



**UNIVERSITE DE LIEGE**  
**Faculté de Médecine**

**Département de Chirurgie**

**Service de Chirurgie Cardio-Vasculaire et Thoracique - Professeur Raymond Limet**

**Service de Chirurgie Abdominale - Professeur Nicolas Jacquet**

**Service de Chirurgie Endocrine et Transplantation - Professeur Michel Meurisse**

Centre de Recherche du Département de Chirurgie (CREDEC)

**MODIFICATIONS FONCTIONNELLES ET TISSULAIRES**  
**INDUITES PAR LA PRESERVATION ET LA REPERFUSION**  
**DES GREFFONS PULMONAIRES**

**Olivier Detry**  
Docteur en Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences Biomédicales

1999

**Remerciements à:**

Toute ma famille, et surtout Maman et Papa, Christine et Laurent, Jules, Arnaud, et tous ceux qui me permettent de réaliser mes rêves,

Mon Comité de Thèse:

Professeur Maurice Lamy, Président,

Professeur Alain Pavie

Professeur Dirk Van Raemdonck

Professeur Nicolas Jacquet,

Professeur Raymond Limet,

Professeur Michel Meurisse,

Professeur Francis E. Sluse,

Professeur Jean-Olivier Defraigne,

Professeur Adelin Albert,

Professeur Vincent D'Orio,

Professeur Albert Dresse,

Professeur Thierry Grisard,

Monsieur Joel Pincemail,

Tous ceux qui m'ont aidé à la réalisation des expérimentations, à la collection des résultats, à leur interprétation, et qui ont ainsi permis ce travail:

Mademoiselle Katty Willet

Docteur Bernard Lambermont

Professeur Annie Fossion

Monsieur Paul Gérard

L'équipe (Quelle équipe!) des Services de Chirurgie Abdominale, Endocrine et Transplantation:

Docteur Pierre Honoré, Docteur Etienne Hamoir, Docteur Luc Bruyninx, Docteur Bernard Detroz, Docteur Thierry Defechereux,

le Fonds National de la Recherche Scientifique (FRSM3.4545.94)  
la Fondation Léon Frédéricq.

Ce travail n'aurait pas été réalisable sans l'étroite collaboration des Services du Département de Chirurgie (Pr R Limet), du Service de Bioénergétique (Pr FE Sluse), du Centre de Recherches du Département de Chirurgie (CREDEC, Pr JO Defraigne), et du Centre de Biochimie de l'Oxygène (Pr M Lamy).

## Table des Matières

<b>Remerciements</b>	<b>2</b>
<b>Table des matières</b>	<b>3</b>
<b>Abréviations</b>	<b>5</b>
<b>Résumé</b>	<b>6</b>
<b>Chapitre 1: Problématique de la transplantation pulmonaire</b>	<b>8</b>
1. Le manque de greffons pulmonaires	8
2. La non-fonction primaire des greffons pulmonaires	11
3. Les lésions associées à la reperfusion des greffons pulmonaires	13
<b>Chapitre 2: Les méthodes de conservation des greffons pulmonaires</b>	<b>19</b>
1. Immersion hypothermique simple	19
2. Perfusion continue du bloc cœur-poumons	20
3. Refroidissement de la température corporelle du donneur par une circulation extra-corporelle	20
4. Rinçage hypothermique de l'artère pulmonaire	21
<i>la solution d'Euro-Collins</i>	
<i>la solution de Papworth</i>	
<i>la solution "University of Wisconsin"</i>	
<i>la solution Celsior</i>	
<b>Chapitre 3: Développement du modèle. Etude des paramètres physiologiques lors de la reperfusion.</b>	<b>26</b>
1. Modèle chirurgical	26
<i>Prélèvement pulmonaire</i>	
<i>Reperfusion ex vivo</i>	
<i>Etude des paramètres physiologiques</i>	
2. Statistiques	31
3. Résultats	32
4. Discussion	35
<b>Chapitre 4: Influence de l'ischémie hypothermique et de la reperfusion normothermique sur la fonction mitochondriale pulmonaire</b>	<b>38</b>
1. Introduction	38
2. Etude de la fonction mitochondriale et rendement de la phosphorylation oxydative	45
3. Matériel et méthodes	49
<i>Isolement des mitochondries</i>	
<i>Mesure du volume mitochondrial</i>	
<i>Mesure de consommation mitochondriale d'oxygène</i>	
<i>Produits</i>	

<i>Statistiques</i>	
4. Résultats	53
5. Discussion	55
<b>Chapitre 5. Comparaison des solutions Euro-Collins et UW sur la préservations des poumons et la phosphorylation oxydative des mitochondries pulmonaires</b>	<b>57</b>
1. Introduction	57
2. Matériel et méthodes	59
<i>Etude en microscopie électronique</i>	
<i>Statistiques</i>	
3. Résultats	62
<i>Paramètres physiologiques</i>	
<i>Paramètres respiratoires mitochondriaux</i>	
<i>Microscopie électronique</i>	
4. Discussion	71
<b>Chapitre 6. Etude des conséquences de l'ischémie normothermique sur la fonction mitochondriale des greffons pulmonaires</b>	<b>74</b>
1. Introduction	74
2. Matériel et Méthodes	77
<i>Groupes contrôle et ischémie froide 24 et 48 heures</i>	
<i>Groupes ischémie chaude</i>	
<i>Groupes associant une ischémie chaude et une ischémie froide</i>	
3. Résultats	79
4. Discussion	81
<b>Chapitre 7. Discussion générale et Perspectives</b>	<b>85</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>92</b>
<b>Annexes</b>	<b>99</b>

## Abréviations

ADP:	Adenosine diphosphate
ATP:	Adenosine triphosphate
C stat:	Compliance statique pulmonaire (ml/cm H <sub>2</sub> O)
DCNB:	Donneur (d'organes) à coeur non battant
$\Delta\psi$ :	Différence de potentiel transmembranaire
$\Delta\text{pH}$ :	Différence de pH transmembranaire
$\Delta\mu\text{H}^+$ :	Différence de potentiel électrochimique de protons
EC:	Solution d'Euro-Collins
FCCP:	Carbonylcyanide-p-trifluoro-methoxyphenylhydrazone
IF:	Ischémie froide
NFPGP:	Non-fonction primaire du greffon pulmonaire
OxPhos:	Phosphorylation oxydative
PAPM:	Pression Artérielle Pulmonaire Moyenne
P Peak:	Pic de Pression inspiratoire (cm H <sub>2</sub> O)
R:	Reperfusion
RC:	Contrôle respiratoire
RVP:	Résistance Vasculaire Pulmonaire (dyne.sec/cm <sup>5</sup> )
URC:	Contrôle respiratoire découplé
UW:	Solution "University of Wisconsin"
V <sub>FCCP</sub> :	Vitesse de consommation en oxygène en présence de FCCP
V <sub>Olig</sub> :	Vitesse de consommation en oxygène en présence d'oligomycine
V <sub>3</sub> :	Vitesse de consommation en oxygène en présence d'ADP
V <sub>4</sub> :	Vitesse de consommation en oxygène en absence d'ADP

## Résumé

Nous avons voulu améliorer les connaissances actuelles des mécanismes entraînant la non-fonction des greffons pulmonaires après conservation hypothermique et transplantation, par l'étude de la fonction respiratoire mitochondriale après ischémie froide et reperfusion. Nous avons également voulu étudier les différences de conservation après rinçage avec les deux solutions de préservation les plus employées en transplantation pulmonaire clinique, les solutions d'Euro-Collins et "University of Wisconsin". Nous avons enfin voulu étudier la fonction respiratoire mitochondriale après ischémie normothermique, afin d'évaluer la possibilité de prélever des greffons pulmonaires chez des donneurs d'organes à coeur non battant.

Nous avons donc développé un modèle porcin de prélèvement, d'ischémie froide et de reperfusion pulmonaire normothermique *in vitro*, modèle relativement simple et reproductible, et qui permet d'objectiver le développement d'une non-fonction du greffon pulmonaire. Dans ce modèle, nous avons pu montrer qu'après 24 heures d'ischémie froide, les mitochondries montrent une altération modérée des oxydoréductases mais sans atteinte de l'efficacité de la phosphorylation oxydative, atteinte qui a pu être démontrée après 48 heures d'ischémie froide. Après reperfusion, l'atteinte mitochondriale est plus profonde, avec diminution de l'efficacité de la phosphorylation oxydative. Dans ce modèle d'ischémie froide et de reperfusion normothermique, nous n'avons pas pu observer de différence significative entre les poumons rincés avec la solution d'Euro-Collins ou "University of Wisconsin", et ce tant au niveau de paramètres physiologiques pulmonaires qu'au niveau de la fonction respiratoire mitochondriale.

Nous avons développé un modèle d'ischémie normothermique dans lequel 30 minutes d'ischémie chaude n'altèrent pas la fonction respiratoire des mitochondries pulmonaires. Par contre 45 minutes semblent provoquer des lésions mitochondriales

sévères. Cette tolérance de 30 minutes d'ischémie chaude pourrait permettre l'utilisation des greffons pulmonaires prélevés chez des donneurs d'organes à coeur non battant, du point de vue bioénergétique du moins.

## Chapitre 1.

### Problématique de la transplantation pulmonaire

#### 1. Le manque de greffons pulmonaires

Les premières tentatives expérimentales de transplantation pulmonaire ont été décrites dans les années quarante (Hardin 1954; Hardy, 1990). Chez l'homme, la première transplantation pulmonaire fut réalisée le 11 juin 1963 par le Dr. James Hardy, de l'Université du Mississippi (USA) (Hardy 1963). Le poumon fut prélevé chez un donneur à coeur non battant, décédé d'infarctus myocardique et transplanté à un homme de 58 ans souffrant d'une néoplasie pulmonaire. La fonction de l'organe transplanté fut immédiate. L'immunosuppression consista en l'administration d'azathioprine et de prednisone, et en l'irradiation corporelle complète du receveur. Celui-ci décédait d'insuffisance rénale au dix-huitième jour postopératoire, et le poumon transplanté ne présentait pas de signe de rejet à l'autopsie.

Entre 1963 et 1983, environ 40 transplantations pulmonaires ont été réalisées sans survie de longue durée, la plus longue étant de 10 mois chez un patient finalement décédé de pneumonie et de rejet chronique (Grover 1997). D'évidence deux obstacles majeurs s'opposaient alors au développement de la transplantation pulmonaire à grande échelle:

- a) l'absence d'un traitement immunosuppresseur efficace, limitant la fréquence et l'intensité des rejets (aigus et/ou chroniques) après transplantation;
- b) l'absence d'une méthode de préservation adéquate permettant au poumon prélevé et transplanté de subir une période d'ischémie même réduite sans conséquence significative sur sa fonction postopératoire.

Cependant, dans les années 1980, deux éléments déterminants permirent le développement de la transplantation pulmonaire:

a) la découverte de la ciclosporine et son utilisation clinique qui permirent de limiter significativement le nombre et l'importance des rejets, autorisant ainsi des survies à plus long terme tant des greffons que des patients;

b) l'amélioration des techniques de préservation, avec la mise au point de la solution d'Euro-Collins (EC), permettant la conservation hypothermique des greffons pulmonaires pendant 4 à 6 heures.

Grâce à ces améliorations, la transplantation pulmonaire (unilatérale, bilatérale, ou coeur-poumons) est devenue la thérapeutique de choix de nombreuses maladies pulmonaires terminales (Tableau 1.1).

---

### Indications générales

- atteinte pulmonaire parenchymateuse ou vasculaire avec:
- une espérance de vie < 2 ans ou
  - classe fonctionnelle NYHA III - IV

### Indications spécifiques

#### Fibrose pulmonaire idiopathique

- capacité vitale < 65% de la valeur prédite
- pas de réponse au traitement par stéroïdes

#### Mucoviscidose

- VEMS < 30% de la valeur prédite
- Pa O<sub>2</sub> au repos < 7,3 kPa

#### Hypertension artérielle pulmonaire primitive

- maladie symptomatique
- pas de réponse au traitement médicamenteux

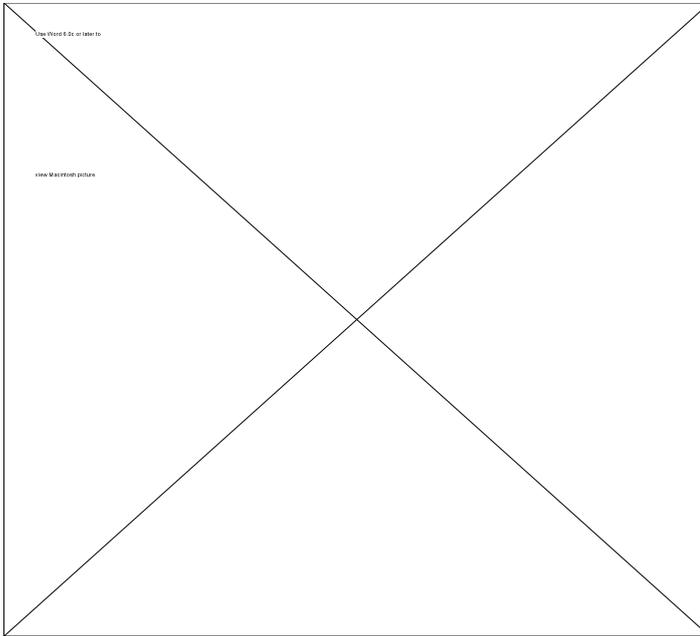
#### Emphysème

- VEMS après bronchodilatateurs < 25% de la valeur prédite
- 

### Tableau 1.1: Indications de transplantation pulmonaire

Cependant la transplantation pulmonaire est aujourd'hui victime de son succès, le nombre de transplantations est actuellement insuffisant pour couvrir les besoins

réels, principalement par manque crucial de greffons transplantables (Maurer 1998; Hosenpud 1998), et de plus en plus de candidats à une transplantation pulmonaire décèdent en attendant vainement un greffon (Figure 1.1). En 1993, 656 transplantations pulmonaires ont été effectuées de par le monde, alors que 1.288 malades étaient inscrits sur liste d'attente (Grover 1997). Dans les pays faisant partie de l'organisation Eurotransplant (Belgique, Luxembourg, Pays-bas, Allemagne, Autriche), 341 patients étaient inscrits sur la liste d'attente pour une transplantation pulmonaire en 1998; durant cette même année, seulement 228 transplantations étaient réalisées, et 81 candidats décédaient en attendant un greffon (23% des inscriptions) (Eurotransplant International Foundation, 1999).



**Figure 1.1: Transplantation pulmonaire aux Etats-Unis, de 1988 à 1997 (Arcasoy 1999)**

Cette carence en greffons pulmonaires peut être en partie expliquée par des critères de sélection des donneurs de poumon plus sévères que pour les autres organes. En effet, on estime que seulement 10 à 25% des donneurs d'organes peuvent être considérés donneurs de poumon (Novick 1996; Egan 1992; Arcasoy 1999). Une des manières d'augmenter le nombre potentiel de donneurs de greffon pulmonaire pourrait consister en l'amélioration des méthodes de conservation. En effet, les poumons sont des organes particulièrement sensibles à l'ischémie et à la reperfusion, sans que l'on ait complètement élucidé la raison. En cette fin des années 90, des ischémies pulmonaires de 6 à 8 heures constituent des durées maximales tolérables par la plupart des groupes de transplantation pulmonaire (Hopkinson 1998). Une augmentation de la durée d'ischémie maximale permettrait une meilleure utilisation des greffons, en particulier en rendant possibles des échanges sur des distances importantes entre le lieu de prélèvement des poumons et l'endroit de leur transplantation.

## **2. La non-fonction primaire des greffons pulmonaires**

A l'heure actuelle, en transplantation pulmonaire, les ischémies supérieures à 6 heures se compliquent fréquemment de dysfonction postopératoire précoce, qui peut même survenir après des ischémies plus courtes. De nombreux termes ont été utilisés pour décrire ce phénomène, comme la *réponse pulmonaire à la réimplantation*, *l'ischémie du greffon*, *l'œdème pulmonaire non cardiogénique*, *les lésions de reperfusion pulmonaire*, *la dysfonction du greffon* ou la *non-fonction primaire du greffon pulmonaire* (Schulman, 1998; Christie 1998). C'est cette dernière terminologie que nous utiliserons, car elle nous semble la mieux adaptée, la "non-fonction primaire du greffon pulmonaire" (NFPGP) n'impliquant pas de mécanisme causal, comme des phénomènes immunologiques ou des lésions liées à l'ischémie et la reperfusion. En réalité, cette NFPGP est plus que probablement d'origine multifactorielle.

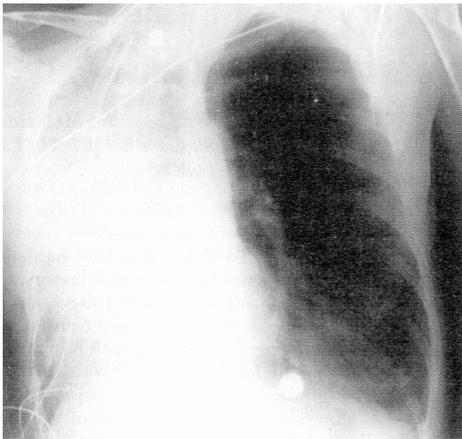
Les critères cliniques de diagnostic de la NFPGP sont variables selon les équipes. Christie et al. ont récemment proposé un ensemble de critères précis devant, à leur avis, être rencontrés pour pouvoir proposer le diagnostic de NFPGP (Christie 1998):

a) la présence dans les premières 72 heures de la transplantation pulmonaire d'un infiltrat alvéolaire diffus à la radiographie thoracique, développé sur le poumon transplanté, et épargnant le poumon natif en cas de transplantation unipulmonaire (Figure 1.2);

b) une hypoxémie caractérisée par un rapport  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200 \text{ cm H}_2\text{O}$ , hypoxémie persistant après les premières 48 heures postopératoires;

c) la nécessité d'une ventilation mécanique après le quatrième jour postopératoire, attribuable à la dysfonction du poumon transplanté;

d) aucune autre cause de dysfonction du greffon identifiable.



**Figure 1.2: Radiographie thoracique d'un patient présentant une NFPGP, 48 heures après transplantation unipulmonaire droite pour emphysème bilatéral.**

Dans la série de 100 transplantations pulmonaires rapportée par ces auteurs, 15% des receveurs rencontraient ces critères de NFPGP (Christie 1998). D'après d'autres études, près de 100% des poumons transplantés développent des altérations radiologiques compatibles avec un oedème de reperfusion réversible en 2 ou 3 semaines même si celui-ci n'est cliniquement significatif que dans un tiers des cas (Kundu 1998; Anderson 1995). Cette NFPGP s'accompagne également d'une augmentation des résistances vasculaires artérielles pulmonaires, d'une diminution de la compliance pulmonaire, d'une incidence élevée d'infections pulmonaires ou, *in fine*, d'un risque élevé de défaillance multiviscérale et de décès (Schulman, 1998). En effet, la NFPGP est une des causes principales de mortalité périopératoire après transplantation pulmonaire, responsable de près d'un tiers des décès postopératoires précoces (Hosenpud 1998).

### 3. Les lésions associées à la reperfusion des greffons pulmonaires

La meilleure connaissance des mécanismes responsables des lésions tissulaires apparaissant lors de l'ischémie et/ou de la reperfusion des greffons pulmonaires, ainsi que son corollaire, à savoir l'amélioration des techniques de préservation des greffons pulmonaires, sont donc essentielles pour:

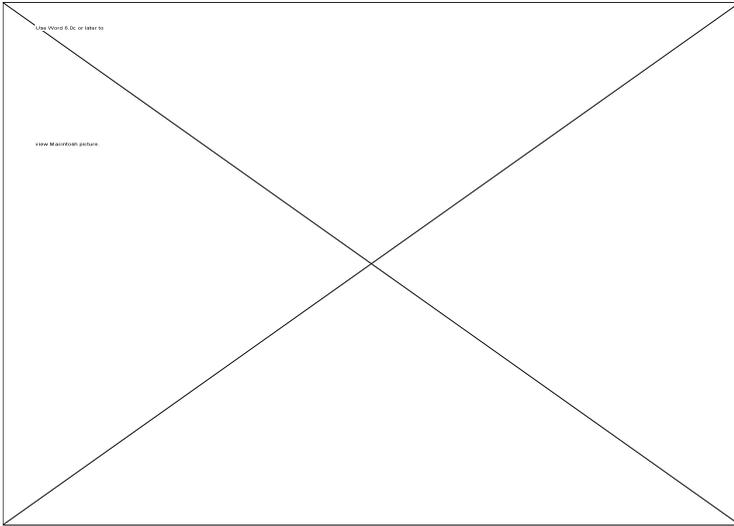
- a) augmenter le temps d'ischémie pulmonaire compatible avec une fonction postopératoire satisfaisante, et donc augmenter le nombre de transplantations pulmonaires par l'utilisation de poumons prélevés à de grandes distances de la transplantation;
- b) diminuer le taux de NFPGP, et par conséquent, diminuer la mortalité postopératoire immédiate après transplantation pulmonaire.

Bien qu'explorés par de nombreuses études expérimentales ou cliniques, les mécanismes responsables des altérations tissulaires et cellulaires survenant lors de l'ischémie et de la reperfusion des greffons pulmonaires sont loin d'être élucidés.

L'importance de l'intégrité endothéliale et alvéolaire dans la conservation des greffons pulmonaires a été récemment démontrée et revue de façon extensive (Novick 1996). Des lésions tissulaires pulmonaires peuvent survenir avant le prélèvement, par contusion pulmonaire, par inhalation, par infection, par lésions consécutives à la ventilation artificielle, ou encore par oedème neurogénique accompagnant la mort cérébrale. A eux seuls, ces mécanismes peuvent déjà induire des lésions cellulaires endothéliales et alvéolaires, entraîner une diminution du drainage lymphatique et un oedème pulmonaire. Par conséquent, un certain nombre de ces NFPGP pourraient être en partie liées aux lésions pulmonaires présentes avant le prélèvement d'organes mais non diagnostiquées lors de l'évaluation du donneur. De plus, il a été démontré que l'ischémie et la reperfusion pulmonaires provoquent des altérations tissulaires multiples et complexes dont l'étendue dépasse largement le contexte de ce travail mais a été largement décrite et revue (Novick 1996). Ainsi, le premier endroit de contact avec les solutions de préservation est l'endothélium vasculaire, qui est particulièrement sensible aux lésions de préservation. Ultérieurement, lors de la transplantation, la dysfonction endothéliale se révélera un événement particulièrement critique au cours des premières minutes après reperfusion, en raison de la production d'une large quantité d'anions superoxyde (McCord, 1985). Les lésions endothéliales sont encore aggravées par l'activation de molécules d'adhésion (E-selectines, P-sélectines, L-sélectines, ICAM-1...) qui vont permettre aux polynucléaires neutrophiles de se fixer sur l'endothélium ainsi activé. Ces leucocytes vont alors migrer hors du réseau vasculaire et induire d'autres altérations endothéliales par production de radicaux libres oxygénés de seconde génération, comme le peroxyde d'oxygène et le radical hydroxyl, ainsi que par production de cytokines et de protéases (Novick 1996).

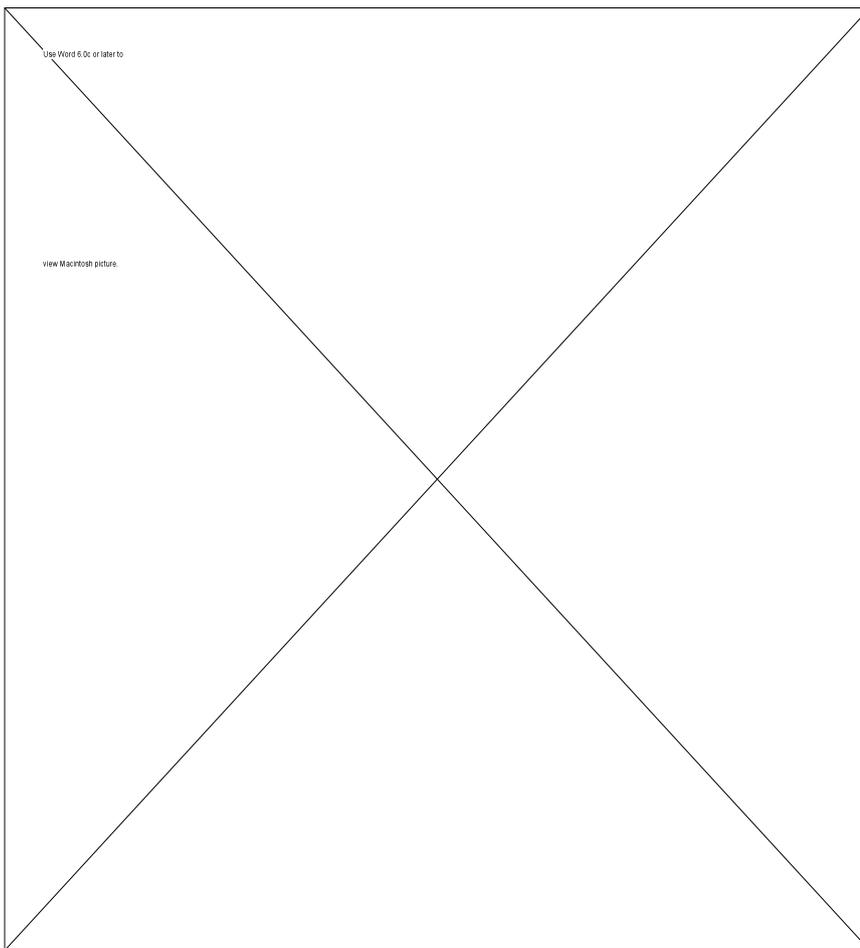
Si l'endothélium est la zone primordiale pour la préservation des autres organes, en transplantation pulmonaire, l'intégrité anatomique et fonctionnelle de l'alvéole, zone d'échange entre l'air alvéolaire et le sang des capillaires, est au moins aussi importante que la préservation endothéliale (Novick 1996). L'épithélium alvéolaire pulmonaire est

composé de 2 types cellulaires, les pneumatocytes de type I, cellules allongées qui couvrent la plus grande partie de la surface alvéolaire, et les pneumatocytes de type II, cellules cuboïdes responsables entre autres de la synthèse, de la mise en réserve et de la sécrétion du surfactant (Figure 1.3) (Kuhn, 1976).



**Figure 1.3: Etude d'une alvéole normale en microscopie optique.**

Les pneumatocytes I possèdent un noyau ovale, régulier, entouré d'un cytoplasme abondant ne contenant que quelques mitochondries, quelques lysosomes et un volume variable de réticulum endoplasmique. Les pneumatocytes II sont des cellules métaboliquement très actives, contenant de nombreuses mitochondries allongées, un volumineux réticulum, de nombreux ribosomes, un petit appareil de Golgi, et une multitude d'inclusions (Figure 1.4). Les organelles permettant d'identifier de façon certaine le pneumatocyte II sont des inclusions cytoplasmiques lamellaires contenant du surfactant (Kuhn, 1976).

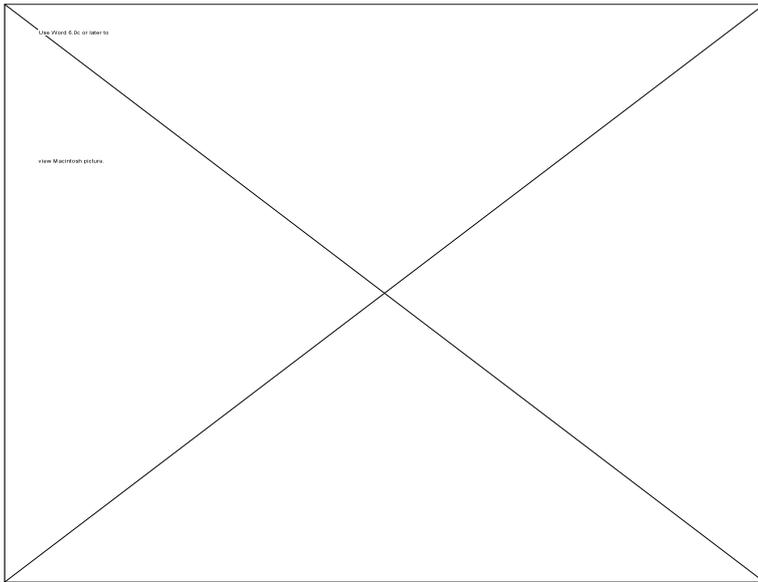


**Figure 1.4: Photographie d'un pneumocyte II étudié en microscopie électronique.**

En diminuant la tension de surface au niveau de l'interface air/sang, le surfactant induit une stabilité alvéolaire pour des volumes pulmonaires réduits, et protège le poumon d'un oedème en conditions physiologiques et pathologiques. Dans un poumon humain normal, 20% des cellules alvéolaires sont des pneumocytes de type II. Malgré ce nombre réduit, ces cellules sont cruciales pour le bon fonctionnement pulmonaire. La

conservation de l'ultrastructure des pneumatocytes de type II semble être un déterminant important de la fonction postopératoire précoce après transplantation pulmonaire chez l'homme (Fehrenbach 1998). De plus, il a été démontré que la qualité du surfactant diminue après conservation et reperfusion des poumons, et que, *in vitro*, l'efficacité du surfactant diminue de façon continue avec la prolongation de la durée d'ischémie (Erasmus 1994). L'administration de surfactant avant la reperfusion pulmonaire améliore d'ailleurs la fonction postopératoire des greffons chez le rat (Erasmus 1996). Il semble donc que l'étude des altérations alvéolaires et de la fonction des pneumatocytes de type II survenant lors de l'ischémie et de la reperfusion est une voie de recherche prometteuse dans l'amélioration des méthodes de conservation des greffons pulmonaires.

Les caractéristiques anatomopathologiques des greffons pulmonaires souffrant de NFPGP ont été étudiées: les analyses biopsiques ou autopsiques montrent un oedème tissulaire et des lésions alvéolaires diffuses (Cooper 1992; Zenati 1990; Christie 1998). Les septa alvéolaires voient leur couverture cellulaire dénudée, et sont recouverts par une membrane hyaline dense, composée de débris cellulaires, de fibrine, et de coagulat (Zenati 1990) (Figure 1.5).



**Figure 1.5: Etude en microscopie optique d'un greffon pulmonaire souffrant d'une non-fonction**

En conclusion, si des progrès importants ont été réalisés, les méthodes actuelles de préservation des greffons pulmonaires n'autorisent pas une durée d'ischémie de plus de 6 à 8 heures avant reperfusion. Même pour des ischémies plus courtes, des dysfonctions apparaissent fréquemment après transplantation, et participent pour une grande part à la morbidité et à la mortalité postopératoires précoces. Malgré des travaux expérimentaux multiples, de nombreuses interrogations subsistent dans la compréhension des différents phénomènes physiopathologiques responsables de ces dysfonctions. Il apparaît de plus en plus que le poumon est un organe complexe et fragile, dont l'intégrité de l'endothélium vasculaire mais également de la structure et de la fonction alvéolaires est primordiale pour la qualité de la fonction après transplantation.

## Chapitre 2.

### Les méthodes de conservation des greffons pulmonaires

Lors des premières transplantations pulmonaires, la conservation des greffons reposait sur quelques observations expérimentales (Hardin 1954) transposées en transplantation clinique (Hardy 1963). Ainsi, des études préliminaires démontrèrent que le poumon du chien ne pouvait pas être préservé plus de 2 heures à 4 °C si on désirait une fonction postopératoire satisfaisante. Lors de la première transplantation pulmonaire chez l'homme, le donneur reçut une dose importante d'héparine puis le poumon fut prélevé et rincé avec une solution froide glucosée et héparinée. Le poumon fut alors connecté à un respirateur et régulièrement ventilé à l'oxygène pur. Le poumon fut transplanté moins de 2 heures après le prélèvement, et la fonction postopératoire fut bonne d'emblée.

Cependant il devint évident dans les années suivantes qu'une méthode simple et plus efficace de préservation s'avérait nécessaire, et plusieurs groupes intéressés par la transplantation pulmonaire développèrent alors d'autres méthodes de préservation, basées sur des données expérimentales récoltées dans leur laboratoire.

#### 1. Immersion hypothermique simple

L'immersion hypothermique simple fut la méthode de conservation des greffons pulmonaires utilisée par le groupe de Toronto (Canada) dès le début de son expérience. Cette méthode a permis les premières survies à long terme après transplantation pulmonaire (The Toronto Lung Transplant Group., 1986; Cooper 1987). Cependant, la durée maximale de l'ischémie compatible avec une survie de l'organe restait limitée à 4 à 6 heures avec cette technique, ce qui est insuffisant pour une utilisation large des greffons. Le groupe de Toronto a été un ardent défenseur de cette technique, puis l'a actuellement abandonnée au profit du rinçage simple via l'artère pulmonaire. Il semble qu'aucune équipe au monde n'utilise encore en 1999 cette méthode d'immersion

hypothermique simple pour la préservation des greffons pulmonaires (Kirk 1993; Hopkinson 1998).

## **2. Perfusion continue du bloc coeur-poumons**

Basé sur des études expérimentales datant du début du 20<sup>ème</sup> siècle (Kirk 1993), un système de perfusion continue normothermique du coeur et des poumons fut mis au point par l'équipe de transplantation pulmonaire de Pittsburgh (USA) et utilisé dans son programme clinique (Hardesty 1987). Cependant, la durée d'ischémie maximale tolérable avec cette méthode restait limitée à 4 à 6 heures. De plus, ce système était complexe et ne permettait pas des ischémies plus longues qui s'accompagnaient d'une hypertension artérielle pulmonaire incontrôlable, d'un oedème, et d'une non-fonction de l'organe. Ce système ne semble pas avoir été utilisé par une autre équipe que celle de Pittsburgh, qui l'a ensuite abandonné en raison de sa complexité et de l'absence d'avantage par rapport à d'autres techniques plus simples (Kirk 1993; Hopkinson 1998).

## **3. Refroidissement de la température corporelle du donneur par une circulation extra-corporelle.**

Avec cette technique utilisée principalement par le groupe d'Harefield (Grande Bretagne) (Yacoub 1989), mais aussi par d'autres (Hardesty 1985), la température corporelle du donneur est progressivement réduite à l'aide d'une circulation extra-corporelle placée entre l'oreillette droite et l'aorte ascendante. L'importance du refroidissement varie selon les équipes mais la température corporelle du donneur est généralement portée à 10 °C. Les avantages de cette technique sont multiples: (a) l'absence de dissection chirurgicale en urgence; (b) une hypothermie contrôlable selon les besoins; (c) l'utilisation du sang comme liquide de refroidissement, ce qui présente plusieurs avantages: le sang est un colloïde, une solution tampon, contenant des substrats métaboliques et des piègeurs de radicaux libres oxygénés; (d) la protection de la micro-circulation pulmonaire, puisque le seul flux à travers les poumons est celui passant par le retour veineux coronaire; (e) la protection des autres organes transplantables par le refroidissement de la température corporelle. Les inconvénients

sont cependant également nombreux: (a) une complexité technique certaine; (b) un refroidissement pulmonaire moins efficace que celui obtenu par rinçage simple de la circulation artérielle pulmonaire avec une solution hypothermique; (c) le rôle néfaste de la circulation extra-corporelle sur la fonction pulmonaire, par ischémie pulmonaire partielle pendant le refroidissement, et par l'activation des facteurs du complément; (d) la mauvaise protection des greffons pancréatiques.

En tout état de cause, cette méthode de préservation pulmonaire ne semble pas être plus efficace que le flush simple via l'artère pulmonaire, et n'est plus utilisée à l'heure actuelle que par le groupe de Harefield (Hopkinson 1998).

#### **4. Rinçage hypothermique par l'artère pulmonaire**

La grande majorité des reins, des foies et des coeurs transplantés sont actuellement simplement rincés par une solution de conservation froide, la nature de cette solution de préservation variant selon les organes et les habitudes des équipes. Les avantages de cette méthode sont nombreux: (a) elle est simple, rapide et ne demande pas de matériel compliqué ou coûteux; (b) cette méthode permet un refroidissement accéléré des organes; (c) la composition du liquide de rinçage est aisément modifiable selon les besoins ou l'avancement des recherches; (d) les composants sanguins délétères sont éliminés (fibrine, complément, plaquettes, globules blancs).

Historiquement, une grande quantité de solutions et de perfusats ont été utilisés en transplantation pulmonaire expérimentale. Avant 1986, aucune n'avait cependant démontré une efficacité suffisante pour permettre son utilisation en routine lors d'un prélèvement de greffon pulmonaire à distance de l'hôpital où s'effectue la transplantation. En 1986, Starkey publia le succès de l'utilisation de greffons coeur-poumons dans un modèle primate, utilisant un rinçage hypothermique de l'artère pulmonaire avec une solution d'EC (60 mL/kg) (Starkey 1986). La composition de la solution EC est présentée dans le Tableau 2.1.

<b>Euro-Collins</b>	
Sodium	9,3 mM
Potassium	107 mM
Phosphate	55 mM
Chlore	14 mM
Bicarbonate	9,3 mM
Phosphate	55 mM
Sulfate	4,7 mM
Glucose	38,5 g/L
Osmolarité	355 mosmoles/L

**Tableau 2.1: Composition de la solution d'Euro-Collins**

La démonstration qu'un rinçage pulmonaire de 60 ml/kg par un perfusé administré pendant plusieurs minutes à une faible pression (50-60 cm H<sub>2</sub>O) pouvait permettre une conservation pulmonaire durant 4 à 6 heures, fut une avancée majeure. En 1987, Baldwin publia la première utilisation clinique de cette technique en transplantation coeur-poumons (Baldwin 1987). A cette époque, la solution d'EC devint la solution de choix dans la plupart des centres impliqués dans la transplantation pulmonaire. La solution EC est encore actuellement la solution utilisée dans 77% des centres de transplantation pulmonaire, dont la moitié environ l'utilise telle quelle tandis que l'autre moitié y ajoute du magnésium (Hopkinson 1998). Cependant, lorsque les vaisseaux pulmonaires sont exposés à une solution hypothermique et riche en potassium comme l'EC, ils sont le siège d'une vasoconstriction intense et d'une augmentation nette des résistances vasculaires pulmonaires. Il a été prouvé que l'administration de prostaglandine E1 (Amérique du Nord) ou I2 (Europe), toutes deux entraînant une vasodilatation pulmonaire intense et une bronchodilatation, a des effets bénéfiques réels, en améliorant la distribution du liquide de perfusion, en inhibant l'aggrégation plaquettaire, et même en limitant la production de radicaux libres oxygénés (Novick 1991).

A la même époque que celle des premières utilisations de la solution d'EC, le groupe de Papworth (Grande Bretagne) étudiait l'efficacité d'une solution extra-

cellulaire, contenant du sang du donneur et des prostacyclines (Tableau 2.2). Cette solution permet de conserver des poumons pendant 4 heures avec des résultats satisfaisants (Hakim 1988).

<b>Solution Papworth</b>	
1500 mL	
Sang complet du donneur	500 mL
Solution Ringer	700 mL
Albumine 20%	200 mL
Mannitol 20%	100 mL
Prostacyclines	20 µg
Héparine	10.000UI

**Tableau 2.2: Composition de la solution de Papworth (Hakim 1988)**

Cependant, une seule étude a comparé l'efficacité de la solution de Papworth et de l'EC, et ce chez le chien (Hooper 1990). Après 6 heures de conservation, les échanges pulmonaires n'étaient pas différents entre les 2 groupes, mais la compliance des poumons du groupe Papworth était moins bonne que celle des poumons rincés à l'EC. A l'heure actuelle, on peut estimer que 8% des centres de transplantation pulmonaire utilisent la solution de Papworth (Hopkinson 1998).

En transplantation d'organes abdominaux, la solution développée par Belzer à l'Université du Wisconsin (University of Wisconsin solution, UW) a permis de prolonger de façon significative la durée d'ischémie compatible avec une bonne fonction de l'organe transplanté (Belzer 1988). La composition de la solution UW est présentée dans le Tableau 2.3.

<b>UW</b>	
Hydroxyethyl starch	50 g/L
Acide Lactobionique	100 mM
Raffinose	30 mM
Adénosine	5 mM

Allopurinol	1 mM
Guthation	3 mM
Sodium	25 mM
Potassium	120 mM
Phosphate	25 mM
Sulfate	5 mM
Magnésium	5 mM
pH	7,4
Osmolarité	320 mosmoles/L
Insuline	40 U/L
Dexamethasone	16 mg/L
Penicilline G	200.000U/L

**Tableau 2.3: Composition de la solution UW (Southard 1990)**

Cette solution de conservation a également été testée dans la préservation du poumon tant chez l'animal que chez l'homme (Kirk 1993; Novick 1992; Hardesty 1993). Cependant il n'y a pas encore de démonstration à l'heure actuelle de la supériorité certaine de l'UW sur la solution d'EC en transplantation pulmonaire clinique. L'UW est cependant utilisée en clinique par environ 13% des centres (Hopkinson 1998; Rinaldi 1995; Hardesty 1993), qui évaluent l'ischémie pulmonaire acceptable à environ 8 heures en moyenne, ce qui est supérieur à celle acceptable par les centres qui utilisent la solution EC (6 heures) (Hopkinson 1998).

Une quatrième solution de préservation pulmonaire est actuellement en cours d'évaluation, la solution Celsior (Tableau 2.4). Des résultats expérimentaux semblent prometteurs (Fehrenbach 1999), et quelques études cliniques de Phase 1 sont en cours.

<b>Celsior</b>	
Sodium	100 mM
Potassium	15 mM
Magnésium	13 mM
Chlore	41,5 mM
Calcium	0,26 mM
Histidine	30 mM
Mannitol	60 mM
Glutamate	20 mM
Lactobionate	80 mM
Glutathion	3 mM
Osmolarité	360 mosmoles/L

**Tableau 2.4: Composition de la solution Celsior (Fehrenbach 1999)**

En conclusion, en 1999, la plupart des programmes cliniques de transplantation pulmonaire utilisent une méthode de préservation des greffons basée sur un rinçage simple de la circulation pulmonaire par une solution hypothermique (4 °C), et la solution d'EC est actuellement encore la solution de référence utilisée à cette fin. Ensuite les poumons sont placés dans la même solution à 4 °C. Les poumons sont de plus conservés en insufflation après clampage de la trachée. Cette méthode permet des ischémies hypothermiques de 6 à 8 heures avant transplantation.

## Chapitre 3.

### Développement du modèle.

#### Etude des paramètres physiologiques lors de la reperfusion.

Afin d'étudier le rôle éventuel de la dysfonction mitochondriale dans la pathogénie de NFPGP, nous avons développé un modèle animal d'ischémie et de reperfusion du poumon, dans lequel il devait être démontré que les poumons reperfusés souffraient d'une non-fonction, confirmée par des paramètres objectifs. Ce modèle devait également être le plus proche possible de la technique "standard" de prélèvement et de préservation pulmonaire utilisée en clinique humaine. Pour cette étude, notre choix s'est porté sur un modèle porcin. En effet l'isolement d'une quantité suffisante de mitochondries de poumon rendait nécessaire l'utilisation d'un animal de plus de 10 kg. De plus nous avons déjà acquis l'expérience des soins, de l'anesthésie et de la chirurgie du cochon de race Pure Piétrain dans le Centre de Recherches du Département de Chirurgie (CREDEC, Prof. J. O. Defraigne) de l'Université de Liège, ce qui nous a permis de développer un protocole et d'utiliser cet animal avec succès.

#### 1. Modèle chirurgical

##### *Prélèvement pulmonaire*

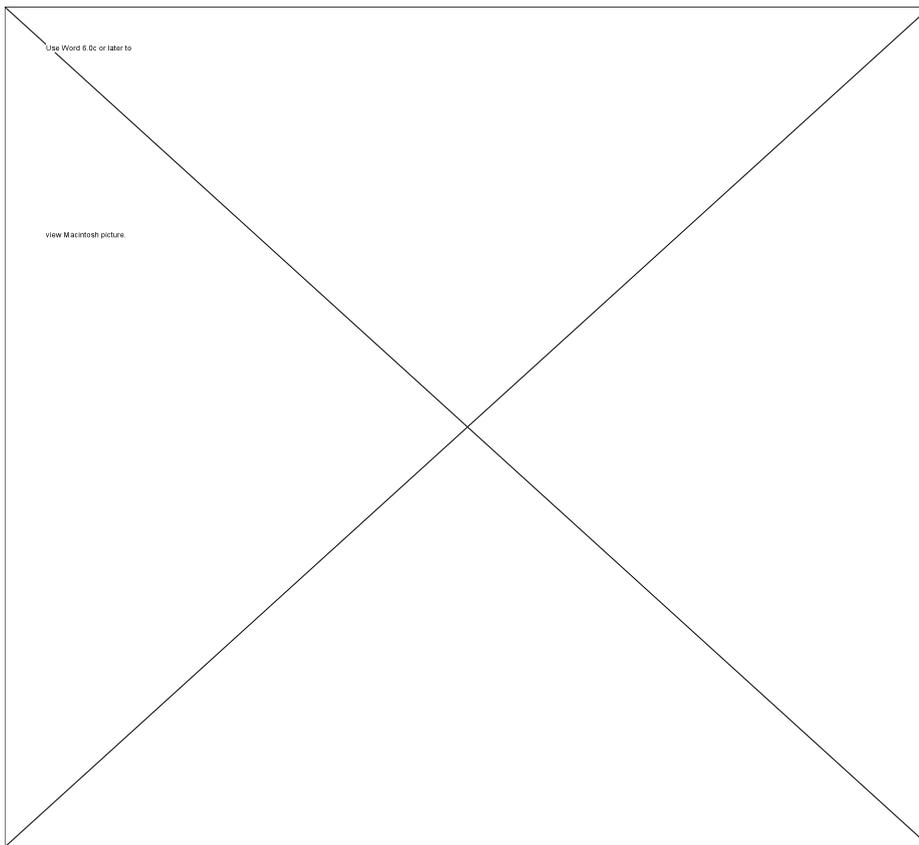
Des cochons Pure Piétrain de sexe indifférent (poids 20-30 kg) ont été utilisés pour cette étude. Après prémédication par une injection intramusculaire d'azaperonum (80 mg; Stressnil, Janssen-Cilag, Berchem, Belgique) et une injection intrapéritonéale de pentobarbital de sodium (20 mg/kg; Nembutal; Sanofi, Bruxelles, Belgique), l'anesthésie a été induite par un bolus de pentobarbital de sodium (5 mg/kg) et de

sufentanyl (0,5 µg/kg; Sufenta, Janssen-Cilag). Les animaux ont été intubés par un tube endotrachéal n°6 placé par une cervicotomie transverse. Ce tube endotrachéal a été connecté à un respirateur à volume contrôlé (PLV 100, Life Care, Lafayette, USA). Les poumons ont été ventilés à l'air ambiant (fréquence respiratoire: 20/min, volume courant: 15 ml/kg, pression de fin d'expiration: 0 cm H<sub>2</sub>O). Pendant toute l'intervention, des mesures de CO<sub>2</sub> en fin d'expiration ont été réalisées en continu (Capnomac, Datex, Helsinki, Finlande) afin de s'assurer de la qualité de la ventilation. Cet appareil a été électriquement relié à un ordinateur (386dx33, Interlan, Liège, Belgique), et les mesures aérodynamiques directes ont été analysées et enregistrées par un programme adapté d'acquisition de données (Codas, DATA Q Instruments Inc., Akron, USA). La relaxation musculaire des animaux a été assurée par des injections intraveineuses de bromide de pancuronium (0,1 mg/kg; Pavulon, Organon-Teknika, Boxtel, Pays-Bas). L'anesthésie a été maintenue par l'injection intraveineuse de bolus de pentobarbital de sodium (1 mg/kg) selon les besoins, et par une infusion continue de sufentanyl (0,5 µg/kg/h). Après sternotomie, le péricarde a été ouvert, et l'artère pulmonaire a été disséquée et entourée par une ligature. Les veines caves supérieure et inférieure ont été isolées. Les deux plèvres ont été ouvertes, et les veines azygos droite et gauche ont été liées et sectionnées. Après héparinisation systémique (300 U/kg), 500 µg de prostaglandine E1 (Prostin, Upjohn, Puurs, Belgique) ont été injectés par voie intraveineuse. Les deux veines caves ont alors été liées, et l'artère pulmonaire a été canulée par une canule à haut débit placée à travers le ventricule droit et son infundibulum. La ligature a été nouée autour de l'artère pulmonaire. Après ouverture de l'auricule gauche, les poumons ont été rincés par deux litres de solution d'EC (Fresenius AG, Wilrijk, Belgique) à 4 °C, instillés par gravité à 50 cm par rapport au plan du coeur. La ventilation pulmonaire a été maintenue pendant le rinçage, et le refroidissement pulmonaire a été facilité par l'écoulement du liquide froid provenant de l'auricule gauche dans les plèvres. A la fin de ce rinçage, la ventilation a été arrêtée, et le bloc coeur-poumons a été disséqué et prélevé. Après une dernière ventilation à l'air

ambiant, la trachée a été clampée en fin d'inspiration, et liée. Le bloc coeur-poumons a ensuite été conservé en inflation dans la solution de préservation (EC) à 4 °C.

#### *Reperfusion ex vivo.*

Pour des raisons anatomiques, le poumon reperfusé a toujours été le poumon droit. Après 24 heures d'ischémie froide le hile pulmonaire gauche a été disséqué. Les branches gauches de l'artère pulmonaire et de la veine pulmonaire, ainsi que la bronche souche gauche, ont été liées et sectionnées. Le poumon gauche a été alors isolé et séparé du bloc coeur-poumon droit. L'orifice de l'auricule gauche a été fermé par un surjet. Le ventricule gauche a été canulé à travers l'aorte et la valve aortique. Cette canule a été fixée par une ligature circulaire appuyée sur l'aorte. La trachée a été alors réouverte et intubée par un tube endotrachéal n°6 fixé par à la trachée par une ligature. Le bloc coeur-poumon droit a été alors placé dans une enceinte en Plexiglas, chauffée à 37 °C et humidifiée (Figure 3.1). Le tube endotrachéal a été connecté au même respirateur (PLV 100); le poumon droit a été ventilé à l'air ambiant (fréquence respiratoire: 20/min, volume courant: 8 ml/kg, pression de fin d'expiration: 0 cm H<sub>2</sub>O). Dès le début de la reventilation, le poumon droit a été reperfusé en circuit fermé via la canule placée dans l'artère pulmonaire, avec une solution tampon de type Krebs-Henseleit bicarbonate (pH 7,3, 118 mmole/L NaCl, 4,7 mmole/L KCl, 1,2 mmole/L MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mmole/L NaH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>, 25 mmole/L NaHCO<sub>3</sub>, 2,5 mmole/L CaCl<sub>2</sub>, 11,1 mmole/L Glucose) à 37 °C pendant 30 minutes. Cette solution a été injectée par une pompe à galets (Type 914421, Jostra AB, Lund, Suède), à un flux constant de 300 ml/min, dans le poumon droit via la canule pulmonaire, et drainée par gravité à travers la canule aortique.



**Figure 3.1: Représentation schématique de la reperfusion *ex vivo* des greffons pulmonaires**

TV: Volume courant  
 FR: Fréquence respiratoire  
 EEP: Pression en fin d'expiration  
 C stat: Compliance statique  
 P Peak: Pic de pression inspiratoire  
 PAP: Pression artérielle pulmonaire

Pendant la reperfusion, le Capnomac a été utilisé afin d'enregistrer les paramètres aérodynamiques de la ventilation. Un cathéter de mesure de pression à capteur interne (Sentron pressure-measuring catheter, Miami, FL, USA) a été connecté à la canule pulmonaire et utilisé pour mesurer la pression de reperfusion pulmonaire. Tous les résultats ont été électriquement transmis à l'ordinateur et enregistrés par le programme d'acquisition de données.

*Étude des paramètres physiologiques.*

Les paramètres physiologiques, incluant les débits inspiratoires et expiratoires, et la pression dans les voies aériennes, ont été mesurés par le Capnomac durant la chirurgie préalable au prélèvement du bloc coeur-poumons, durant le flush et durant la reperfusion *ex vivo*. Les mesures ont été transmises électriquement à l'ordinateur et enregistrées par le programme d'acquisition des données. Le pic de pression inspiratoire (P Peak, cm H<sub>2</sub>O) et la compliance statique pulmonaire (C stat, ml/cm H<sub>2</sub>O) ont été utilisés pour évaluer les lésions pulmonaires. C stat a été calculée en utilisant la formule suivante:

$$C \text{ stat} = T_v / (P - EEP)$$

dans laquelle: T<sub>v</sub> = volume courant; P = pression des voies respiratoires en fin d'inspiration; EEP = pression des voies respiratoires en fin d'expiration.

Un cathéter de mesure à capteur interne (Sentron) a été connecté à la canule pulmonaire afin de mesurer la pression artérielle pulmonaire lors de la reperfusion. Les signaux ont été transmis à l'ordinateur et ont été enregistrés par le programme d'acquisition des données. Durant la reperfusion, la résistance vasculaire pulmonaire (RVP: dyne.sec/cm<sup>5</sup>) a été calculée toutes les 5 minutes en utilisant la formule suivante:

$$RVP = PAPM / Q$$

dans laquelle: PAPM = pression artérielle pulmonaire moyenne; Q = débit de la reperfusion (300 ml/min).

## 2. Statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs types de la moyenne (SEM). Les modifications observées au niveau des différents paramètres ont été soumises à une analyse de variance pour mesures répétées (ANOVA). Lorsque le test s'est avéré significatif, le test de Bonferroni a été utilisé pour différencier les groupes dans lesquels les valeurs étaient significativement différentes. Tous les tests statistiques ont été considérés comme significatifs au niveau d'incertitude de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3. Résultats

Les variations de P Peak lors du rinçage par l'EC et lors de la reperfusion sont présentées dans la Figure 3.2. Le rinçage induit une augmentation significative ( $p < 0,01$ ,  $n=9$ ) de P Peak. De plus, après 24 heures d'ischémie froide, 30 minutes de reperfusion à 37 °C induisent également une augmentation progressive mais non significative de P Peak ( $p > 0,05$ ,  $n=5$ , P Peak 5 min versus P Peak 30 min), mais significativement augmentée à la fin de la reperfusion par rapport aux conditions basales (Figure 3.2).

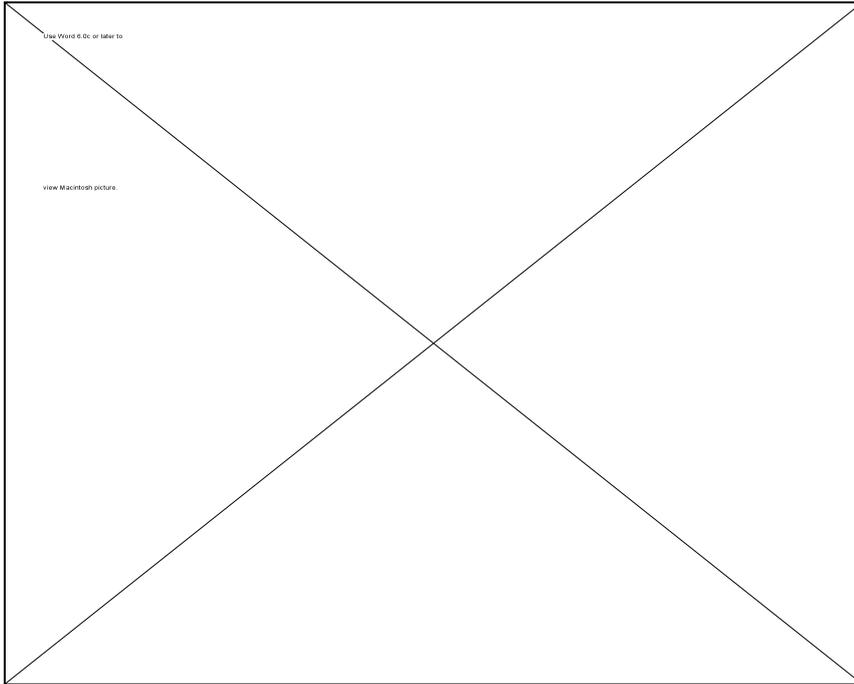
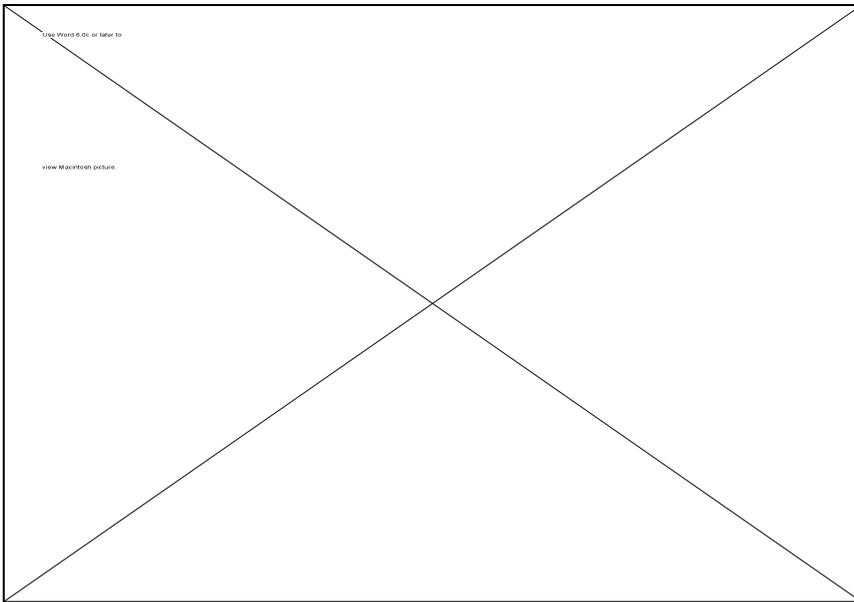


Figure 3.2: Pic de pression inspiratoire pendant le rinçage et la reperfusion pulmonaire.

**\***,  $p < 0,01$  vs basal

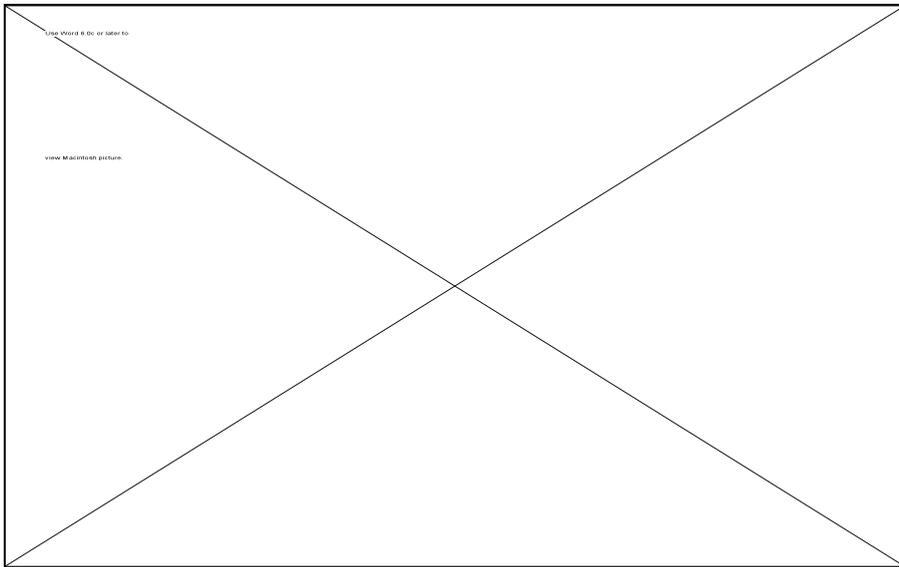
Les variations de C stat lors du rinçage par l'EC et lors de la reperfusion sont présentées dans la Figure 3.3. Le rinçage induit une diminution significative ( $p < 0,001$ ,  $n=9$ , C stat rinçage versus basal) de C stat. De plus, après 24 heures d'ischémie froide, 30 minutes de reperfusion à 37 °C induisent également une diminution progressive mais non significative de C stat ( $p > 0,05$ ,  $n=5$ , C stat 5 min versus C stat 30 min), toujours significativement réduite durant la reperfusion par rapport aux conditions basales (Figure 3.3).



**Figure 3.3: Compliance statique pendant le rinçage et la reperfusion pulmonaire.**

**\*,  $p < 0,01$  vs basal**

Les variations de RVP lors de la reperfusion sont présentées dans la Figure 3.4. Après 24 heures d'ischémie à 4 °C, ces RVP sont très élevées. Il n'y a pas de différence significative de RVP mesurée aux différents moments de la reperfusion.



**Figure 3.4: Variations de RVP durant la reperfusion.**

#### 4. Discussion

Ce modèle porcin de prélèvement, d'ischémie et de reperfusion pulmonaire reproduit étroitement les techniques utilisées en transplantation pulmonaire chez l'homme: nous avons en effet choisi un rinçage des poumons via une canule placée dans l'artère pulmonaire, en utilisant la solution d'EC à 4 °C après perfusion intraveineuse de prostaglandine E1. Cette méthode de préservation est simple, rapide, reproductible. Nous avons choisi d'imposer au poumon prélevé une ischémie froide de longue durée (24 heures), incompatible avec une fonction correcte de l'organe après reperfusion, afin d'être certain du développement d'une NFPGP.

Dans ce modèle, nous avons quantifié les lésions pulmonaires par des mesures hémodynamiques et aérodynamiques. Ces méthodes ont été validées par d'autres équipes (LoCicero 1990; Harjula 1987). Elles ont l'avantage de permettre une estimation des lésions pulmonaires en temps réel. Le fait de reperfuser *in vitro* plutôt qu'après transplantation chez un animal receveur, permet d'éliminer des variables telles que la compliance de la cage thoracique, la dynamique de la cavité pleurale, ou les douleurs postopératoires induites au receveur, variables qui peuvent modifier les paramètres physiologiques mesurés. Par contre, le fait de ventiler les poumons de façon active, par une pression positive produite par le respirateur, pourrait être responsable d'une variation importante de ce qui pourrait être rencontré cliniquement après l'extubation du patient receveur puisque la pression respiratoire positive induite dans les alvéoles pulmonaires pourrait limiter dans une certaine mesure l'oedème tissulaire de reperfusion. Cependant durant la période suivant immédiatement la reperfusion du greffon pulmonaire, le patient receveur reste dépendant du respirateur, celui-ci induisant une pression positive dans les voies aériennes du greffon, telle que dans notre modèle de reperfusion de 30 minutes.

Le modèle choisi présente également l'avantage de sa simplicité. Nous avons reperfusé les poumons avec une solution tampon de type Krebs-Henseleit bicarbonate. Cette solution est fréquemment utilisée en reperfusion expérimentale. Il est cependant certain qu'une reperfusion au sang aurait copié de façon plus fidèle les phénomènes accompagnant la reperfusion des poumons lors de la transplantation. Le sang présente l'avantage d'être une solution tampon, de contenir des piègeurs de radicaux libres oxygénés, ainsi que des macromolécules permettant de limiter le développement de l'œdème accompagnant la reperfusion. Par contre, l'utilisation de cette solution de Krebs-Henseleit bicarbonate permet d'éviter certains inconvénients de la reperfusion au sang: afin d'obtenir un volume sanguin suffisant en circuit ouvert, un ou plusieurs animaux "donneurs" auraient dû être sacrifiés; pour pouvoir travailler en circuit fermé à moindre volume circulant (comme dans notre modèle), le sang aurait dû être "désoxygéné". De plus l'utilisation de cette solution élimine tous les facteurs immunologiques accompagnant la reperfusion. Elle permet également de limiter la présence d'hémoglobine dans le parenchyme pulmonaire, hémoglobine interférant avec les mesures de fonction mitochondriale.

Lors du rinçage pulmonaire, nous avons observé une augmentation significative de la pression inspiratoire ainsi qu'une diminution de la compliance pulmonaire. Ces modifications sont provoquées par le rinçage hypothermique par l'EC. En effet, il est bien démontré que cette solution, riche en potassium, induit une contraction des fibres musculaires lisses présentes tant dans l'arborisation vasculaire que bronchique des poumons (Novick 1991). Cela induit une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires qui rend nécessaire la perfusion de prostaglandine, sous peine d'impossibilité de rinçage et de refroidissement corrects et homogènes de l'organe. Cela induit également les modifications des paramètres aérodynamiques que nous avons observées lors du rinçage pulmonaire.

Lors de la reperfusion nous avons observé une altération des paramètres physiologiques étudiés. En effet, les poumons reperfusés ont développé une augmentation progressive et significative des pressions inspiratoires, et une diminution de la compliance statique. Ces modifications, ajoutées à des résistances vasculaires très élevées, sont les reflets objectifs de la NFPGP (Christie 1998; Zenati 1990), marquée également par un oedème tissulaire observé après la reperfusion (mais non objectivé ou mesuré lors de cette étude).

En résumé, nous avons développé un modèle porcin de prélèvement, d'ischémie et de reperfusion pulmonaire, modèle relativement simple et reproductible, et qui permet d'objectiver le développement d'une NFPGP nécessaire à l'étude ultérieure des fonctions mitochondriales, et qui permettra la comparaison de différentes solutions de préservation.

## Chapitre 4.

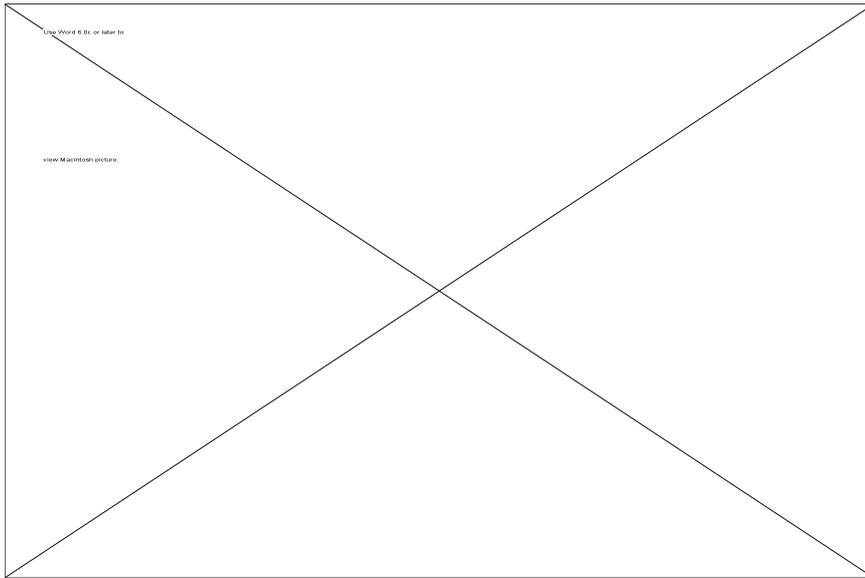
### Influence de l'ischémie hypothermique et de la reperfusion normothermique sur la fonction mitochondriale pulmonaire

#### 1. Introduction

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires qui jouent un rôle clé dans le métabolisme énergétique cellulaire puisqu'elles sont le site principal de la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) dans la plupart des tissus. Les mitochondries sont entourées d'une double membrane (Figure 4.1):

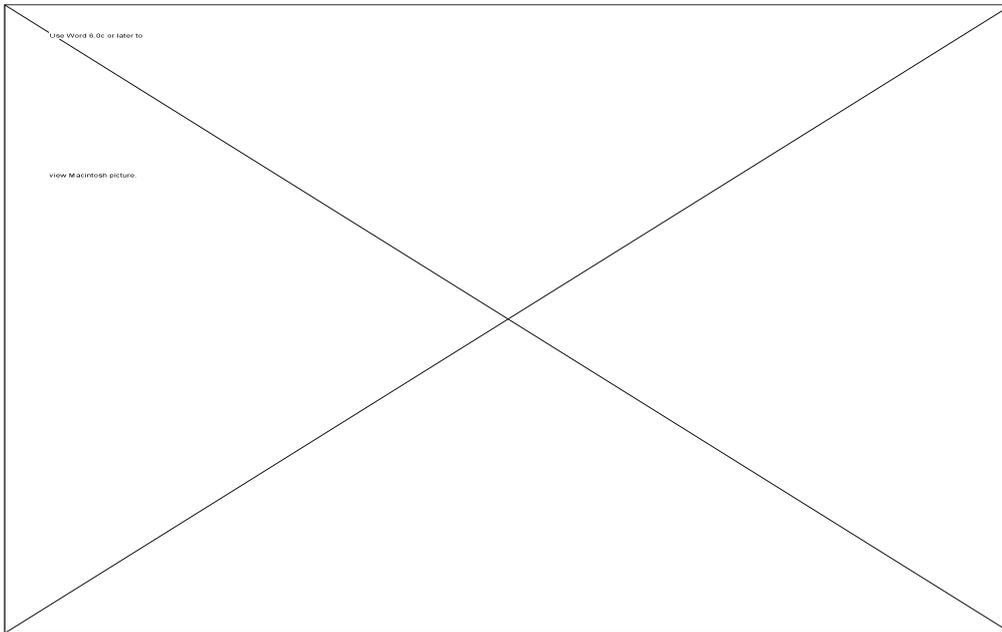
(a) une membrane externe perméable à la plupart des molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 8000, contenant des protéines et des récepteurs;

(b) une membrane interne comprenant de nombreuses invaginations, membrane interne qui est imperméable aux protons et à toutes les molécules chargées (seules quelques petites molécules neutres comme  $H_2O_2$ ,  $O_2$ ,  $NH_3$  et  $CO_2$  peuvent la traverser librement), et qui sépare la matrice mitochondriale du reste du contenu cellulaire.



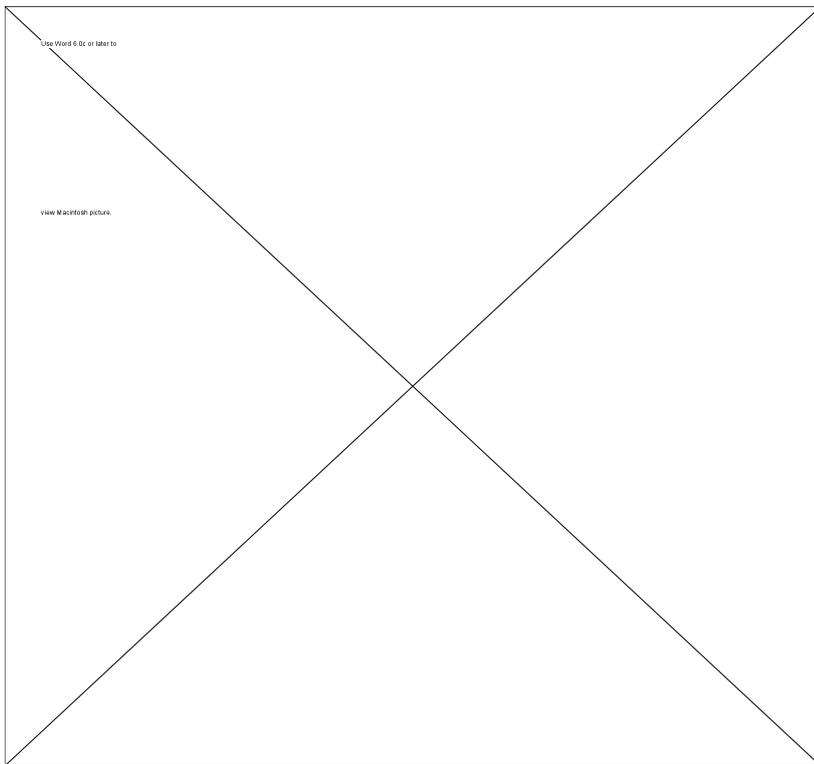
**Figure 4.1: Photographie d'une mitochondrie normale étudiée en microscopie électronique**

La matrice mitochondriale contient entre autres les enzymes nécessaires au cycle de Krebs et à l'oxydation des acides gras ( $\beta$  oxydation) ainsi que de l'ADN mitochondrial. Les produits résultant du catabolisme cytosolique peuvent entrer dans la matrice mitochondriale grâce à une douzaine de transporteurs spécifiques dont font partie le transporteur adénylique (ATP, ADP), phosphorique, aspartique (aspartate, glutamate), oxoglutarique ( $\alpha$ -cétoglutarate, malate, succinate), entre autres (Figure 4.2).



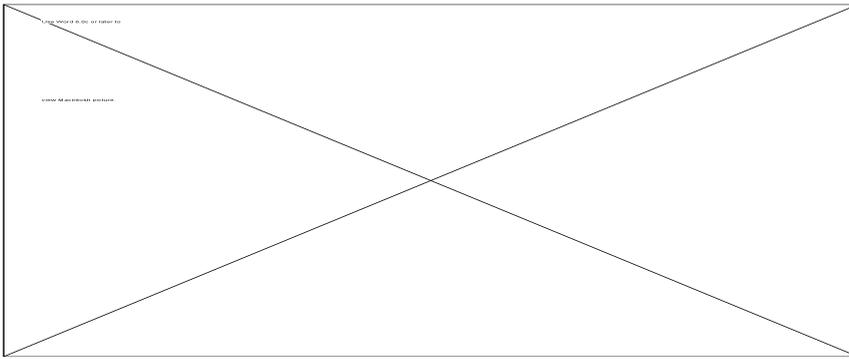
**Figure 4.2: Représentation schématique de la mitochondrie, expliquant les relations entre la chaîne respiratoire, et: (a) la production d'ATP; (b) la production d'espèces oxygénées; (c) l'initiation de l'apoptose (Wallace, 1999).**

Dans la mitochondrie se déroule la respiration cellulaire qui est couplée à la synthèse d'ATP par un processus appelé la phosphorylation oxydative (OxPhos). Le siège de OxPhos est la chaîne respiratoire, complexe multienzymatique contenu dans la membrane mitochondriale interne. La chaîne respiratoire est le siège de réactions d'oxydo-réduction dont le bilan est l'oxydation du NADH (nicotinamide adenine dinucleotide réduit) et du FADH<sub>2</sub> (flavine adénine dinucléotide réduit) par l'oxygène, et ces réactions sont couplées à la synthèse d'ATP via un circuit de protons. La chaîne respiratoire comprend plusieurs complexes enzymatiques, numérotés de I à IV (Figure 4.3), et qui assurent chacun une réaction d'oxydo-réduction entre deux espèces moléculaires.



**Figure 4.3: Les enzymes de la membrane mitochondriale interne impliqués dans la phosphorylation oxydative (Saraste, 1999).**

Le complexe I (NADH ubiquinone oxydo-réductase) accomplit l'oxydation du NADH; le complexe II (succinate ubiquinone oxydo-réductase) oxyde le succinate matriciel. Ces complexes I et II constituent les voies principales d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire, et ils transfèrent les électrons à l'ubiquinone ( $UQ \rightarrow UQH_2$ ). Le complexe III (ubiquinol cytochrome c oxydo-réductase) oxyde l'ubiquinol et transfère les électrons au cytochrome c, entraînant sa réduction. Enfin le complexe IV (cytochrome oxydase) oxyde le cytochrome c réduit et réduit une molécule d' $O_2$ . Le flux d'électrons qui traverse la chaîne respiratoire est donc généré à partir du NADH et du  $FADH_2$  pour permettre la réduction de  $O_2$  en  $H_2O$ . Au niveau des complexes I, III, IV, on assiste à l'expulsion de protons vers l'extérieur de la mitochondrie, expulsion concomitante au transfert d'électrons. Selon Hinkle (Hinkle 1971), quatre protons seraient éjectés par les complexes I et III, et deux par le complexe IV par atome d'oxygène consommé (Figure 4.4). Le complexe II n'éjecte pas d'électrons et ne participe donc pas à l'élaboration du potentiel protonique transmembranaire.



**Figure 4.4: Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale dans la membrane interne et des fonctions des différents complexes (I à IV). L'action des différents inhibiteurs (roténone, antimycine, cyanure) est représentée par des flèches brisées.**

**UQH<sub>2</sub>: Ubiquinone réduite; UQ: Ubiquinone oxydée;  
Cyt c réd: Cytochrome c réduit; Cyt c ox: Cytochrome c oxydé.**

Ce potentiel protonique transmembranaire génère une différence de potentiel transmembranaire ( $\Delta\psi$ ), négatif à l'intérieur et positif à l'extérieur de la membrane mitochondriale interne. Le transport de protons crée aussi une différence de pH

transmembranaire ( $\Delta pH$ ). Ces deux facteurs,  $\Delta\psi$  et  $\Delta pH$ , s'additionnent en une différence de potentiel électrochimique de protons ( $\Delta\mu H^+$ ). Cette différence de potentiel électrochimique pousse les protons externes à rentrer dans la matrice mitochondriale via la F1F0 ATP synthétase, complexe multienzymatique transmembranaire au niveau duquel se fait la synthèse d'ATP à partir de phosphate inorganique (Pi) et d'ADP. Quatre  $H^+$  sont utilisés pour synthétiser une molécule d'ATP via la F1F0 ATP synthétase.

Ainsi l'oxydation de NADH et  $FADH_2$  est couplée à la phosphorylation de l'ADP en ATP par un circuit de protons via la membrane interne mitochondriale. L'énergie cellulaire est stockée sous forme d'ATP qui sera exporté vers le cytoplasme via le transporteur adénylique. OxPhos nécessite donc une membrane mitochondriale interne imperméable, qui est alors dite couplante et permet au circuit de protons de fonctionner. Si cette membrane devient perméable (acide faible, FCCP, lésions diverses), OxPhos ne peut plus fonctionner et le contenu cellulaire en ATP diminue.

Les conséquences mitochondriales de l'ischémie peuvent être diverses. Entre autres, durant l'ischémie, le déficit en oxygène entraîne une diminution du contenu mitochondrial et cytosolique en ATP. Si l'ischémie se prolonge, le niveau d'ATP et donc le niveau énergétique cellulaire devient insuffisant pour assurer les besoins cellulaires fondamentaux; l'homéostasie cellulaire est alors compromise. Le contenu cytosolique en sodium, calcium et phosphate inorganique augmente, et peut entraîner des dysfonctions mitochondriales telles qu'un découplage de la respiration, un oedème ou une augmentation de la perméabilité des membranes mitochondriales (Mitnacht 1981; Kim 1992; Willet 1995). De plus, les mitochondries peuvent être également impliquées dans la genèse de lésions apparaissant lors de la reperfusion. Lors de cette reperfusion, les mitochondries peuvent produire des radicaux oxygénés au niveau de la chaîne respiratoire (Malis 1986; Wallace, 1999). Cette production accrue de radicaux oxygénés activés peut dépasser les mécanismes de défense cellulaire contre la production

radicalaire. Lorsque les lésions induites à OxPhos lors de l'ischémie et de la reperfusion sont modérées, elles peuvent être réversibles et la cellule survit. Par contre, si ces lésions sont sévères, elles peuvent être irréversibles. L'apparition d'une perméabilité membranaire mitochondriale provoque un découplage de OxPhos. La mitochondrie est alors incapable de synthétiser l'ATP, et dans ce cas le métabolisme cellulaire est irrémédiablement perturbé, entraînant une mort cellulaire certaine.

Dans le poumon, les mitochondries sont présentes dans chaque type de cellules parenchymateuses, à savoir dans les cellules de l'épithélium alvéolaire (pneumatocytes I et II), dans les cellules endothéliales, bronchiques, interstitielles, et dans les macrophages (Fisher, 1976). Dans le septum alvéolaire, la concentration en mitochondries est plus importante dans les pneumatocytes de type II que dans les cellules endothéliales ou les pneumatocytes de type I. Le volume de tissu alvéolaire pulmonaire (alvéoles et canalicules alvéolaires) correspond à environ 90% du volume pulmonaire, et environ 20% des cellules de ce tissu sont composées de pneumatocytes II. On peut estimer qu'environ 50% des mitochondries isolées à partir d'un poumon sont des mitochondries provenant de ces pneumatocytes II (Fisher, 1976).

Nous avons insisté dans le chapitre 1 sur l'importance de l'intégrité fonctionnelle de ces pneumatocytes de type II dans la fonction pulmonaire après transplantation. Il nous a donc paru intéressant d'étudier la fonction mitochondriale et le rendement de OxPhos dans notre modèle d'ischémie et de reperfusion pulmonaire, afin de déterminer l'atteinte de la fonction des mitochondries pulmonaires après ischémie et reperfusion, et ainsi évaluer la part de la dysfonction mitochondriale dans la NFPGP.

## **2. Etude de la fonction mitochondriale et rendement de la phosphorylation oxydative**

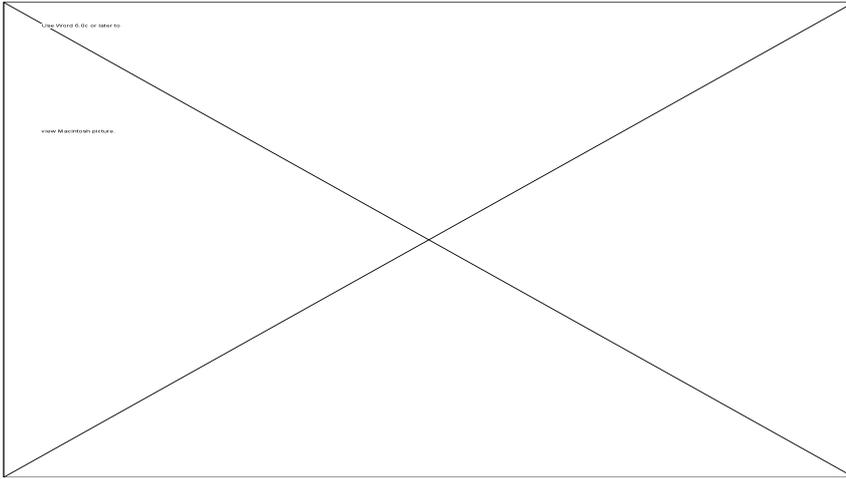
La fonction de OxPhos est étudiée par la détermination de la consommation d'oxygène d'une suspension de mitochondries purifiées. Cette consommation d'oxygène est déterminée par polarographie (électrode de Clark) en présence d'un

substrat oxydable, comme du pyruvate ou de l' $\alpha$ -cétoglutarate. La vitesse de respiration rend compte du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire, lui-même régit par quatre facteurs:

- a) -fourniture en équivalents réducteurs (NADH, FADH<sub>2</sub>);
- b) -intégrité fonctionnelle des complexes de la chaîne respiratoire;
- c) - importance du potentiel protonique dépendant de l'intégrité de la membrane mitochondriale interne;
- d) -fourniture en oxygène.

Cinq états respiratoires correspondant à différentes conditions d'incubation peuvent être définis (Figure 4.5):

- a) -Etat 1: mitochondries sans substrat ni ADP;
- b) -Etat 2: mitochondries sans substrat avec ADP;
- c) - Etat 3: mitochondries avec substrat et avec ADP (limitant ou saturant);
- d) - Etat 4: mitochondries avec substrat sans ADP;
- e) - Etat 5: mitochondries sans oxygène.



**Figure 4.5: Mesure des différents paramètres respiratoires par l'étude de la consommation d'oxygène avec une électrode de Clark. Détermination du rendement de la phosphorylation oxydative (ADP/O). Détermination des indices à l'état découplé (URC) et non découplé (RC).**

En présence d'ADP, de substrat et d'oxygène (état 3), la respiration est rapide (Figure 4.5). Les protons rentrent dans la matrice mitochondriale via la F1F0 ATP synthétase en consommant le  $\Delta\mu H^+$ . En absence d'ADP (état 4), la F1F0 ATP synthétase ne fonctionne pas, la consommation en oxygène ralentit et le  $\Delta\mu H^+$  est élevé. Cependant l'état 4 s'accompagne d'une consommation d'oxygène résiduelle (Figure 4.5); trois raisons peuvent expliquer ce phénomène:

(a) une légère perméabilité de la membrane mitochondriale interne aux protons;

(b) la présence dans la population mitochondriale de quelques mitochondries altérées qui hydrolyseraient l'ATP produit par les mitochondries intactes, permettant ainsi la réutilisation de l'ADP;

(c) l'entrée de  $P_i$  dans la matrice mitochondriale qui implique un cotransport de protons, réduisant le  $\Delta\mu_{H^+}$ .

Lorsque tout l'ADP présent au départ dans la matrice mitochondriale est consommé, la consommation d'oxygène ralentit, et on retrouve l'état 4. L'addition ultérieure d'une faible quantité d'ADP (pulse d'ADP) augmente la vitesse de respiration mitochondriale (état 3).

L'index respiratoire ou le contrôle respiratoire (RC, respiratory control) est le rapport entre les vitesses de consommation d'oxygène en présence et en absence d'ADP, donc le rapport de la consommation d'oxygène de l'état 3 et de l'état 4. Plus cet index est élevé, meilleur est le couplage. Un RC faible peut avoir 2 origines:

(a) une vitesse de respiration à l'état 4 élevé (découplage partiel);

(b) une respiration à l'état 3 faible, témoignant d'une diminution du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire.

Un ajout d'ADP à des mitochondries à l'état 4 amène les mitochondries à l'état 3, puis lorsque l'ADP ajouté est consommé, on retrouve de nouveau l'état 4 (Figure 4.5). Le rendement de la phosphorylation oxydative peut être exprimé par le rapport ADP/O, correspondant au nombre de molécules d'ADP phosphorylées par atome d'oxygène utilisé. Un rapport ADP/O faible indique que pour une même quantité d'oxygène, moins d'ATP est synthétisé, ce qui signifie que l'efficacité du couplage entre la chaîne respiratoire et la F1F0 ATP synthétase est diminuée. En présence d' $\alpha$ -cétoglutarate ou de pyruvate comme substrat, le complexe I de la chaîne respiratoire, qui fournit 4 protons, fonctionne, et 10 protons sont éjectés par atome d'oxygène consommé (Hinkle 1971). Etant donné que la mitochondrie doit importer 4 protons pour phosphoryler une molécule d'ADP, le rapport ADP/O maximal accessible, en présence de substrat donnant ses électrons au complexe I, comme l' $\alpha$ -cétoglutarate, est de 2.5. Par contre,

lorsque le complexe I est inhibé (roténone), ou lorsque le substrat utilisé donne ses électrons au complexe II de la chaîne respiratoire, comme le succinate, le complexe I est court-circuité, et la chaîne respiratoire n'éjecte plus que 6 protons par atome d'oxygène consommé (Figure 4.4); l'ADP/O maximal possible dans ces conditions est donc de 1,5.

On peut également étudier OxPhos par l'addition d'inhibiteurs ou d'agents découplant la chaîne respiratoire (Figure 4.5). En ajoutant à la suspension mitochondriale de l'oligomycine, inhibiteur qui bloque spécifiquement la F1F0 ATP synthétase, l'entrée de protons dans la matrice mitochondriale est totalement inhibée. L'existence d'une consommation en oxygène en présence d'oligomycine peut alors s'expliquer par une perméabilité passive de la membrane mitochondriale interne aux protons, par l'accumulation de Pi dans la matrice ou par l'insensibilité de la F1F0 ATP synthétase à l'oligomycine. En ajoutant à la préparation mitochondriale du carbonylcyanide-p-trifluoro-methoxyphenylhydrazone (FCCP), agent découplant OxPhos, le  $\Delta\mu\text{H}^+$  s'annule et il n'existe plus de contrôle thermodynamique de la chaîne respiratoire. La vitesse de consommation en oxygène est alors maximale et ne dépend que des capacités cinétiques de la chaîne respiratoire elle-même. Une faible vitesse de consommation en oxygène en présence de FCCP ( $V_{\text{FCCP}}$ ) indique donc une diminution du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et vraisemblablement une altération structurelle d'un ou plusieurs complexes, ou une réduction de la fourniture en équivalents réducteurs.

De plus, la combinaison des paramètres fonctionnels de la respiration mitochondriale peut nous informer du niveau d'une éventuelle lésion: ainsi, une augmentation de la vitesse de consommation en oxygène en présence d'oligomycine ( $V_{\text{Olig}}$ ) peut être interprétée comme une lésion de la membrane mitochondriale interne devenue perméable aux protons; si la vitesse de consommation d'oxygène augmente en état 4 ( $V_4$ ) et n'augmente pas lors d'addition d'oligomycine, cela peut signifier que la membrane interne est intacte mais que la fonction intrinsèque de F1F0 ATP synthétase

est altérée (découplage intrinsèque de la F1F0 ATP synthétase, H<sup>+</sup> slip<sup>1</sup>). Lorsque la respiration phosphorylante (état 3, V<sub>3</sub>) et la respiration découplée (en présence de FCCP) diminuent, soit la chaîne respiratoire est altérée, soit les substrats oxydables ne sont plus disponibles en suffisance et limitent la chaîne respiratoire par diminution des électrons disponibles. Lorsque la respiration à l'état 3 diminue plus que V<sub>FCCP</sub>, cela peut signifier une diminution de la présence d'ADP disponible ou une altération de l'activité de la F1F0 ATP synthétase. Le passage de protons par perméabilité passive de la membrane ou par H<sup>+</sup> slip entraîne une diminution du rapport ADP/O, signifiant une diminution de l'efficacité de la phosphorylation oxydative.

### 3. Matériel et Méthodes

Pour cette étude nous avons utilisé le modèle porcin d'ischémie et de reperfusion pulmonaire que nous avons développé et décrit dans le chapitre 3. Dans tous les cas, nous avons isolé des mitochondries provenant de poumons rincés par deux litres d'EC selon la méthodologie chirurgicale décrite dans le chapitre 3. Durant la période d'ischémie froide, les poumons ont été placés dans de l'EC à 4 °C. Les poumons provenant d'un même bloc coeur-poumons ont été analysés dans des groupes d'étude différents. Pour des raisons anatomiques, le poumon reperfusé a toujours été le poumon droit. Les groupes expérimentaux étudiés ont consisté en:

- a) -Groupe contrôle: les mitochondries ont été isolées immédiatement après le flush du poumon à l'EC (N=7);
- b) -Groupe ischémie froide 24 heures (IF 24 hr): les mitochondries ont été isolées de poumons soumis à 24 heures de conservation dans le l'EC à 4 °C (N=4);
- c) -Groupe ischémie froide 48 heures (IF 48 hr): les mitochondries ont été isolées de poumons soumis à 48 heures de conservation dans le l'EC à 4 °C (N=5);

<sup>1</sup> H<sup>+</sup> slip: modification de la stoechiométrie (H<sup>+</sup>/O - H<sup>+</sup>/ATP - ADP/O) des pompes à H<sup>+</sup> ou de l'ATP synthétase

d) -Groupe ischémie froide 24 heures et reperfusion normothermique de 30 minutes (IF 24 hr + R 30 min): les mitochondries ont été isolées de poumons rincés à l'EC, conservés 24 heures dans le l'EC à 4 °C, puis reperfusés par une solution de Krebs-Henseleit à 37 °C pendant 30 minutes, selon la méthodologie décrite en détails dans le chapitre 3 (N=5).

#### *Isolement des mitochondries*

Le tissu pulmonaire a été débarrassé des gros vaisseaux et des grosses branches bronchiques. Il a ensuite été découpé en fin morceaux puis homogénéisé dans un potter contenant une solution SET (250 mmole/L saccharose, 2 mmole/L éthylène diamine tétracétique acide (EDTA), 5 mmole/L Trishydroxyméthyl aminoéthane, 0.5% fatty acid free bovine serum albumin (BSA)). Après homogénéisation et filtration, les mitochondries ont été isolées par 6 centrifugations fractionnées successives (Tableau 4.1). Après la dernière centrifugation, le culot mitochondrial est pesé et resuspendu dans un volume adéquat afin de standardiser les conditions expérimentales.

Centrifugation	Durée	Vitesse
1	5 minutes	2.000 g
2	5 minutes	18.000g
3	10 minutes	600g
4	10 minutes	18.000g
5	10 minutes	18.000g
6	10 minutes	18.000g

**Tableau 4.1: Protocole des centrifugations fractionnées successives utilisées pour l'isolation mitochondriale**

#### *Mesure du volume mitochondrial*

Cinquante microlitres de suspension mitochondriale ont été incubés pendant 90 secondes avec 450  $\mu\text{l}$  d'un milieu radioactif ((15 mmole/L KCl, 2 mmole/L EDTA, 5 mmole/L  $\text{MgCl}_2$ , 50 mmole/L Trishydroxyméthyl aminoéthane, 3.3  $\mu\text{Ci}$  eau tritiée ( $^3\text{H}_2\text{O}$ )). Ce mélange a été centrifugé dans une microcentrifugeuse (Modèle 3200, Eppendorf; Hamburg, Allemagne) pendant 3 min. Le surnageant a été décanté et acidifié à l' $\text{HClO}_4$  (concentration finale: 0,7 mole/L). Le culot mitochondrial a été acidifié avec l'  $\text{HClO}_4$  0,7 mole/L. Les radioactivités du culot mitochondrial et du surnageant ont été déterminées dans un milieu de scintillation liquide (Ready protein+; Beckman, Fullerton, USA). Le volume mitochondrial (volume du culot mitochondrial) a été calculé par la formule:

Volume du culot ( $\mu\text{l}$ ) = (radioactivité du culot / radioactivité du surnageant) x volume du surnageant ( $\mu\text{l}$ ).

#### *Mesure de consommation mitochondriale d'oxygène*

Les paramètres respiratoires ont été déterminés à 25°C sur mitochondries isolées, à l'aide d'un oxygraphe (Gilson Medical Electronics, Middleton, WI, Etats-Unis), par mesure *in vitro* de la consommation en oxygène dans un milieu à pH 7,4 (15 mmole/L KCl, 2 mmole/L EDTA, 5 mmole/L  $\text{MgCl}_2$ , 50 mmole/L Trishydroxyméthyl aminoéthane) en présence de 1% BSA, de 5 mmole/L de  $\alpha$ -cétoglutarate et 5 mmole/L de pyruvate comme substrats oxydables, et de 2,5 mmole/L de phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). La concentration ajoutée d'ADP, d'oligomycine et du découplant FCCP fut de 165  $\mu\text{mole/L}$ , 16  $\mu\text{g/ml}$  and 5  $\mu\text{mole/L}$ , respectivement. Les paramètres mitochondriaux fonctionnels étudiés furent:

(a) la consommation d'oxygène en présence d'ADP ( $V_3$ ) ou en son absence ( $V_4$ ). Ces deux paramètres furent utilisés pour calculer le RC, égal au rapport  $V_3/V_4$ ;

(b) la consommation d'oxygène lorsque l'ATP synthase est bloquée par de l'oligomycine ( $V_{\text{Olig}}$ ) ou en présence du découplant FCCP ( $V_{\text{FCCP}}$ );

(c) le contrôle respiratoire découplé (URC) calculé par le rapport  $V_{\text{FCCP}}/V_{\text{Olig}}$ .

L'efficacité de la phosphorylation oxydative, c'est-à-dire le nombre de moles d'ADP phosphorylées par atome gramme d'oxygène consommé a également été déterminé (rapport ADP/O).

### *Produits*

Le pyruvate, l' $\alpha$ -cétoglutarate, la BSA et l'ADP furent fournis par Boehringer Mannheim (Mannheim, Allemagne), l'oligomycine par Sigma (St. Louis, MO, Etats-Unis), le FCCP par Du Pont de Nemours (Wilmington, DE, Etats-Unis), et  $^3\text{H}_2\text{O}$  par Radio Chemical Center (Amersham, Royaume-Uni). En l'absence d'autres indications spécifiques, les autres produits chimiques utilisés dans cette étude ont été fournis par Merck (Darmstadt, Allemagne).

### *Statistiques*

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  erreurs types de la moyenne (SEM). Les modifications observées au niveau des différents paramètres ont été soumises à une analyse de variance pour mesures répétées (ANOVA). Lorsque le test s'est avéré significatif, le test de Fisher a été utilisé pour différencier les groupes dans lesquels les valeurs étaient significativement différentes. Tous les tests statistiques ont été considérés comme significatifs au niveau d'incertitude de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Résultats

Les résultats des mesures de consommation d'oxygène par les mitochondries dans les différentes conditions, sont présentés dans le Tableau 4.2. Par rapport au groupe contrôle, les mitochondries isolées après 24 heures d'ischémie froide présentent une diminution significative de  $V_3$ ,  $V_{FCCP}$ , RC et URC. Il n'y avait pas de différence dans les valeurs mesurées de  $V_4$ ,  $V_{Olig}$  et ADP/O entre les groupes contrôle et IF 24 heures. Par rapport au groupe IF 24 heures, le groupe IF 48 heures ne développe pas de modifications de  $V_{FCCP}$ ,  $V_4$ ,  $V_{Olig}$  et URC. Cependant RC diminue ( $p < 0,001$ ), ce qui est la conséquence d'une diminution de  $V_3$  ( $p < 0,005$ ), et le rapport ADP/O diminue également ( $p < 0,001$ ). Comparé au groupe IF 24 heures, les mitochondries isolées après 24 heures d'ischémie froide et 30 minutes de reperfusion développent une diminution de  $V_3$ , RC et ADP/O ( $p < 0,001$ ).