nonetheless observed after warm re-oxygenation in  $\text{Ca}^{2+}$ -free HEPES suggests that a small degree of release from intracellular stores may occur, but further studies will be necessary to address this point. Moreover, after a 30-min dye-loading period in UW solution, we found that basal SEC cytosolic was less than 40 nM, as compared to over 100 nM when physiological HEPES buffer was used. This suggests that SEC can readily lose  $\text{Ca}^{2+}$  when kept in low  $\text{Ca}^{2+}$  solutions. This may also lead to the exhaustion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores, as discussed further below.

On the other hand, our results clearly show that changes in the composition of the perfusing solution are more important than changes in temperature in order to mediate the initial transient rise in SEC cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ . Indeed, even when the solution change from UW to HEPES was carried out at room temperature ( $20^{\circ}\text{C}$ ), SEC cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  rose to an extent very similar to that seen with HEPES at physiological temperature. Conversely, when perfusion temperature was increased from 20 to  $37^{\circ}\text{C}$  in physiological HEPES buffer, a much smaller increase in SEC cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  was observed. Our results are relevant to the clinical setting since the UW solution has an intracellular-like composition (high potassium/low sodium) and thus must be flushed out of the liver before re-establishment of blood flow in the recipient. In our studies, the fluorochrome Fura-2AM was loaded into cells at room temperature. This mimics the “rewarming” phase of liver transplantation, whereby the graft warms up while surgical re-anastomosis is underway.

Our results indicate that rewarming in a physiological solution is preferable to that in UW solution. This is again relevant since there is still debate as to whether it is better to rinse the graft with UW at room temperature or with solutions of physiological composition (29). In particular, the group at the University of North Carolina has developed a Carolina rinse solution, which appears to improve initial graft function (30-32). Our physiological HEPES buffer approximates this condition.

It is also in such physiological buffer that responses to  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing agonists, such as ATP, were best preserved. Our results clearly show that SEC are particularly sensitive to low or absent external  $\text{Ca}^{2+}$ . Indeed, responses to ATP were dramatically reduced in frequency and intensity after reperfusion with  $\text{Ca}^{2+}$ -free HEPES. Prior cold preservation

greatly exacerbated this effect and reperfusion with low  $\text{Ca}^{2+}$  solutions (UW,  $\text{Ca}^{2+}$ -free HEPES) abolished ATP responses in 24 hrs-preserved cells. This may be related to the exhaustion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pools mentioned above. Indeed, Gq-coupled agonist responses in SEC, as in other cells, rely on an initial mobilization of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores (33).

Cells subjected to a change in solution composition, in normal external  $\text{Ca}^{2+}$  conditions, were also negatively affected by cold preservation in a time-dependent manner. In contrast, cells loaded in HEPES 20°C and re-oxygenated in HEPES 37°C maintained the best responses to the  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing agonist. Our results therefore strongly suggest that flushing cold UW and rewarming the liver in physiological buffer may be the best way to minimize initial cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  transients and preserve appropriate  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in SEC after reperfusion.

Our results are consistent with the recent preliminary observations from the group of Strasberg and collaborators (*Hepatology* 39:248A, 2000 (Abstract); *Hepatology* 34:234A, 2001 (Abstract)). These authors demonstrated that inhibiting changes in SEC intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  with BAPTA or dantrolene prevented an increase in calpain activity and actin re-arrangement after cold preservation. Indeed, calpains are nonlysosomal cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ -dependant cysteine proteases involved in proteolysis of cytoskeletal elements, such as actin fibers, as well as membrane proteins (34). Upadya et al. recently confirmed that the activation of calpain in cold-preserved SEC results in actin disassembly and matrix metalloprotease secretion (*Hepatology* 34:234A, 2001 (Abstract)). These phenomena also provoke the rounding up and detachment of SEC from the extracellular matrix and

eventually their apoptosis, a situation that can be prevented by the use of calpain inhibitors (34) (*Hepatology* 39:248A, 2000 (Abstract); *Hepatology* 34:234A, 2001 (Abstract)).

Our observation that cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  rises after reperfusion can also provide an explanation for the relatively frequent microcirculatory problems in transplantation injury. Indeed, such a rise of  $\text{Ca}^{2+}$  can induce the expression or translocation of inflammatory/adhesive mediators like platelet activating factor or selectins on the SEC surface (1;9;13). These mediators probably participate in the inflammatory process observed at the level of sinusoids in the grafted organ. This can lead to the occlusion of microvessels, to areas of no-flow and, ultimately, to graft failure (16;18-20). Hence, conditions that can minimize the elevation of SEC cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  may reduce these local inflammatory reactions.

In conclusion, our results clearly demonstrate that steady-state intracellular SEC  $\text{Ca}^{2+}$  is affected by changes in composition and temperature of reperfusion solutions with changes of solution composition having the greatest impact. Prior cold preservation does not affect steady-state cytosolic SEC  $\text{Ca}^{2+}$ , or its response to solution changes, but greatly perturbs response to  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing agonists, such as ATP. Such responses are best preserved when SEC are rewarmed with a physiological buffer and then reperfused at 37°C with the same. Our study therefore supports the notion that it is better to rinse the liver graft with a physiological solution at room temperature prior to re-establishing oxygenated blood flow in the recipient. Our studies also pave the way to testing other solutions/modifications to minimize initial SEC steady-state  $\text{Ca}^{2+}$  and maintain agonist responses after cold preservation-warm reoxygenation, in order to improve initial graft function.

### **3.7 Acknowledgements**

We thank Filip Braet from the Free University of Brussels (VUB), Belgium, for his precious help and counseling with the SEC isolation technique. Portions of this work were presented at the annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases in November 2001, Dallas, TX, and were published previously in abstract form (*Hepatology* 34:194A, 2001).

### **3.8 References**

1. Clavien P-A, Harvey PRC, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. *Transplantation* 1992;53:957-978.
2. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Surg.* 2001;181:160-166.
3. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J.Hepatology* 1996;25:774-780.
4. McKeown CMB, Edwards V, Phillips MJ, Harvey RC, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 1988;46:178-191.
5. Clavien P-A. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 1998;28:281-285.

6. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka S, Thurman RG. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat liver. *Hepatology* 1989;10:292-299.
7. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: Effects of reperfusion. *Hepatology* 1991;13:83-95.
8. Eberl T, Salvenmoser W, Rieger G, Gorny I, Heiß V, Kumpitsch B, Gnaiger E, Margreiter R. Ultrastructural analysis of human endothelial cells after hypothermic storage in organ preservation solutions. *J Surg Res* 1999;82:253-260.
9. Whatley RE, Nelson P, Zimmerman GA, Stevens DL, Parker CJ, McIntyre TM, Prescott SM. The regulation of platelet-activating factor production in endothelial cells. *J Biol Chem* 1989;264:6325-6333.
10. Cheung J, Bonventre J, Malis C, Leaf A. Calcium and ischemic injury. *New Eng J Med* 1986;314:1670-1676.
11. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit.CareMed.* 1988;16:947-953.
12. Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J.Clin.Invest.* 1988;82:2045-2055.

13. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J.Clin.Invest.* 1989;84:92-99.
14. Yadav SS, Howell DN, Steeber DA, Harland RC, Tedder TF, Clavien P-A. P-selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration on the warm ischemic mouse liver. *Hepatology* 1999;29:1494-1502.
15. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990;343(6260):757-760.
16. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Physiol.* 1994;267:G786-G793
17. Walzog B, Gaehtgens P. Adhesion molecules: the path to a new understanding of acute inflammation. *News Physiol.Sci.* 2000;15:107-113.
18. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am.J.Physiol.* 1996;270:G798-G803
19. Engler RL, Schmid-Schonbein GW, Pavelec RS. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am.J.Pathol.* 2002;111:98-111.

20. Simpson PJ, Todd RF3, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Lucchesi BR. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J.Clin.Invest.* 1988;81:624-629.
21. Cheng S, Ragsdale JR, Sasaki AW, Lee RG, Deveney CW, Pinson CW. Verapamil improves rat hepatic preservation with UW solution. *J.Surg.Res.* 1991;50:560-564.
22. Takei Y, Marzi I, Kauffman FC, Currin RT, Lemasters JJ, Thurman RG. Increase in survival time of liver transplants by protease inhibitors and a calcium channel blocker, nisoldipine. *Transplantation* 1990;50:14-20.
23. de Broin E, Urata K, Giroux L, Lepage R, Huet P-M. Effect of calcium antagonists on rat liver during extended cold preservation-reperfusion. *Transplantation* 1997;63:1547-1554.
24. Haddad P, Cabrillac J-C, Piche D, Musallam L, Huet P-M. Changes in intracellular calcium induced by acute hypothermia in parenchymal, endothelial, and Kupffer cells of the rat liver. *Cryobiology* 1999;39:69-79.
25. Kim JS, Southard JH. Alterations in cellular calcium and mitochondrial functions in the rat liver during cold preservation. *Transplantation* 1998;65:369-375.
26. Elimadi A, Haddad PS. Cold preservation-warm reoxygenation increases hepatocyte steady-state  $Ca^{2+}$  and response to  $Ca^{2+}$ -mobilizing agonist. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 2001;281:G809-G815

27. Braet F, De Zanger R, Sasaoki T, Baekeland M, Janssens P, Smedsrod B, Wisse E. Methods in laboratory investigation - Assessment of a method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells. *Lab.Invest.* 1994;70:944-952.
28. Benzeroual K, Van de Werve G, Meloche S, Mathé L, Romanelli A, Haddad P. Insulin induces  $Ca^{2+}$  influx into isolated rat hepatocytes couplets. *Am.J.Physiol.* 1997;272:G1425-G1432
29. Kukan, M. and Haddad, P. S. Role of hepatocytes and bile duct cells in preservation-reperfusion injury of liver grafts. 2001. (GENERIC)  
Ref Type: Unpublished Work
30. Currin RT, Toole JG, Thurman RG, Lemasters JJ. Evidence that Carolina rinse solution protects sinusoidal endothelial cells against reperfusion injury after cold ischemic storage of rat liver. *Transplantation* 1990;50:1076-1078.
31. Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurman RG, Steers JL, Wahlstrom HE, Hay EI, Porayko MK, Wiesner RH, Krom RAF. Carolina rinse solution decreases liver injury during clinical liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 1993;25:1574-1575.
32. Post S, Palma P, Rentsch M, Gonzalez AP, Menger MD. Differential impact of Carolina rinse and University of Wisconsin solutions on microcirculation, leukocyte adhesion, Kupfer cell activity and biliary excretion after liver transplantation. *Hepatology* 1993;18:1490-1497.

33. Schilling WP, Elliott SJ.  $\text{Ca}^{2+}$  signaling mechanisms of vascular endothelial cells and their role in oxidant-induced endothelial cell dysfunction. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 1992;262:H1617-H1630
34. Sindram D, Kohli V, Madden JF, Clavien P-A. Calpain inhibition prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver. *Transplantation* 1999;68:136-140.

## 4 DISCUSSION

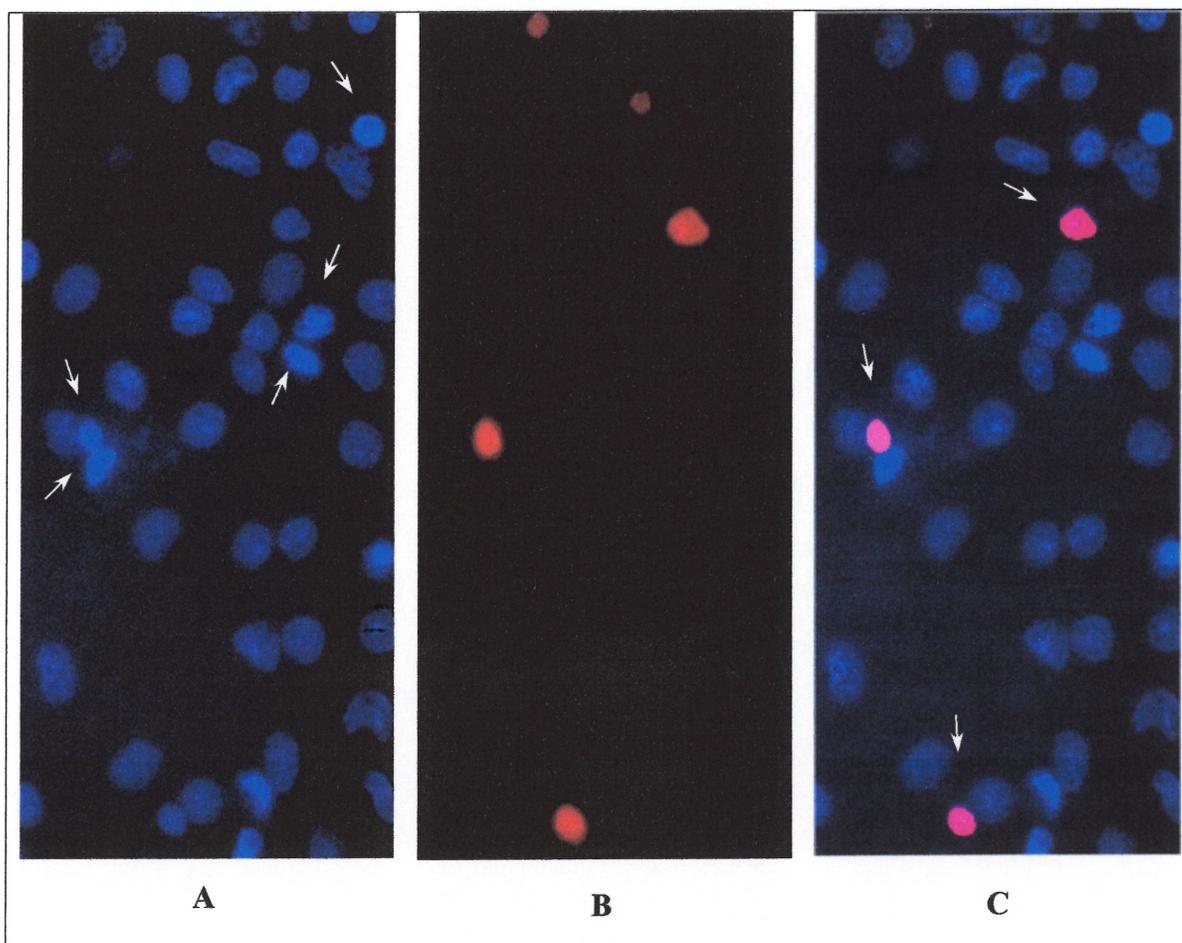
Cette dernière partie du mémoire traite des différents effets de l'IF-RC sur les CES isolées. Certains nouveaux résultats seront présentés et mis en relation avec ceux présentés dans la section précédente. Ainsi, nous aborderons les effets des changements de composition et de température des solutions de reperfusion sur la morphologie des CES et la mort par apoptose ou par nécrose chez des CES préalablement préservées à froid. Ensuite, nous discuterons des effets de la composition et de la température des solutions de reperfusion sur l'homéostasie calcique des CES, puis sur la capacité des CES à répondre à l'agoniste purinergique ATP. Enfin, nous élaborerons sur la pertinence du modèle expérimental utilisé ainsi que sur les différentes autres avenues de recherches à explorer à l'aide de ce modèle afin d'élucider davantage de questions liées aux dommages tissulaires et cellulaires causés aux foies transplantés.

### 4.1 Effets de la composition et température des solutions de reperfusion sur la morphologie, l'apoptose et la nécrose des CES préservées

En premier lieu, nous avons effectué une courte étude morphologique des CES avant et après préservation froide, afin de s'assurer de la validité de notre modèle *in vitro*. Nous avons alors observé une morphologie typique des CES sous de telles conditions, soit des cellules allongées lorsque mises en culture après isolation et des cellules plutôt arrondies après 12 heures de préservation. Les images de ces résultats sont présentées dans le manuscrit du chapitre 3. Ainsi, nous pouvons affirmer que notre modèle reproduit bien les changements morphologiques représentatifs induits par la préservation froide, comme déjà observés par d'autres chercheurs (14).

La prochaine partie de cet ouvrage a été réalisée à la fin de ce projet de maîtrise et ne représente en fait qu'une étude préliminaire qu'il reste encore à perfectionner. Elle portait sur les états de viabilité, d'apoptose et de nécrose des CES préservées à froid et ré-oxygénées à chaud. Ainsi, notre interprétation des résultats se trouve limitée par le nombre restreint de préparations cellulaires disponibles lors de ces manipulations.

La figure suivante (Figure 7) montre l'aspect de cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques, selon la double coloration au Hoechst et à l'iodure de propidium, dans des préparations de CES. Ce type d'image nous servait à effectuer un compte cellulaire afin de déterminer les taux d'apoptose et de nécrose chez les CES après IF dans le UW et réchauffement dans différentes solutions.



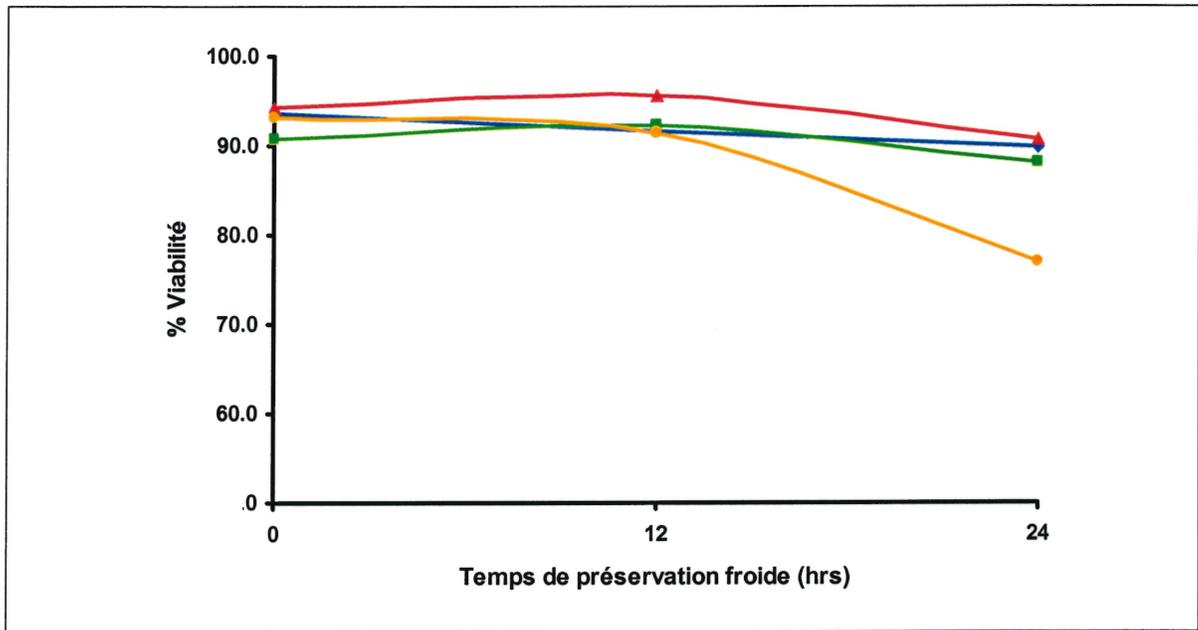
**Figure 7 – Aspect des CES viables, apoptotiques et nécrotiques, colorées au HO 342 (4  $\mu\text{M}$ ) et à l'IP (1,5  $\mu\text{M}$ ) après préservation hypothermique et ré-oxygénation.**

- A) Effet de la coloration de HO 342 seule pour distinguer les cellules vivantes et apoptotiques. Les cellules apoptotiques démontrent un noyau bleu plus brillant que celui des cellules normales ( $\rightarrow$ ).
- B) Effet de la coloration à l'IP seule pour distinguer les cellules nécrotiques de couleur orangée.
- C) Effet de la double coloration HO 342 et IP pour distinguer les cellules vivantes, apoptotiques et apoptotiques tardives-nécrotiques colorées en rose ( $\rightarrow$ ).
- Les cellules ont été réchauffées 30 min à la température de la pièce, puis incubées en présence des colorants pendant la ré-oxygénation à 37°C de 30 à 45 min.  
(Grossissement 400X)

#### 4.1.1 Viabilité des CES préservées-reperfusées

Selon nos résultats et en se référant à la Figure 8, nous avons observé que le taux de viabilité des CES se maintenait constant et au-dessus des 85% même suite à des périodes de

préservation froides de 12 et 24 heures, quel que soit le protocole utilisé pour réchauffer les cellules. Concernant le groupe non préservé, soient les cellules incubées dans leur milieu de culture RPMI, sa viabilité chute de façon significative dans le temps, surtout au bout de 24 heures d'incubation. Ce phénomène pourrait cependant s'expliquer par le fait que notre milieu de culture n'était pas supplémenté en facteurs de croissance qui auraient pu être nécessaires au bon maintien de la viabilité cellulaire. Par ailleurs, la viabilité est légèrement plus élevée lorsque le réchauffement des CES avait lieu dans un tampon physiologique (HEPES 20°C à 37°C) par rapport aux autres groupes. Ce résultat concorde avec les résultats obtenus en mesure de calcium, tel que décrit dans le manuscrit présenté au chapitre 3 et dont nous reparlerons plus loin. Ils suggèrent qu'un réchauffement dans un tampon physiologique avant la réoxygénation à une température de 37°C préserverait mieux les CES de la mort cellulaire.

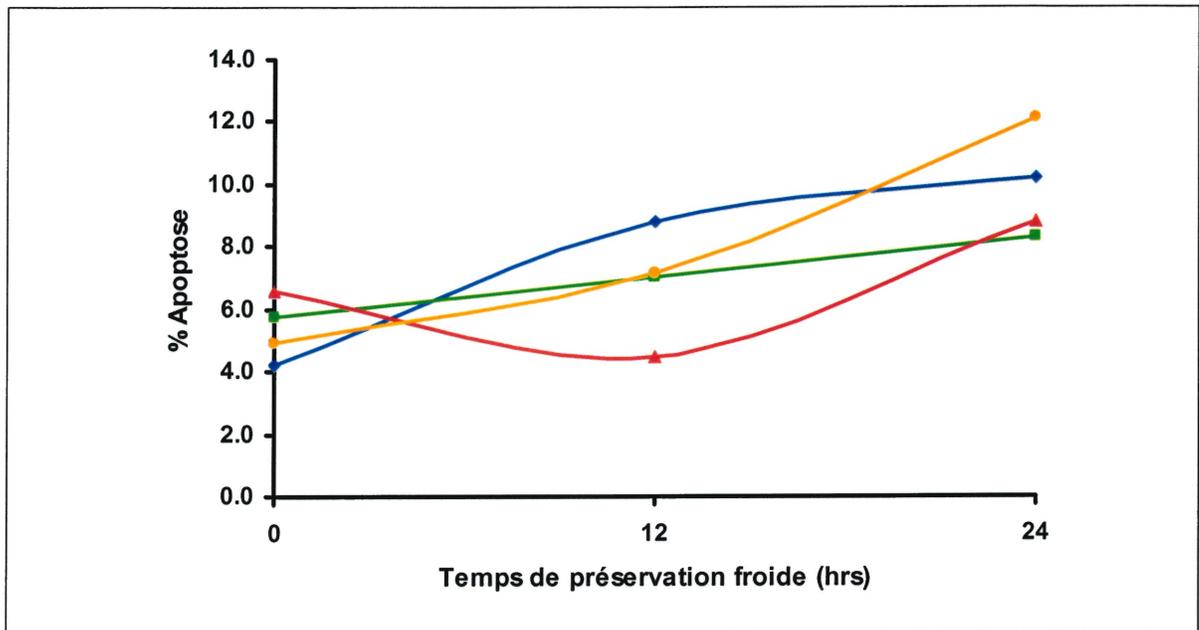


**Figure 8 – Effets des changements de composition et/ou température de réchauffement sur la viabilité des CES préalablement préservées à froid.**

La viabilité était calculée après un réchauffement des préparations cellulaires à température pièce, suivie d'une incubation avec les colorants HO 342 (4  $\mu\text{M}$ ) et PI (1,5  $\mu\text{M}$ ) pendant 30 à 45 min à 37°C selon les protocoles suivants : A- UW (20°C)  $\rightarrow$  HEPES (37°C) (—), B- UW (20°C)  $\rightarrow$  HEPES sans  $\text{Ca}^{2+}$  (37°C) (—), C- HEPES (20°C)  $\rightarrow$  HEPES (37°C) (—) et F- RPMI (37°C) (—). Rappelons que les cellules du protocole F n'ont subi aucune période de préservation hypothermique. Les taux de viabilité ont été calculés en soustrayant le nombre de cellules apoptotiques et nécrotiques au nombre de cellules total.

#### 4.1.2 Apoptose des CES préservées-reperfusées

Au niveau des taux d'apoptose, nous pouvons voir, à la Figure 9 qu'ils augmentent tous par rapport au temps d'IF, bien que la signification statistique ne soit pas atteinte. Ce phénomène est tout à fait en accord avec les études qui démontrent que les CES sont très fragiles et sont d'autant plus affectées par la préservation froide prolongée (13;19;20;41). Cependant, la trop grande variabilité des résultats ne permet pas de dégager des différences significatives entre les groupes expérimentaux.



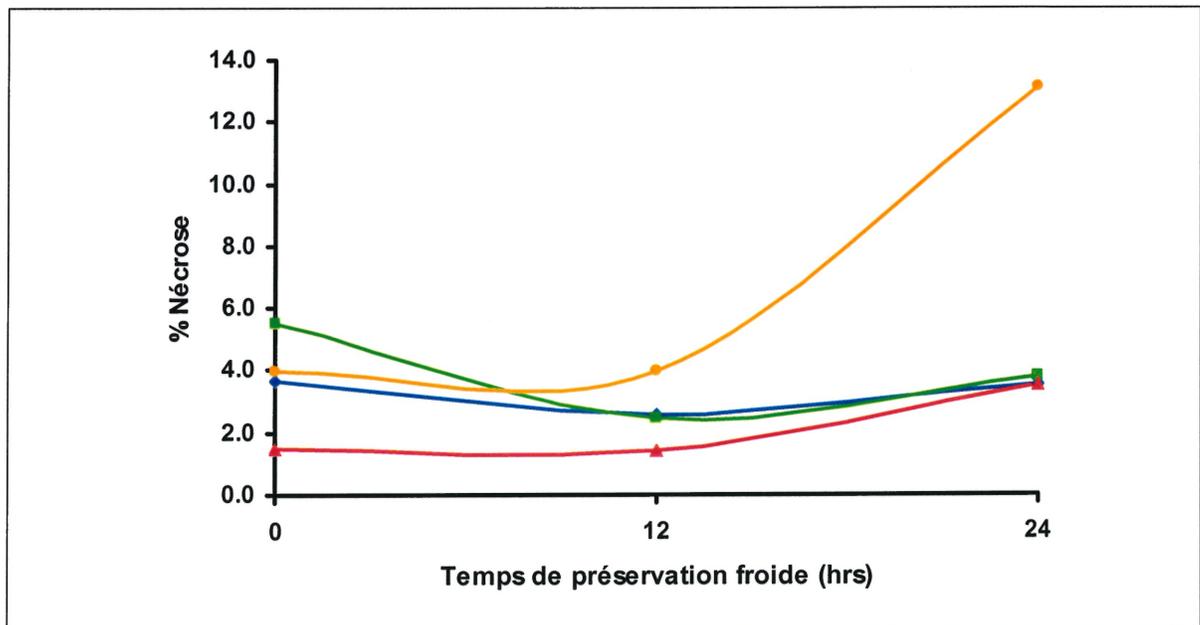
**Figure 9 – Effets des changements de composition et/ou température de réchauffement sur l’apoptose des CES préalablement préservées à froid.**

L’apoptose était calculée après un réchauffement des préparations cellulaires à température pièce, suivie d’une incubation avec les colorants HO 342 (4  $\mu\text{M}$ ) et PI (1,5  $\mu\text{M}$ ) pendant 30 à 45 min à 37°C selon les protocoles suivants : A- UW (20°C) → HEPES (37°C) (—), B- UW (20°C) → HEPES sans  $\text{Ca}^{2+}$  (37°C) (—), C- HEPES (20°C) → HEPES (37°C) (—) et F- RPMI (37°C) (—). Rappelons que les cellules du protocole F n’ont subi aucune période de préservation hypothermique.

#### 4.1.3 Nécrose des CES préservées-reperfusées

Au niveau des taux de nécrose rencontrés dans les CES suite à une période d’IF-RC (Figure 10), on remarque qu’ils sont presque deux fois moins élevés que les taux d’apoptose, sauf pour les cellules maintenues en culture. En effet, en de telles conditions, les taux d’apoptose et de nécrose sont presque égaux. Ainsi, une fois de plus, ce dernier groupe de cellules, en accord avec les résultats de viabilité et apoptose, suggère qu’une grande part de dommages cellulaires sont survenus pendant leur culture et ont entraîné leur mort. En ce qui concerne le réchauffement des CES dans le tampon physiologique, nous avons observé que les cellules sont moins affectées par la nécrose que les autres groupes suite à une

période de préservation hypothermique de moins de 12 heures. Ceci confirme que le réchauffement en milieu physiologique est grandement favorable à la protection des CES contre les dommages nécrotiques de l'IF-RC. On note toutefois que la nécrose augmente légèrement en fonction du temps de préservation froide dépassant les 12 heures. Par contre, les CES réchauffées dans le milieu de préservation suivi du tampon physiologique, tout comme celles réchauffées dans un milieu sans  $\text{Ca}^{2+}$ , montrent des taux de nécrose qui semblent diminuer en fonction du temps d'hypothermie. Cependant, en considérant les forts niveaux de variabilité de cette expérience, on serait plutôt porté à affirmer que ces taux demeurent constants. Le temps de préservation hypothermique n'aurait donc pas d'influence sur l'augmentation de la mort par nécrose.



**Figure 10 – Effets des changements de composition et/ou température de réchauffement sur la nécrose des CES préalablement préservées à froid.**

La nécrose était calculée après un réchauffement des préparations cellulaires à température pièce, suivie d'une incubation avec les colorants HO 342 (4  $\mu\text{M}$ ) et PI (1,5  $\mu\text{M}$ ) pendant 30 à 45 min à 37°C selon les protocoles suivants : A- UW (20°C) → HEPES (37°C) (—), B- UW (20°C) → HEPES sans  $\text{Ca}^{2+}$  (37°C) (—), C- HEPES (20°C) → HEPES (37°C) (—) et F- RPMI (37°C) (—). Rappelons que les cellules du protocole F n'ont subi aucune période de préservation hypothermique.

En résumé, après que des préparations de CES aient été soumises à diverses conditions d'IF-RC, nous avons observé que les taux d'apoptose augmentent en fonction du temps de préservation froide préalable et que la mort par apoptose est supérieure à celle par nécrose dans tous les protocoles de réchauffement, mais non chez les cellules mises en culture physiologique à long terme. Le fait que le taux d'apoptose soit plus élevé que celui de nécrose est tout à fait en accord avec la majorité des études publiées jusqu'à maintenant (32). Par ailleurs, lorsque les CES étaient réchauffées à l'aide d'un tampon physiologique passant de 20°C à 37°C, ces dernières montraient en général un taux de viabilité légèrement supérieur, ainsi que des taux d'apoptose et de nécroses plus faibles qu'en situation de réchauffement impliquant la solution de préservation UW ou un milieu sans  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces observations appuient une fois de plus l'hypothèse voulant que le réchauffement de l'organe avec un tampon physiologique serait en mesure d'offrir une meilleure préservation des fonctions cellulaires.

#### **4.2 Effets de la composition et température des solutions de reperfusion sur l'homéostasie calcique intracellulaire des CES préservées**

Cette section traite des résultats présentés dans le manuscrit du chapitre 3. Nous avons mesuré les niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosoliques dans les CES après différentes étapes d'IF-RC, étapes reproduisant *in vitro* les conditions que subissent des foies transplantés *in vivo*. La présente étude nous a permis de démontrer pour la première fois que l'homéostasie calcique des CES est significativement perturbée par l'IF-RC. En effet, nous avons pu observer que le niveau basal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est affecté par des changements de composition et de température des solutions de reperfusion.

La réponse calcique la plus importante que nous ayons observée par rapport à un changement de solution est celui où la solution UW à 20°C a été changé pour un tampon physiologique HEPES à 37°C. Cet important changement transitoire était principalement engendré par une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du milieu extracellulaire. En effet, ce mouvement calcique était grandement inhibé lorsque la ré-oxygénation se faisait dans un milieu où le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire était chélaté par l'EGTA ou totalement inhibé lorsque la ré-oxygénation se faisait dans un milieu ne contenant que des traces de calcium, comme le UW. Par ailleurs, un faible degré de relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  par les réserves intracellulaires pourrait également survenir dans les conditions de ré-oxygénation. C'est ce qu'indique une plus faible augmentation du niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique observée après ré-oxygénation chaude dans un milieu HEPES sans  $\text{Ca}^{2+}$ . Cependant, une étude plus approfondie sera nécessaire afin d'affirmer clairement cet aspect des changements calciques lors de la RC. De plus, après une période de chargement en fluorochrome de 30 minutes dans la solution UW, nous avons observé que le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  basal des CES se situait à moins de 40 nM. Par contre, il atteignait des concentrations voisines de 100 nM lorsque le tampon physiologique HEPES était utilisé. Ces résultats suggèrent donc que les CES peuvent déjà perdre des quantités de  $\text{Ca}^{2+}$  lorsque maintenues dans des milieux de faibles concentrations calciques. Ce résultat peut également impliquer qu'un épuisement des réserves intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  puisse survenir, tel que discuté plus bas.

Cette étude nous a d'autre part permis de constater clairement que les changements de composition de solution jouaient un rôle beaucoup plus importants que les changements de température par rapport à l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire observée lors de la ré-oxygénation des CES. En effet, même lorsque les CES étaient soumises à un passage de la

solution UW au tampon HEPES à la température de la pièce (20°C), l'augmentation de leur  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique était similaire à celle observée lors de leur passage au tampon HEPES à température physiologique de 37°C. Cependant, lorsque la température du tampon physiologique HEPES de perfusion passait de 20 à 37°C, une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  beaucoup plus faible était observée. Nos résultats appuient les manipulations cliniques voulant que l'organe, avant sa transplantation, soit rincé de sa solution UW. Rappelons que la composition de celle-ci ressemblant au milieu intracellulaire, est forte en potassium et faible en sodium. Le rinçage pourrait ainsi améliorer la santé du receveur et diminuer les effets néfastes du potassium en trop grande concentration lorsque la circulation sanguine est rétablie dans l'organe. Notons aussi que dans cette étude, le fluorochrome Fura-2AM était mis en contact avec les CES à la température de la pièce. Ceci reproduit la phase de réchauffement de la transplantation, lorsque la température du greffon augmente graduellement alors que la ré-anastomose est en cours.

Nos résultats démontrent donc que le réchauffement dans un tampon physiologique semble préférable au réchauffement dans la solution UW. Une fois de plus cette observation est pertinente puisque qu'il y a en ce moment un débat scientifique à savoir s'il est préférable de rincer le greffon avec de la solution UW à température de la pièce ou à l'aide d'un tampon de composition physiologique (50). Un groupe de l'université de la Caroline du Nord a plus particulièrement développé une solution de rinçage appelée la solution Carolina Rinse, qui semble améliorer les dysfonctions initiales des greffes (23;62;68).

Ces résultats sur l'augmentation des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  basal suite à une période d'IF-RC dans les CES sont en accord avec les récentes observations préliminaires effectuées par

l'équipe de Strasberg et al. (86;88). Ces chercheurs ont démontré que l'inhibition des changements de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique dans les CES à l'aide de BAPTA ou de dantrolène prévient une augmentation dans l'activité des calpaïnes et le réarrangement de l'actine après la période de préservation froide. En effet, comme nous l'avons déjà vu, les calpaïnes sont des protéases spécifiques aux cystéines cytoplasmiques nonlysosomiales dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  impliquées dans la protéolyse des éléments du cytosquelette, comme les filaments d'actine et les protéines membranaires (75). Upadya et al. ont récemment confirmé que l'activation des calpaïnes dans les CES préservées à froid résulte effectivement en la séparation des filaments d'actine et en la sécrétion de métalloprotéases de la matrice. Éventuellement, ces événements peuvent engendrer l'arrondissement/la rétractation et le détachement des CES de la matrice extracellulaire et possiblement leur apoptose, une situation pouvant être prévenue par l'utilisation d'inhibiteurs de calpaïnes (75;86;88).

Par ailleurs, les observations que nous avons faites sur l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire après reperfusion fournissent une explication au sujet des fréquents problèmes microcirculatoires rencontrés dans les dommages induits par la transplantation. En effet, une telle augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique peut induire, comme nous l'avons vu précédemment, l'expression ou la translocation de médiateurs inflammatoires et d'adhésion comme le PAF ou les sélectines à la surface des CES (20;56;94). Ces médiateurs participeraient probablement au processus inflammatoire menant à l'occlusion de la microcirculation sinusoïdale du foie greffé, à des zones de non-reperfusion sanguine et même à la non-fonction totale de l'organe (28;74;90;91). Ainsi, des conditions capables de minimiser cette augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire lors de la reperfusion de l'organe pourrait réduire considérablement ces réactions inflammatoires locales.

### **4.3 Effet de la composition et température des solutions de reperfusion sur la réponse des CES préservées à l'ATP**

Comme nous l'avons vu précédemment, les CES subissent une multitude d'effets négatifs lorsqu'ils sont soumis à une période d'IF-RC. En plus des effets sur la morphologie et l'homéostasie calcique, des effets sur les fonctions cellulaires sont également susceptibles de survenir lors de changements de composition et de température des solutions de reperfusion. C'est ce que nous avons vérifié par le biais de l'intensité et de la fréquence de réponse des CES à une stimulation par l'agoniste purinergique ATP.

Les résultats de cette étude démontrent clairement que les CES sont particulièrement sensibles aux faibles quantités de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. En effet, nous avons observé que l'intensité et la fréquence de réponse à l'ATP était grandement diminuée lors d'une reperfusion des CES avec un milieu HEPES dépourvu de  $\text{Ca}^{2+}$ . De plus, la préservation froide préalable au réchauffement semble amplifier ce phénomène à un point tel que la réponse à l'ATP est complètement abolie lors de la reperfusion avec des solutions faibles en  $\text{Ca}^{2+}$  (UW, HEPES sans  $\text{Ca}^{2+}$ ) dans des CES préservées 24 heures. Ce phénomène pourrait être relié à la vidange complète des réserves intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  tel que discuté plus haut et à la diminution de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu externe. En effet, chez les CES comme d'autres cellules, la réponse aux agonistes de récepteurs couplés aux protéines Gq repose sur une mobilisation initiale à partir des réserves intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  (69) et est suivie d'un influx calcique à travers des canaux ioniques sur la membrane plasmique.

D'autre part, les cellules soumises à un changement de composition de solution de reperfusion, lorsqu'elles se retrouvent dans des conditions externes de  $\text{Ca}^{2+}$  normal (HEPES 37°C), étaient affectées négativement selon le temps de préservation. Cependant, les cellules chargées dans l'HEPES à 20°C et ré-oxygénées dans l'HEPES à 37°C ont su maintenir la meilleure réponse à l'agent mobilisateur de  $\text{Ca}^{2+}$ . Nos résultats suggèrent donc une fois de plus que le rinçage du foie, afin d'éliminer le plus possible la solution froide UW, et le réchauffement dans un tampon physiologique pourrait être la meilleure façon de minimiser les trop fortes augmentations initiales de  $\text{Ca}^{2+}$  et préserver les voies de signalisations calciques appropriées dans les CES après reperfusion.

#### **4.4 Critique du modèle expérimental utilisé**

Le modèle que nous avons choisi afin de réaliser cette étude est un modèle *in vitro* de CES de foie de rat isolées par perfusion à la collagénase, utilisé avec succès par différents chercheurs, dont l'équipe de Filip Braet (11). Notre équipe a également utilisé ce modèle précédemment en isolant les CES par élutriation plutôt que gradient discontinu de Percoll (35). Il s'agit donc ici d'un modèle fiable, reproductible entre différents laboratoires et nous permettant de simuler des situations cliniques (78); dans le cas présent, les phénomènes d'IF-RC. De plus, cet outil nous permet de vérifier les dommages fait à un type cellulaire particulier, directement au niveau de leur milieu intracellulaire, dans des conditions facilement contrôlables. D'autre part, un faible nombre de préparations est requis pour obtenir un grand nombre de cellules, ce qui réduit considérablement les sacrifices animaux. La réalisation de plusieurs expériences est donc possible à partir de peu de ressources vivantes et financières. Cependant, il faut comprendre que les cellules isolées ne sont pas susceptibles de répondre de la même manière que si elles étaient entourées des

autres types cellulaires de l'organe entier. En effet, d'importantes interactions cellules-cellules sont perdues suite à leur isolation (78). On croit également que, mis à part le stress général des manipulations de l'isolation cellulaire, la digestion de tissus à la collagénase pourrait altérer les caractéristiques des cellules (79). De plus, notons qu'une période de récupération de 8 heures est nécessaire à une meilleure remise en fonction des CES fraîchement isolées. Ceci implique que leur utilisation ne peut se faire immédiatement après leur isolation, comme dans le cas des hépatocytes par exemple.

La manière de compléter le plus adéquatement ce projet sur les CES serait sans doute d'utiliser un modèle de perfusion de foie entier ou de transplantation orthotopique (78), et utiliser une technique nous permettant d'évaluer les taux d'apoptose et de nécrose, ainsi que les changements calciques des CES préservées/reperfusées entourées des autres types cellulaires. Ainsi, nous pourrions évaluer une autre dimension des dommages causés au foie par l'IF-RC.

#### **4.5 Investigations futures**

Différentes avenues pourraient encore être explorées afin d'approfondir nos connaissances par rapport à l'augmentation du niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les CES suite à une période d'IF-RC. Par exemple, il faudrait compléter l'étude sur la viabilité, apoptose et nécrose cellulaire non seulement en augmentant le nombre d'expériences, mais aussi en utilisant les autres protocoles de réchauffement, comme dans le cas des mesures de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. On pourrait ainsi avoir un portrait plus complet des conséquences qu'apportent les changements de composition de solution et/ou de température de réchauffement sur la viabilité, l'apoptose et la nécrose des CES. Il serait ensuite important de faire un lien avec

les niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosoliques détectés dans les mêmes conditions, ainsi qu'avec le maintien de leur réponse à des agonistes.

Par ailleurs, nous pourrions évaluer l'apoptose et la nécrose, ainsi que le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire en réponse à d'autres solutions ou modifications de solution de réchauffement susceptibles de prévenir les augmentations de  $\text{Ca}^{2+}$ , comme par exemple, la solution Carolina Rinse, déjà grandement étudiée.

Il serait également intéressant de vérifier les conséquences physiologiques des changements de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires observés suite à ces périodes d'IF-RC. Il faudrait donc voir s'il y a effectivement production de PAF par les CES ou encore l'apparition de P-sélectines à leur surface comme on le suppose.

Enfin, nous pourrions vérifier l'activité d'autres agents mobilisateurs de  $\text{Ca}^{2+}$  chez les CES, comme nous l'avons fait avec l'ATP. Il serait particulièrement pertinent d'étudier le VEGF, qui est normalement relâché par les hépatocytes dans le milieu extracellulaire suite à une période d'IF-RC (3).

## 5 CONCLUSION

La présente étude nous a permis d'évaluer les effets des changements de composition et/ou de température de solution de réchauffement sur l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire des CES suite à leur préservation hypothermique, et ce, à l'aide d'un modèle de CES de rats isolées. Nous avons aussi effectué une courte étude sur l'apoptose et la nécrose. Dans le cas des cellules maintenues en culture à 37°C, la viabilité diminuait grandement au bout de 24 heures. Il faudrait vérifier s'il ne s'agit pas surtout d'un effet du milieu de culture dépourvu de facteurs de croissance. De plus, nous avons observé dans tous les cas d'IF-RC que les taux d'apoptose étaient plus importants que ceux de nécrose, en accord avec ce qui a déjà été observé (32). Ces taux augmentaient tous selon le temps de préservation hypothermique préalable. Cependant, nous avons pu conclure à partir de ces résultats que les CES réchauffées dans un tampon physiologique présentent les meilleurs taux de viabilité, et les plus bas niveaux d'apoptose et nécrose.

En ce qui concerne les études du niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, nos résultats démontrent clairement que ce dernier est affecté par les changements de composition et de température de reperfusion, les changements de composition de solution ayant le plus grand effet. Les résultats obtenus nous laissent croire que cette augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique serait surtout engendrée par une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du milieu externe. Aussi, nous avons observé que le temps de préservation hypothermique préalable ne semble pas avoir d'effet direct sur les niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire des CES lors de leur reperfusion ou sur leur réponse aux changements de solution. Cependant, la durée d'ischémie froide semble affecter grandement la réponse des CES aux agonistes mobilisateurs de  $\text{Ca}^{2+}$  comme l'ATP.

Néanmoins, nous avons pu démontrer que ces réponses sont mieux préservées lors d'un réchauffement (20°C) des cellules dans un tampon physiologique, suivi de sa reperfusion avec le même tampon, mais à 37°C. Notre étude appuie donc grandement le concept voulant qu'il est plus favorable de rincer le greffon avec une solution physiologique à la température de la pièce, avant de le ré-implanter dans un organisme receveur et de rétablir la circulation sanguine oxygénée dans l'organe. Les risques de non-fonction et de dysfonction primaires s'en trouveraient sans doute ainsi diminués.

Cette étude ouvre ainsi la voie à l'évaluation d'autres solutions/modifications susceptibles de minimiser la perturbation de l'homéostasie calcique initiale des CES et de maintenir une réponse positive aux agonistes suite à des périodes d'IF-RC, et ce, afin d'améliorer au maximum la bonne remise en fonction des greffes de foie chez l'humain.

## 6 BIBLIOGRAPHIE

1. **Albelda, S.M., C.W. Smith, and P.A. Ward.** Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8: 504-512, 1994.
2. **Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson.** Differential Cells and the Maintenance of Tissues. In: *Molecular Biology of the Cell*, edited by Garland. New York: Garland Publishing, Inc., 1994, p. 1139-1193.
3. **Archambault, A.-J., M.G. Sirois, P.N. Bernatchez, C. Fiset, and P.S. Haddad.** Vascular endothelial growth factor production by isolated rat hepatocytes after cold ischemia-warm reoxygenation. *Liver Transpl.* 7: 988-997, 2001.
4. **Bates, D.O. and F.E. Curry.** Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via  $Ca^{2+}$  - dependent pathway. *Am.J.Physiol.* 273: H687-H694, 1997.
5. **Belzer, F.O.** Evaluation of preservation of the intra-abdominal organs. *Transplantation Proceedings* 25: 2527-2530, 1993.
6. **Belzer, F.O. and J.H. Southard.** Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45: 673-676, 1988.
7. **Belzer, F.O., J.H. Southard, A.M. D'Alessandro, S.J. Knechtle, H.W. Sollinger, and M. Kalayoglu.** Update on preservation of liver grafts. *Transplantation Proceedings* 25: 2010-2011, 1993.

8. **Bilzer, M., G. Paumgartner, and A.L. Gerbes.** Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology* 117: 200-210, 1999.
9. **Bismuth, H., D. Azoulay, and A. Dennison.** Recent developments in liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 25: 2191-2194, 1993.
10. **Bogle, R.G., S.B. Coade, S. Moncada, J.D. Pearson, and G.E. Mann.** Bradykinin and ATP stimulate L-arginin uptake and nitric oxide release in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 926-932, 1991.
11. **Braet, F., R. De Zanger, T. Sasaoki, M. Baekeland, P. Janssens, B. Smedsrod, and E. Wisse.** Methods in laboratory investigation - Assessment of a method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells. *Lab.Invest.* 70: 944-952, 1994.
12. **Bronk, S.F. and G.J. Gores.** pH-dependent nonlysosomal proteolysis contributes to lethal anoxic injury of rat hepatocytes. *Am.J.Physiol.* 264: G744-G751, 1993.
13. **Caldwell-Kenkel, J.C., R.T. Currin, S. Tanaka, and R.G. Thurman.** Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat liver. *Hepatology* 10: 292-299, 1989.
14. **Caldwell-Kenkel, J.C., R.T. Currin, Y. Tanaka, R.G. Thurman, and J.J. Lemasters.** Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: Effects of reperfusion. *Hepatology* 13: 83-95, 1991.

15. **Changani, K.K., B.J. Fuller, J.D. Bell, S.D. Taylor-Robinson, D.P. Moore, and B.R. Davidson.** Improved preservation solution for organ storage. *Transplantation* 68: 345-355, 1999.
16. **Chazouillères, O., Y. Calmus, M. Vaubourdolle, and F. Ballet.** Preservation-induced liver injury. Clinical aspects, mechanisms and therapeutic approaches. *J.Hepatology* 18: 123-134, 1993.
17. **Cheng, S., J.R. Ragsdale, A.W. Sasaki, R.G. Lee, C.W. Deveney, and C.W. Pinson.** Verapamil improves rat hepatic preservation with UW solution. *J.Surg.Res.* 50: 560-564, 1991.
18. **Cheung, J., J. Bonventre, C. Malis, and A. Leaf.** Calcium and ischemic injury. *New Eng J Med* 314: 1670-1676, 1986.
19. **Clavien, P.-A.** Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 28: 281-285, 1998.
20. **Clavien, P.-A., P.R.C. Harvey, and S.M. Strasberg.** Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. *Transplantation* 53: 957-978, 1992.
21. **Collins, G.M.** What solutions are best? Overview of flush solutions. *Transplant.Proc.* 29: 3543-3544, 1997.
22. **Collins, G.M. and W.N. Wicomb.** New organ preservation solutions. *Kidney International* 42: S-197-S-202, 1992.
23. **Currin, R.T., J.G. Toole, R.G. Thurman, and J.J. Lemasters.** Evidence that Carolina rinse solution protects sinusoidal endothelial cells against reperfusion

- injury after cold ischemic storage of rat liver. *Transplantation* 50: 1076-1078, 1990.
24. **Desbiens, G., A. Brault, M. Bilodeau, and P.-M. Huet.** Time course and nature of sinusoidal endothelial cell (SEC) and hepatocyte deaths following cold ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Hepatology* 32: 249A2000.(Abstract)
25. **Dobrina, A., B.R. Schwartz, T.M. Carlos, H.D. Ochs, J.M. Beatty, and J.M. Harlan.** CD11/CD18-independent neutrophil adherence to inducible endothelial-leucocyte adhesion molecules (E-LAM) in vitro. *Immunology* 67: 502-508, 1989.
26. **Eberl, T., W. Salvenmoser, G. Rieger, I. Gorny, V. Heiß, B. Kumpitsch, E. Gnaiger, and R. Margreiter.** Ultrastructural analysis of human endothelial cells after hypothermic storage in organ preservation solutions. *J Surg Res* 82: 253-260, 1999.
27. **Elimadi, A. and P.S. Haddad.** Cold preservation-warm reoxygenation increases hepatocyte steady-state  $Ca^{2+}$  and response to  $Ca^{2+}$ -mobilizing agonist. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 281: G809-G8152001.
28. **Engler, R.L., G.W. Schmid-Schonbein, and R.S. Pavelec.** Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am.J.Pathol.* 111: 98-111, 2002.
29. **Ernster, L.** Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit.CareMed.* 16: 947-953, 1988.

30. **Ferguson, D.M., G.J. Gores, S.F. Bronk, and R.A.F. Krom.** An increase in cytosolic protease activity during liver transplantation. Inhibition by glutathione and glycine. *Transplantation* 55: 627-633, 1993.
31. **Forestal, D.A., J. Haimovici, and P. Haddad.** Different effect of cold storage and rewarming on three pH regulating transporters in isolated rat hepatocytes. *Am.J.Physiol.* 272: G638-G645, 1997.
32. **Gao, W., R. Bentley, J.F. Madden, and P.A. Clavien.** Apoptosis of sinusoidal cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 27: 1652, 1998.
33. **Geng, J.G., M.P. Bevilacqua, K.L. Moore, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, J.M. Kim, G.A. Bliss, G.A. Zimmerman, and R.P. McEver.** Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 343(6260): 757-760, 1990.
34. **Gujral, J.S., T.J. Bucci, A. Farhood, and H. Jaeschke.** Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 33: 397-405, 2001.
35. **Haddad, P., J.-C. Cabrillac, D. Piche, L. Musallam, and P.-M. Huet.** Changes in intracellular calcium induced by acute hypothermia in parenchymal, endothelial, and Kupffer cells of the rat liver. *Cryobiology* 39: 69-79, 1999.
36. **Haddad, P., J. Noël, J. Vадnais, L. Mathé, and D. Vallerand.** Modulation of liver cell membrane NHE-1, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase, and GLUT-2 protein content after

- cold preservation and rewarming. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 77: 852-859, 1999.
37. **Hatano, E., T. Kiuchi, A. Tanaka, H. Shinohara, T. Kitai, S. Satoh, T. Inomoto, H. Egawa, S. Uemoto, Y. Inomata, H. Lang, K.J. Oldhafer, B. Ringe, R. Pichlmayr, K. Tanaka, and Y. Yamaoka.** Hepatic preservation with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution in living-related and cadaveric liver transplantation. *Clin.Sci.* 93: 81-88, 1997.
38. **Huang, A.J., J.E. Manning, T.M. Bandak, M.C. Ratau, K.R. Hanser, and S.C. Silverstein.** Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *J.Cell Biol.* 120: 1371-1380, 1993.
39. **Hur, G.M., Y.S. Ryu, H.Y. Yun, B.H. Jeon, Y.M. Kim, J.H. Seok, and J.H. Lee.** Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kB. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 261: 917-922, 1999.
40. **Izuishi, K., Y. Ichikawa, M.A. Hossain, T. Maeba, H. Maeta, and S. Tanaka.** Effects of cold preservation and reperfusion on microsomal cytochrome P-450-linked monooxygenase system of the rat liver. *J.Surg.Res.* 61: 361-366, 1996.
41. **Jaeschke, H.** Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J.Hepatology* 25: 774-780, 1996.

42. **Jaeschke, H., A.P. Bautista, Z. Spolarics, and J.J. Spitzer.** Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Rad.Res.Comms.* 15: 227-284, 1991.
43. **Jaeschke, H. and A. Farhood.** Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am.J.Physiol.* 260: G355-G362, 1991.
44. **Jamieson, N.V.** A new solution for liver preservation. *Br J Surg* 76: 107-108, 1989.
45. **Jamieson, N.V., S.L. Lindell, R. Sunberg, J.H. Southard, and F.O. Belzer.** An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. *Transplantation* 46: 512-516, 1988.
46. **Kim, J.S. and J.H. Southard.** Alterations in cellular calcium and mitochondrial functions in the rat liver during cold preservation. *Transplantation* 65: 369-375, 1998.
47. **Koepfel, T.A., J.C. Thies, P. Schemmer, M. Trauner, M.M. Gebhard, G. Otto, and S. Post.** Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J.Hepatology* 27: 163-169, 1997.
48. **Kohli, V., W. Gao, C.A. Camargo, and P.-A. Clavien.** Calpain is a mediator of preservation-reperfusion injury in rat liver transplantation. *Medical Sciences* 94: 9354-9359, 1997.

49. **Kohli, V., J.F. Madden, R.C. Bentley, and P.-A. Clavien.** Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 116: 168-178, 1999.
50. **Kukan, M. and P.S. Haddad.** *Role of hepatocytes and bile duct cells in preservation-reperfusion injury of liver grafts.* 2001, (UnPub)
51. **Larsen, E., A. Celi, G.E. Gilbert, B.C. Furie, J.K. Erban, R. Bonfanti, D.D. Wagner, and B. Furie.** PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 59: 305-312, 1989.
52. **Larsen, E., T. Palabrica, S. Sajer, G.E. Gilbert, D.D. Wagner, B.C. Furie, and B. Furie.** PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell* 63: 467-474, 1990.
53. **Lewis, M.S., R.E. Whatley, P. Cain, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, and G.A. Zimmerman.** Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J.Clin.Invest.* 82: 2045-2055, 1988.
54. **Marieb, E.N. and G. Laurendeau.** Le système digestif. In: *Anatomie et physiologie humaines*, edited by ERPI. Saint-Laurent: 1993, p. 768-821.
55. **Marsh, D.C., S.L. Lindell, L.E. Fox, F.O. Belzer, and J.H. Southard.** Hypothermic preservation of hepatocytes. I. Role of cell swelling. *Cryobiology* 26: 524-534, 1989.

56. **McEver, R.P., J.H. Beckstead, K.L. Moore, L. Marshall-Carlson, and D.F. Bainton.** GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J.Clin.Invest.* 84: 92-99, 1989.
57. **McKeown, C.M.B., V. Edwards, M.J. Phillips, R.C. Harvey, C.N. Petrunka, and S.M. Strasberg.** Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 46: 178-191, 1988.
58. **Moen, J., K. Claesson, B.H. Pienaar, S.L. Lindell, R.J. Ploeg, J.F. McAnulty, P.K. Vreugdenhil, J.H. Southard, and F.O. Belzer.** Preservation of dog liver, kidney and pancreas using the Belzer-UW solution with a high sodium and low-potassium content. *Transplantation* 17: 940-945, 1989.
59. **Muhlbacher, F., F. Langer, and C. Mittermayer.** Preservation solutions for transplantation. *Tranplant Proc* 31: 2069-2070, 1999.
60. **Natori, S., M. Selzner, K.L. Valentino, L.C. Fritz, A. Srinivasan, P.-A. Clavien, and G.J. Gores.** Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 68: 89-96, 1999.
61. **Pertoft, H. and B. Smedsrod.** Separation and Characterization of Liver Cells. In: *Cell Separation Methods and Selected Applications*, Anonymous 1987, p. 1-24.
62. **Post, S., P. Palma, M. Rentsch, A.P. Gonzalez, and M.D. Menger.** Differential impact of Carolina rinse and University of Wisconsin solutions on

- microcirculation, leukocyte adhesion, Kupfer cell activity and biliary excretion after liver transplantation. *Hepatology* 18: 1490-1497, 1993.
63. **Rao, P.N., T. Liu, J.T. Snyder, J.L. Platt, and T.E. Starzl.** Reperfusion injury following cold ischemia activates rat liver Kupffer cells. *Transplant Proc* 23: 666-669, 1991.
64. **Rodriguez, J.V., E.E. Guibert, A. Quintana, A. Scandizzi, and L. Almada.** Role of nitroprusside in the improvement of rat liver preservation in University of Wisconsin solution: a study in the isolated perfused liver model. *J.Surg.Res.* 87: 201-208, 1999.
65. **Rymasa, B., J.-F. Wang, and H. de Groot.** O<sub>2</sub><sup>-</sup> release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *Am.J.Physiol.* 261: G602-G607, 1991.
66. **Samarasinghe, D.A., M. Tapner, and G.C. Farrell.** Role of oxidative stress in hypoxia-reoxygenation injury to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 31: 160-165, 2000.
67. **Sammut, I.A., M.S. Thorniley, S. Simpkin, B.J. Fuller, T.E. Bates, and C.J. Green.** Impairment of hepatic mitochondrial respiratory function following storage and orthotopic transplantation of rat livers. *Cryobiology* 36: 49-60, 1998.
68. **Sanchez-Urdazpal, L., G.J. Gores, J.J. Lemasters, R.G. Thurman, J.L. Steers, H.E. Wahlstrom, E.I. Hay, M.K. Porayko, R.H. Wiesner, and R.A.F. Krom.** Carolina rinse solution decreases liver injury during clinical liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 25: 1574-1575, 1993.

69. **Schilling, W.P. and S.J. Elliott.** Ca<sup>2+</sup> signaling mechanisms of vascular endothelial cells and their role in oxidant-induced endothelial cell dysfunction. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 262: H1617-H1630, 1992.
70. **Serracino-Inglott, F., N.A. Habib, and R.T. Mathie.** Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Surg.* 181: 160-166, 2001.
71. **Serrar, H., A. El-Kadi, P. du Souich, and P. Haddad.** Cytochrome P-450 content and activity after cold storage of rat hepatocytes in UW and SLS solutions. *Liver Transp Surg* 5: 119-125, 1999.
72. **Serrar, H. and P. Haddad.** Effects of cold preservation and rewarming on rat liver cell volume regulation and concentrative amino acid uptake. *Gastroenterology* 112: 1344-1353, 1997.
73. **Sherwood, L.** The digestive System and Principles of Endocrinology; the Central Endocrin Glands. In: *Human Physiology*, edited by Wadsworth. New York: West Publishing Company, 1997, p. 547-653.
74. **Simpson, P.J., R.F.3. Todd, J.C. Fantone, J.K. Mickelson, J.D. Griffin, and B.R. Lucchesi.** Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J.Clin.Invest.* 81: 624-629, 1988.
75. **Sindram, D., V. Kohli, J.F. Madden, and P.-A. Clavien.** Calpain inhibition prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver. *Transplantation* 68: 136-140, 1999.

76. **Sindram, D., R.J. Porte, M.R. Hoffman, R.C. Bentley, and P.-A. Clavien.** Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 118: 183-191, 2000.
77. **Sirois, M.G. and E.R. Edelman.** VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am.J.Physiol.* 272: H2746-H2756, 1997.
78. **Southard, J.H. and F.O. Belzer.** The University of Wisconsin Organ Preservation Solution: Components, Comparisons, and Modifications. *Transplantation Reviews* 7: 176-190, 1993.
79. **Southard, J.H., T.M. van Gulik, M.S. Ametani, P.K. Vreugdenhil, S.L. Lindell, B.L. Pienaar, and F.O. Belzer.** Important components of the UW solution. *Transplantation* 49: 251-257, 1990.
80. **Steinlechner-Maran, R., T. Eberl, M. Kunc, H. Schrocksnadel, R. Margreiter, and E. Gnaiger.** Respiratory defect as an early event in preservation-reoxygenation injury of endothelial cells. *Transplantation* 63: 136-142, 1997.
81. **Strasberg, S.M., T.K. Howard, E.P. Molmenti, and M. Hertl.** Selecting the donor liver: Risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 20: 829-838, 1994.
82. **Sumimoto, R., K. Dohi, T. Urushihara, N.V. Jamieson, H. Ito, K. Sumimoto, and Y. Fukuda.** An examination of the effects of solutions containing histidine and lactobionate for heart, pancreas, and liver preservation in the rat. *Transplantation* 53: 1206-1210, 1992.

83. **Sumimoto, R., N.V. Jamieson, and N. Kamada.** Examination of the role of the impermeants lactobionate and raffinose in a modified UW solution. *Transplant Proc* 22: 499-502, 1990.
84. **Sumimoto, R., N.V. Jamieson, K. Wake, and N. Kamada.** 24-hour rat liver preservation using UW solution and some simplified variants. *Transplantation* 48: 1-5, 1989.
85. **Takei, Y., I. Marzi, F.C. Kauffman, R.T. Currin, J.J. Lemasters, and R.G. Thurman.** Increase in survival time of liver transplants by protease inhibitors and a calcium channel blocker, nisoldipine. *Transplantation* 50: 14-20, 1990.
86. **Upadhyia, G.A. and S.M. Strasberg.** BAPTA-AM and dantrolene, reduce actin disassembly preserved rat sinusoidal endothelial cells (SEC): a novel preservation strategy. *Hepatology AASLD*: 248A2000a.(Abstract)
87. **Upadhyia, G.A. and S.M. Strasberg.** Glutathione, lactobionate and histidine : cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in university of wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology* 31: 1115-1122, 2000b.
88. **Upadhyia, G.A., S.A. Topp, and S.M. Strasberg.** Stimulation of calpain activity: a mechanism by which increased intracellular calcium  $[Ca^{++}]_i$  in sinusoidal endothelial cells (SEC) stimulates actin disassembly and MMP secretion and consequent SEC surface activation. *Hepatology AASLD*: 234A2001.(Abstract)

89. **Voet, D. and J.G. Voet.** Molecular physiology. In: *Biochemistry*, edited by I. John Wiley & Sons. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995, p. 1197-1310.
90. **Vollmar, B., M.D. Menger, J. Glasz, R. Leiderer, and K. Messmer.** Impact of leukocyte-endothelial interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Physiol.* 267: G786-G793 1994.
91. **Vollmar, B., S. Richter, and M.D. Menger.** Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am.J.Physiol.* 270: G798-G803 1996.
92. **Vreugdenhil, P.K., D.C. Marsh, F.O. Belzer, and J.H. Southard.** Urea and protein synthesis in cold-preserved isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 16: 241-246, 1992.
93. **Walzog, B. and P. Gaehtgens.** Adhesion molecules: the path to a new understanding of acute inflammation. *News Physiol.Sci.* 15: 107-113, 2000.
94. **Whatley, R.E., P. Nelson, G.A. Zimmerman, D.L. Stevens, C.J. Parker, T.M. McIntyre, and S.M. Prescott.** The regulation of platelet-activating factor production in endothelial cells. *J Biol Chem* 264: 6325-6333, 1989.
95. **Yadav, S.S., D.N. Howell, D.A. Steeber, R.C. Harland, T.F. Tedder, and P.-A. Clavien.** P-selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration on the warm ischemic mouse liver. *Hepatology* 29: 1494-1502, 1999.

96. **Yamamoto, K., R. Korenaga, A. Kamiya, Z. Qi, M. Sokabe, and A.J. Ando.** P2X<sub>4</sub> receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 279: H285-H2922000.
97. **Yamane, A., L. Seetharam, S. Yamaguchi, N. Gotoh, T. Takahashi, G. Neufeld, and M. Shibuya.** A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene* 9: 2683-2690, 1994.
98. **Yu, W., D. Coddington, and H. Bitter-Suermann.** Rat liver preservation. I. The components of UW solution that are essential to its success. *Transplantation* 49: 1060-1066, 1990.
99. **Zweier, J.L., P. Kuppusamy, and G.A. Luty.** Measurement of endothelial cell free radical generation: Evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85: 4046-4050, 1988.

## Accord des coauteurs

**Stéphanie Auger,  
M.Sc. Pharmacologie**

Auteurs de l'article : Stéphanie Auger  
Diane Vallerand  
Pierre S. Haddad

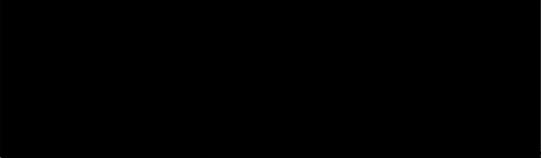
Titre de l'article : Cold ischemia/warm re-oxygenation perturbs cytosolic Ca<sup>2+</sup>  
homeostasis in rat liver sinusoidal endothelial cells

Journal scientifique : *Liver Transplantation*

L'article est en phase finale de préparation

### Déclaration des coauteurs de l'article

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Stéphanie Auger inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Impact des changements de solution et/ou température de reperfusion sur l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup> cytosolique dans les cellules sinusoidales préservées à froid.

  
Pierre S.Haddad

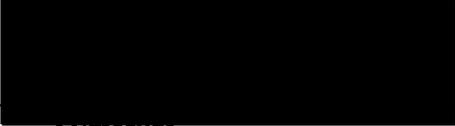
Signature

Date

30 avril 2002

DIANE VALLERAND

Diane Vallerand

  
Signature

Date

30 avril 02