

11309 20
25

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE
MEXICO

GREFFE DE PANCREAS ALLOGENIQUE CHEZ LE RAT DIABETIQUE: INDUCTION
DE TOLERANCE PAR GREFFE INTRA-THYMIQUE D' ILOTS (ITGIT) PREALABLE.

PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALIZACION EN : CIRUGIA GENERAL

CHAPA-AZUELA, OSCAR

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Introduction

- Etat de la question :

- + Chez le rat.
- + Chez l'homme.

- Stratégies d'induction de l'immunosuppression :

- + Immuno - protection.
- + Immuno - altération
- + Immuno - tolérance.

- Induction de tolérance par greffe intra - thymique (ITGIT).

Matériel

- Animaux:

- 1) de mise au point.
- 2) de protocole.

- Réactifs et solutions :

- 1) induction du diabète
- 2) isolement des îlots
- 3) immunosuppression
- 4) anesthésie.
- 5) prélèvement de pancréas.
- 6) histologie.

- Appareils.

- Instruments.

- 1) pour induire le diabète.
- 2) pour isoler les îlots
- 3) pour la greffe de pancréas
- 4) pour le suivi.

Méthode

1) Structure du protocole

- + Groupes expérimentaux

2) Induction du diabète

- 3) isolement d'îlots pancréatiques

- 4) Modalités de la transplantation :
- + Greffe d'îlots de Langerhans (L) intra - thymique.
 - + Greffe pancréatique.
- 5) Suivi :
- + Généralités
 - + Suivi clinique.
 - + Suivi biologique.
 - + Histologie.

Résultats

- 1) Mise au point de la technique chirurgicale.
- 2) Induction du diabète.
- 3) Résultats du protocole expérimental

Discussion

- Le diabète expérimental.
- Isolement des îlots de Langerhans.
- Greffe d'îlots.
- Greffe de pancréas.
- Induction de tolérance par greffe intra - thymique.

Conclusion

Bibliographie

INTRODUCTION :

Le diabète insulino-dépendant (DID) est la conséquence d'une destruction des cellules β des îlots de Langerhans, le plus souvent secondaire à une maladie auto-immune spécifiquement dirigée contre ces cellules (diabète de type I). La gravité de cette affection tient essentiellement, accidents métaboliques aigus mis à part, à la survenue des complications dégénératives chroniques micro- et macroangiopathiques, source d'une morbidité et d'une surmortalité importantes (1). Des études épidémiologiques suggèrent que l'hyperglycémie chronique joue un rôle prépondérant, dans l'apparition de ces complications dégénératives (2,3). Le traitement du DID repose toujours sur l'administration d'insuline exogène, mais, quels que soient les progrès de l'insulinothérapie et des mesures thérapeutiques associées, ce traitement impose de lourdes contraintes et son efficacité à long terme reste imparfaite. L'insulinothérapie idéale, reproduisant la physiologie de la cellule β , n'existe pas et le pancréas endocrinien artificiel n'est pas utilisable au long cours de manière fiable et commode (4).

Ces données expliquent les différentes voies de recherche destinées soit à prévenir ou à limiter la destruction des cellules β à un stade précoce de la maladie auto-immune, soit, à l'autre pôle de l'histoire naturelle de la maladie, à remplacer le tissu insulino-sécréteur détruit par une greffe.

Ainsi le but idéal de la transplantation pancréatique (TP) est de restaurer une insulinosécrétion physiologique, permettant d'assurer une normoglycémie stricte prolongée et une correction des autres anomalies métaboliques observées au cours du DID. Les bénéfices attendus d'une TP sont de supprimer les contraintes et les risques inhérents à l'insulinothérapie, et par là d'améliorer les conditions de vie des malades, et, plus encore, de prévenir ou de limiter la survenue

et/ou l'évolution des complications dégénératives chroniques (5).

Etat de la question

Chez le rat

L'expérimentation animale trouve donc ici encore un vaste champ d'application. Il a été réalisé des greffes pancréatiques hétérotopiques, orthotopiques, qui restent l'exception, avec drainage entérique, drainage urinaire (6,7), oblitération par un polymère, ligature ou drainage libre dans le péritoine, mais il s'agit toujours de greffes isogéniques ou allogéniques avec immunosuppression.

Chez l'homme

Actuellement, la greffe de pancréas vascularisée est la seule méthode efficace. Depuis les premières greffes pancréatiques réalisées chez l'homme par Kelly et Lillehei en 1966 (8), les résultats de la transplantation pancréatique se sont améliorés de façon considérable grâce en particulier aux nouveaux agents immunosuppresseurs, sans toutefois atteindre les résultats obtenus en transplantation d'autres organes comme le rein, le cœur ou le foie. Si l'immunosuppression d'aujourd'hui est plus efficace en terme de politique anti-rejet, elle l'est aussi dans la genèse de ses complications. On peut mourir d'une encéphalite à cytomegalovirus au premier mois d'une greffe ou d'une lymphome quelques années plus tard (9). Faut-il préférer la néphrotoxicité de la ciclosporine à la néphrotoxicité de l'hyperglycémie pour une maladie -après tout- non vitalement menaçante comme le diabète ?

Le registre international des transplantations pancréatiques tenu par Sutherland à Minneapolis recueille les données de toutes les transplantations pancréatiques effectuées dans le monde (10). Le taux actuariel des greffons fonctionnels à 1 an est de 44% en général, et selon la technique de 46 % pour l'obstruction des canaux pancréatiques, 44% pour le drainage intestinal et de 43% pour le drainage urinaire, et il n'y a pas de données chiffrées précises après ce temps. Le rejet du pancréas est cependant la cause la plus fréquente de perte du greffon à plus long terme : dans la série de Lyon environ 50% de greffons sont perdus dont la moitié par rejet (11,12).

Le fait de pouvoir se passer d'immunosuppression permettrait d'élargir considérablement les indications d'utilisation de tissu pancréatique vivant pour le traitement du diabète sucré humain. En effet, la greffe de pancréas nécessite actuellement comme tous les organes la prescription d'une immunosuppression puissante et permanente qui limite leurs indications aux patients qui justifient d'une telle immunosuppression dans le cadre d'une autre greffe, rénale en particulier. L'indication classique de la transplantation pancréatique est l'insuffisance rénale chronique terminale du diabétique de type I, où transplantations pancréatique et rénale sont couplées, le rein servant de plus de marqueur de rejet. L'amélioration des résultats permettra d'envisager d'élargir les indications à un stade moins avancé des complications. Seule donc la possibilité de greffer le pancréas en absence d'immunosuppression permettrait d'envisager un traitement sur une large échelle des diabétiques insulinodépendants avant l'apparition de ces complications.

Stratégies d'induction de l'immunosuppression.

Le rejet est un problème commun aux greffes de pancréas et des îlots

de Langerhans. Les façons d'y remédier peuvent par contre être différentes :

-**Immuno-protection**: Les pancréas bio-artificiels utilisent des membranes semi-perméables, permettant le passage de substances de faible poids moléculaire comme le glucose (180) et l'insuline (5 900) et empêchant celui de grosses molécules et de cellules, comme les immuno-globulines (>150 000) et les lymphocytes. Ainsi, la glycémie du sujet va pouvoir venir stimuler à l'intérieur du biopancréas le tissu insulino-sécréteur protégé du rejet, et l'insuline sécrétée en réponse traverse la membrane vers l'extérieur du biopancréas. Ce concept d'immuno-isolation ou immuno-protection est une alternative à l'immuno-suppression. Les macrocapsules utilisées sont des fibres creuses à forme de capillaire dont les parois sont constituées d'une membrane à perméabilité sélective, formée d'un copolymère de chlorure de polyvinyl et d'acrylate. Leur diamètre intérieur est de 1 mm, le mur du capillaire est de 110 microns et le poids moléculaire d'exclusion est de 50 000 daltons (13, 14, 15, 16)

Dans notre laboratoire nous travaillons à la détermination des sites les plus adéquats pour implanter ces pancréas bio-artificiels (intrapéritoneal, sous cutané)

Il existe aussi une autre modalité de biopancréas, la micro-encapsulation qui repose sur le même principe (17)

- **Immuno-altération**: D'après la conception classique du rejet de greffe, l'antigène du greffon stimule directement le système des lymphocytes T, ce qui déclenche le processus de rejet. Il semble maintenant qu'une cellule stimulatrice doit donner deux signaux avant l'activation de la cellule T dans le processus de rejet de greffe. Le premier signal est la liaison de l'antigène du transplant à la cellule

activatrice. Le second signal est la libération d'une molécule co-activatrice par la cellule stimulatrice, qui active le lymphocyte T dans certaines conditions. Comme cette cellule activatrice est située dans le greffon, on l'appelle lymphocyte passager. C'est cette cellule stimulatrice du donneur située dans la greffe qui constitue la source principale d'immunogénicité. L'élimination de ces cellules du greffon avant la transplantation (concept d'épuration) entraîne la tolérance des allogreffes sans besoin d'immunosuppression. Les receveurs greffés avec des tissus ainsi prétraités ne présentent pas de réponse immunitaire, ce qui suggère un état de tolérance. Les recherches sont actuellement orientées vers les cultures en milieux enrichis en oxygène (95%) ou à basse températures (24°C) ou en présence de serum anti-lymphocytaire ou irradiation U - V du greffon. Ces méthodes réduisent ou détruisent les cellules responsables du rejet, ou altèrent la distribution des récepteurs spécifiques de surface (18)

-Immuno-tolérance: on peut induire une immuno-tolérance par plusieurs méthodes comme la transfusion sanguine et les médicaments.

Induction de tolérance par greffe intra-thymique (ITGIT) :

C'est l'hypothèse sur laquelle repose le travail de chirurgie expérimentale que nous avons réalisé dans le cadre du diplôme universitaire. Une greffe d'îlots de Langerhans allogénique chez le rat en un site quelconque (sous la capsule rénale) est rejetée. La même greffe dans le thymus est immunoprotégée par la présence d'une barrière hématologique et parce que le thymus possède peu d'afférences lymphatiques, par conséquent, la recirculation des lymphocytes T matures dans le parenchyme thymique est minime

Surtout cette greffe intra-thymique induirait une tolérance donneur spécifique pour un second greffon implanté dans un site non privilégié. Les nouveaux lymphocytes qui mûrissent en présence d'alloantigènes pancréatiques les reconnaissent comme soi ("self")(19) et ne rejettent plus le second greffon dont la tolérance a été induite par la première greffe.

Dans l'optique d'une application humaine il est important de savoir si l'induction de tolérance par greffe intra-thymique qui a été rapportée pour les îlots est aussi efficace pour la glande pancréatique, dans son ensemble porteuse d'antigènes plus nombreux et plus complexes que les îlots et qui pour le moment est plus fréquemment métaboliquement active dans le traitement du diabète insulino dépendant.

Ce protocole nécessitait donc au plan technique la mise au point de prélèvement de la glande pancréatique totale chez le rat normal suivi de sa greffe efficace chez le rat diabétique. Cette étape que nous décrivons en détail a été parfaitement réalisée. Par ailleurs la vérification de l'hypothèse d'induction de tolérance par greffe préalable intra thymique d'îlots nécessitait, nous la décrivons aussi en détail, la mise au point d'isolement d'îlots suivie de greffe intra-thymique, suivie d'un temps de latence important avant la greffe secondaire de glande pancréatique et ceci sur plusieurs groupes expérimentaux. Ce travail est en voie de réalisation et nous présenterons son état d'avancement. Nous le terminerons grâce à une collaboration à notre retour au Mexique, où nous disposerons d'un laboratoire de recherche, collaboration entre nous et les autres chercheurs du laboratoire de Paris où plusieurs travaillent aussi sur ce thème.

MATERIEL ET METHODE

Animaux

1) de mise au point: rats Wistar mâles âgés de 6 à 8 semaines (160-220g)(IFFA CREDO,Domaine des Oncins)

2) de protocole: rats Wistar Furth (WF) mâles âgés de 7 semaines (receveur); rats Lewis (L) mâles âgés de 7 semaines (donneur d'îlots et de pancréas); rats Brown Norway (BN) (deuxième donneur de pancréas.).

Réactifs et solutions

1) induction du diabète: Streptozocine (Zanosar, Laboratoires Upjohn, Paris La Défense); Acide citrique (No C-0759, PM 192.1); Chlorure de sodium isotonique à 0.9% (Pharmacie Centrale des Hopitaux).

2) isolement des îlots: Collagenase P (Boehringer); Solution de Hanks (Sigma, No C H6136); Histopaque 1077 (Sigma).

3) immunosuppression : serum anti-lymphocytaire de lapin (Mérieux)

4) anesthésie . Ether, Chlorhydrate de kétamine (Ketalar, Parke-Davis, 50 mg/ml).

5) prélèvement de pancréas : solution de chlorure de sodium isotonique à 0.9 % (Pharmacie Centrale des Hopitaux), Heparine (5 000UI/ml, Laboratoires LEO).

6) **histologie** : inclusion en paraffine, coupes colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HES).

Appareils

1) pH-metre CG 840 (Schott); Glucose Analyseur (Beckman); Centrifugeuse Minifuge RF (Heraeus); Incubateur pour cultures de cellules et de tissus B 5061 EC/CO₂ (Heraeus); Hotte à flux laminaire (Bioblock); Microscope chirurgical (Carl Zeiss K 120/76); Coagulateur bipolaire automatique (COBI 50 Ta).

Instruments

1) **pour induire le diabète**: seringues à insuline stériles 0.36X13 mm/28GX1/2 (Plastipak).

2) **pour isoler les flots**: seringue 20 ml (Plastipak). Catheter 0.8 mm X 20.3 cm (The Deseret Company, Sandy, Utah 84070 USA, Cat. No 4212); Boîtes de Pétri 100 mm de polystyrène cristal (CML France); Boîtes de Pétri de 60 mm quadrillées (Nunc); Tubes à centrifugation de 20 ml fond conique et tubes de 40 ml fond rond (Médi Sciences); Pipettes de 10 et 25 ml (Médi Sciences); Filtre tamis inox de 500 µm.

3) **pour la greffe de pancréas**: Ciseaux de Castroviejo Gilbert courbes (Moria 9908); Porte-aiguilles de O'Brien, mors courbes ultra fins de 0.8 mm (Moria 9915); Pince Moria No 3 droite (Moria 9933); Pince Moria No 4 droite (Moria 9944); Clamp double de Gilbert (Moria 204 A) Tournevis pour clamps de Gilbert (Moria 204 D); Fil de Polyamide monofil 13 cm aiguille 3/8 c BV 1403 9/0 (Ethilon noir).

NS 2819 Ethnor S.A. 92200 Neully); Fil de Polyamide monofil 13 cm.
arguille 3/8 c. BV 70,3 10/0 (Ethilon noir, NS 2850, Ethnor S.A.
92200 Neully);

4) pour le suivi : Cages métaboliques (Iffa-Credo):

METHODE

1) Structure du protocole:

Groupes expérimentaux

Groupe 1 (n=6) : rats (WF) diabétiques avec greffe de pancréas (WF) (isogénique) : contrôle de la méthode chirurgicale

Groupe 2 (n=6) : rats (WF) diabétiques avec greffe de pancréas (L) (allogénique), contrôle sans induction de tolérance : ITGIT-.

Groupe 3 (n=6) : rats (WF) diabétiques avec greffe d'îlots allogénique (L) intra-thymique et 30 jours après greffe de pancréas avec même donneur (L) (allogénique) : groupe expérimental avec induction de tolérance : ITGIT+.

Groupe 4 (n=6) : rats (WF) diabétiques avec greffe d'îlots allogénique (L) intra-thymique et 30 jours après greffe de pancréas (BN) (allogénique) : groupe expérimental avec ITGIT et deuxième donneur différent.

2) Induction du diabète:

Le diabète est induit par une injection unique intraveineuse (veine saphène) de streptozocine (60mg/kg) dans 200 µl de solution tampon citrate à pH 4,3 (Photo 5). Le rat ainsi rendu diabétique est maintenu en vie par une injection quotidienne d'insuline retard (5 à 10 UI SC). Seuls les rats avec une glycémie à 3 g/l ou plus vérifiée deux fois à J

3 et J 14 seront utilisés dans le protocole.

3) Isolement d'îlots pancréatiques:

Pour l'isolement d'îlots on a choisi la méthode de Gotoh (20), digestion enzymatique en incubation statique du pancréas distendu par une solution de Hanks/collagenase (15 ml/20 mg), purification avec Histopaque 1077. Quatre rats (L) seront utilisés pour chaque manipulation. Prendre un rat pesant entre 200 et 250 gr. L'anesthésier avec 0.6 ml (30 mg) de Kétamine intrapéritonéale. Lui tondre largement l'abdomen et le thorax. Désinfecter la peau à l'alcool. Ouvrir l'abdomen, d'une grande incision xypho-pubienne, en deux temps: cutanée puis musculaire et péritonéale. Couper la xyphoïde. Retourner le rat, tête vers l'opérateur. En appuyant avec les deux pouces, à la base du thorax, "éjecter" le foie en le retournant. Le maintenir dans cette position à l'aide d'une compresse mouillée.

Dégager la première anse duodénale, en la soulevant et en écartant ses deux bords on distingue le canal pancréatique par transparence; le clamper, juste à son abouchement dans le duodénum (Photo 1).

Avec une petite pince à disséquer courbe, faire passer un fil sous le cholédoque, juste en dessous de la dernière branche du canal hépatique, qui vient de la droite, mais pas trop bas pour ne pas prendre de parenchyme pancréatique dans le nœud. Préparer un nœud simple pour la ligature (Photos 2 et 3).

Avec des ciseaux très fins dégager la face postérieure de cholédoque de la veine porte et de l'artère hépatique, l'inciser transversalement au dessus de la ligature, en choisissant un endroit où celui-ci est assez large, pour exemple sa partie proximale, à la confluence des deux premiers canaux hépatiques. Cette incision doit être seulement hémicirculaire ne pas couper entièrement le cholédoque

(Photo 4).

Cathétériser le cholédoque avec un cathéter 22 Ga. dont l'extrémité aura été coupée en biseau; ne pas enfoncer le cathéter de plus de 1/2cm après la ligature. Serrer fort le noeud.

Procéder alors rapidement: Thoracotomiser l'animal, le saigner par ponction cardiaque. Dès que l'animal est saigné, distendre le pancréas avec 15 ml de solution de Hanks/collagénase glacée (4°C).

Une fois le pancréas distendu, le libérer de ses attaches en coupant au niveau du duodenum, estomac, côlon transverse et rate. Saisir alors tout le pancréas par le cholédoque (même par le cathéter), le tirer vers le haut et sectionner ses derniers points d'ancrage (veine porte, cholédoque, artère hépatique, artère mésentérique supérieure et tronc coeliaque). L'étaler dans une boîte de Pétri et incubé 45 mn à 37°C et à 5% de CO₂.

Toutes les opérations suivantes se déroulent stérilement, sous hotte à flux laminaire, à 4°C. Rajouter 10 ml de Hanks froid dans la boîte de Pétri, reaspirer le Hanks avec le pancréas, transférer dans un tube à centrifugation de 20 ml, compléter avec du Hanks

On procède alors à 3 centrifugations-lavages successifs, dans du Hanks (1 mn, 1100 t/mn = 250 g avec frein, à 4°C). La graisse flotte à la surface du surnageant et est discardée.

Après la dernière centrifugation, resuspendre le culot dans 10 ml de Hanks et filtrer à travers un tamis inox de 500 µm.

La fraction filtrée est récupérée dans le tube qui servira à faire le gradient de densité. Pooler les pancréas par deux, dans un tube de gros diamètre à fond rond de 40 ml.

Faire une dernière centrifugation (mêmes constantes), puis aspirer tout le surnageant. Bien assécher le tube

Resuspendre le culot dans 20 ml d'Histopaque (20°C), vortexer. Couvrir avec 10 ml de Hanks (sans rouge phénol, avec 10 mM d'Hepes) à 20°C.

Centrifuger à 2500 t/m pendant 25 minutes, sans frein, à 20°C. Les îlots se trouvent à l'interface Histopaque-Hanks (avec éventuellement quelques petits ganglions lymphatiques et des structures canalaies). Les prélever à la pipette en aspirant le minimum d'Histopaque. Laver deux fois les îlots dans un tube à fond conique de 20 ml au moins, avec du milieu de culture: la première fois à 2500 t/mn pendant 1 mn, la deuxième fois 1000 t/mn pendant 1 minute.

Numération: on utilise des boîtes de Pétri 60 mm à fond quadrille. Resuspendre les îlots dans 5 ml de milieu de culture et les compter sur toute la boîte, sous microscope optique à l'aide d'un compteur cellulaire.

Les îlots sont prêts à être greffés dans le thymus.

4) Modalités de la transplantation :

- **Grefe d'îlots de Langerhans (L) intra-thymique** : à J 15 injecter une dose unique de serum anti-lymphocytaire de rat (SAL). Greffer en intra-thymique 750 îlots (L) dans chaque lobe (groupes 3 et 4). Faire un groupe contrôle (SAL +) sans greffe d'îlots intra-thymique (groupe 1 et 2). Le rat receveur (WF) diabétique est anesthésié à l'éther. Ce type d'anesthésie est choisi parce qu'il semble le mieux toléré chez le rat diabétique, permettant un réveil plus rapide. La peau de la face antérieure du cou et du thorax est rasée et désinfectée à l'alcool (Photo 6). Le rat est installé la tête vers l'opérateur. Après une incision longitudinale médiane sur la peau (2 cm) (Photo 7) on coupe le fascia cervical superficiel transversalement jusqu'à la veine jugulaire externe de chaque côté (Photo 8). Dégrafer le muscle sterno-hyoidien pour découvrir la trachée (Photo 9) couper le sternum longitudinalement (0.5 cm) pour découvrir le thymus dans le médiastin antéro-supérieur, qu'il faut dégrafer du fascia

endo-thoracique, pour réaliser l'injection intra-thymique d'îlots (L) (750 îlots en chaque lobe) avec une seringue à insuline dans un volume de 50 μ l de solution de Hanks (Photo 10). Après l'injection le sternum est rapproché avec deux points de suture de polyester tressé 3/0 et on ferme la peau avec des points continus de la même matière.

- **greffe pancréatique** : (21,22,23,24) un mois après, faire une greffe de pancréas allogénique (L) même donneur (groupes 2 et 3), une greffe de pancréas allogénique (BN) deuxième donneur différent (groupe 4) et une greffe de pancréas isogénique (WF) (groupe 1)

+ Prélèvement du transplant : Il s'agit ici d'une pancréatectomie totale visant à obtenir un organe pédiculisé sur l'aorte coeliaque et la veine porte avec un segment de duodénum pour assurer le drainage exocrine

+ installation et voie d'abord : le rat anesthésié par une injection intrapéritonéale de 0,6 ml de Ketamine (50 mg/ml), la peau de l'abdomen est rasée et désinfectée à l'alcool, est installé la tête face à l'opérateur (photo 11). La voie d'abord se fait par une large incision en U (incision de Sun Lee), transversale sus-pubienne rejoignant deux verticales latérales au niveau de la ligne axillaire antérieure de chaque côté remontant jusqu'au grill costal (photo 12). Ce lambeau est rabattu sur le thorax (photo 13). La masse intestinale est réclinée vers la partie gauche de l'abdomen dans une compresse humide

+ libération du pancréas : c'est le temps essentiel, le plus long. Il se fait à l'oeil nu

a) La rate est soulevée vers la gauche : on libère les quelques adhérences postérieures et gastriques. avasculaires il existe souvent un à deux vaisseaux postérieurs qui sont liés (5/0) comme les vaisseaux spléniques au ras de la rate (photo 14). On utilise la rate pour présenter le pancréas car il est essentiel de ne pas traumatiser la glande pancréatique lors de cette dissection. Des traumatismes

repetes entraîneraient une pancréatite post-opératoire.

b) L'artère coronaire stomacique est liée et sectionnée près de l'estomac, lors de la même exposition (photo 14).

c) Abaissement du côlon transverse par décollement du mésocôlon qui se fait dans un plan rigoureusement avasculaire. Le côlon étant abaissé la face antérieure du pancréas est découverte en totalité, ainsi que les vaisseaux mésentériques supérieurs (photo 15). Ligature des vaisseaux mésentériques au dessous du pancréas et section de ceux-ci. Il faut souvent ligaturer séparément un ou deux vaisseaux jéjunaux pour ne pas lier trop près du pancréas les vaisseaux mésentériques (photos 16 et 17).

d) On peut signaler les particularités anatomiques du pancréas du rat: *un segment gastro-splénique*, appendu à la partie inférieure de la grande courbure gastrique et se prolongeant vers la rate (équivalent de la queue du pancréas). Il est vascularisé par l'artère gastro-épiploïque droite et des branches des vaisseaux spléniques (photo 18);

un segment duodenal, compact et intimement accolé au duodenum proximal relié à lui par de nombreux vaisseaux. Cette partie, assimilable à la tête du pancréas est vascularisée préférentiellement par le tronc coeliaque, par l'intermédiaire de l'artère gastro-duodénale. On peut le limiter en bas par l'abouchement du cholédoque. Celui-ci est bien vu à la face postérieure de la glande, tendu entre le duodenum et le pédicule hépatique (photo 19);

un segment mésentérique, très développé chez le rat (pouvant être comparé chez l'homme à la partie inférieure de la tête et au crochet) ici il s'étale de façon diffuse, accolé de façon plus lâche au duodenum distal et au jejunum proximal. Les vaisseaux sont moins nombreux et dépendent du territoire mésentérique supérieur, à leurs proximités, le tissu pancréatique se distingue difficilement de la graisse

mesenterique (photo 19).

e) dissection et ligatures des petits vaisseaux unissant le pancréas à la grande courbure gastrique (photo 20) , puis au duodénum. Il faut impérativement les lier sur le pancreas et faire une ligature par vaisseaux . Ce sont ces vaisseaux qui, insuffisamment disséqués, saignent au déclampage. Il est alors très difficile d'en rattrapper l'hémostase. On poursuit la dissection jusqu'au cholédoque, et on la reprend en dessous de ce dernier, pour terminer la libération pancréatique (photo 21). Le duodénum est ligaturé en sa partie proximale et sectionné de part et d'autre du cholédoque (1 cm), sa partie distale n'est pas ligaturé : on obtient alors un pancréas libéré de ses attaches digestives (photo 22).

+ Dissection des vaisseaux : Elle se fait au microscope, à faible grossissement (X10 ou X16)

a) La veine porte est dissequée dans le pédicule hépatique où l'on commence par ligaturer et sectionner le cholédoque , puis on lie distalement l'artère hépatique (nylon 7/0), après la naissance de l'artère gastroduodénale (on laisse un fil long sur le moignon pour orienter plus facilement le greffon par la suite), on libère la veine porte des tissus graisseux et des lymphatiques qui l'entourent. Il faut bien en dénuder toutes les faces surtout au niveau de la section future, juste avant la bifurcation (Photo 23).

b) L'aorte coeliale est exposée en réclinant tout le bloc pancréatico-splénique vers la droite. Le rétro-péritoine est ouvert. On dissequé alors l'aorte du diaphragme jusqu'à la veine rénale gauche. En haut, au cours de la libération de l'origine du tronc coeliale, il faut prendre garde aux branches diaphragmatiques de l'aorte qui seront électrocoagulées. En bas on dissequé l'origine de l'artère mesenterique supérieure . L'artère rénale droite est juste derrière elle, il faut la sectionner entre deux ligatures. L'artère rénale gauche

est normalement conservée on peut être obligé de la lier si son origine est haute, trop rapprochée de l'artère mésentérique. On vérifie que l'aorte est totalement libérée (Photo 24).

+ Prélèvement et rinçage :

a) La fin du prélèvement doit être rapide, pour limiter le temps d'ischémie chaude du transplant. Dans l'ordre: lier l'aorte en haut et en bas (sous l'artère rénale gauche) et couper la veine porte; placer le cathéter de rinçage dans l'artère rénale gauche sectionnée, ce qui permet de ne pas endommager l'aorte.

b) Rinçage du greffon : en poussant a la seringue, mais à faible pression, la solution de chlorure de sodium isotonique à 0.9 % (10 ml) héparinée (500 UI) à 4°C de température. On constate d'abord la décoloration du pancréas et du segment duodénale, puis l'issue de liquide par la veine porte. Le rinçage est complet et satisfaisant lorsque tous les vaisseaux à la surface du pancréas apparaissent décolorés.

c) Section de l'aorte : d'abord inférieure au dessus de la veine rénale, puis en haut, au dessus de la ligature, sacrifiant ainsi le donneur. Le greffon est immergé dans une boîte de Pétri à double fond avec du chlorure de sodium isotonique à 0.9 % à 4°C de température (Photo 25)

+ Transplantation du greffon

Le rat receveur (WF) diabétique est anesthésié à l'éther, la peau de l'abdomen est rasée et désinfectée à l'alcool le rat est installé la tête à gauche de l'opérateur. Après une laparotomie xypho-pubienne (Photos 26 et 27), la masse intestinale est réclinée à gauche dans une compresse humide. Le péritoine postérieur est ouvert, l'aorte et la veine cave inférieure sont disséquées de la bifurcation iliaque jusqu'à la veine rénale gauche, les vaisseaux lombaires sont liés au fil 9/0 pour les plus gros ou électrocoagulés, puis sectionnés. Les deux

vaisseaux ainsi libérés sont placés sur un fond jaune (Photo 28). on met en place un clamp double de Gilbert conjointement sur l'aorte et la veine cave (Photo 29). Aortotomie transversale aux ciseaux et rincage abondant. La cavotomie sera décalée vers le bas, et de plus petite dimension. Rincage au sérum physiologique.

L'anastomose aorto-aortique, latéro-terminale, nécessite 10 points séparés de nylon monobrin 10/0, selon la technique habituelle, on commence par les deux points cardinaux inférieur et supérieur, on réalise la première face, puis on bascule le greffon pour la deuxième face (Photo 30).

L'anastomose porto-cave, termino-latérale, selon la même technique nécessite 10 points de 10/0. Le twist des vaisseaux est facile à éviter. En revanche, dans la masse du greffon uniformément décoloré, il est difficile de retrouver le moignon rétracté de la veine porte, d'où l'intérêt de la conservation du fil long sur le moignon de l'artère hépatique qui est juste au dessus de la veine porte.

Les vaisseaux sont declampés et la qualité de la revascularisation est appréciée par la recoloration du pancréas, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer de test de perméabilité.

Le drainage exocrine se fait avec le segment duodénal qui s'anastomose en termino-lateral sur la troisième portion duodénale du receveur de façon isopéristaltique, avec points séparés séromusculaires. il nécessite 10 points de nylon 7/0 (Photo 31)

On peut alors couper la rate, dont les vaisseaux ont déjà été liés. On injecte après 5 ml de sérum physiologique IV pour remplacer le volume perdu lors du declampage.

Fermeture de la paroi abdominale en deux plans, le péritoine et la paroi musculaire avec un surjet de polyester 3/0, la peau avec des points séparés du même matériel.

+ Prélèvement du greffon rejeté.

Quand le rat redevient diabétique il faut prélever le greffon rejeté (Photo 32). Après une laparotomie xypho-pubienne, on dégage toutes les adhérences et on prélève le pancréas avec ses anastomoses vasculaires et son anastomose duodéno-duodénale qu' on dépose dans du formol à 10% pour l'analyse histologique. On prélève aussi le pancréas natif et le thymus dans le cas de greffe intra-thymique préalable.

5) SUIVI :

Il est le même après la greffe d'îlots seule pendant un mois et après la greffe secondaire de pancréas.

Généralites :

- nourriture : a volonté;
- boisson : a volonté;

Suivi clinique :

- Poids: tous les 7 jours;
- Diurèse: quotidienne;
- Consommation d'eau, quotidienne;

Suivi biologique :

- glycémie bi-hebdomadaire;
- glycosurie quotidienne;
- insulïnémie : deux fois par mois.

Histologie :

- Analyse morphologique : fixation des organes dans du formol à 10% : pancréas natif (WF), greffon (L) avec suture vasculaire et digestive, thymus, durée moyenne 8 jours. Inclusion en paraffine (3 blocs) coupes colorées à l'hématoxyline-éosine-safran.

RESULTATS

1) Mise au point de la technique chirurgicale :

Pancréatectomies (n=10) : la durée moyenne du prélèvement du pancréas chez le donneur a été de 2 heures 30. le greffon était de bonne qualité dans 100% des cas et la durée de l'ischémie froide était de 2 heures en moyenne.

Transplantation pancréatique (n=10) : La glycémie chez le receveur a toujours été retrouvée entre 3.5 et 4.0 g/l malgré l'administration d'insuline avant la chirurgie. La durée moyenne de la dissection des vaisseaux (aorte et veine cave) a été de 30 minutes, celle des anastomoses de 60 minutes et la durée du clampage a donc été de 60 minutes. 5 rats sont morts lors du déclampage du fait d'une grosse hémorragie au niveau des anastomoses, deux autres sont morts 24 heures après la chirurgie et seulement les trois derniers sont restés vivant plusieurs jours, tous les trois avec guérison clinique du diabète, normoglycémie, glycosurie négative, diurèse et consommation d'eau normales jusqu'au rejet à J 14.

Après le rejet (glycémie > 2g, glycosurie +++, diurèse > 25ml/24h) on a prélevé le greffon et en cas de ligature des canaux pancréatiques nous avons trouvé une importante dilatation kystique intra-parenchymateuse avec destruction quasi totale du tissu pancréatique et accompagné de signes de rejet (Photo 33)

2) Induction du diabète :

Nous avons utilisé 24 rats (WF) mâles âgés de 9 semaines pour induire le diabète, avec un taux de réussite de 100% des cas. Tous les rats avaient une glycémie à J3 et à J14 > 3gr/l.

3) Résultats du protocole expérimental :

groupe 1 (greffe de pancréas isogénique) :

Pancreatectomie (n=6): La durée moyenne de la pancreatectomie chez le donneur (WF) a été de deux heures, avec 100% de greffons de bonne qualité, la durée de l'ischémie chaude a été de 2 minutes et celle de l'ischémie froide de 2 heures.

Transplantation (n=6): La glycémie avant la chirurgie chez le receveur était entre 3 et 4g/l. La durée de la dissection des vaisseaux a été de 25 minutes, la durée du clampage aortique a été de 50 minutes, celle des anastomoses vasculaires de 45 minutes, et celle de l'anastomose digestive de 20 minutes. La durée totale de la chirurgie a été de 2 heures. La survie après la chirurgie a été 83% (un rat est décédé 24h après) et le taux de guérison a été de 100% avec normalisation de la glycémie, glycosurie négative et diuresis < 15 ml/24h (graphiques 1, 2 et 3). Un rat est mort à J 60 par occlusion intestinale.

Groupe 2 (greffe de pancréas allogénique sans ITGIT):

Pancreatectomie (n=6): mêmes résultats que le groupe 1.

Transplantation pancréatique (n=6): la glycémie chez le receveur avant la chirurgie était entre 3 et 4g/l. Les durées des temps opératoires ont été : dissection des vaisseaux 25 mn ; clampage aortique 45 mn ; anastomoses vasculaires 40 mn, anastomose digestive 20 mn durée totale de la chirurgie 2 heures. Survie 100%. L'efficacité de la greffe était manifeste dès le lendemain et se confirmait par le maintien d'une diuresis inférieure à 15 ml/24 heures sans glycosurie la glycémie était normalisée dans le 100% des cas (graphiques 1, 2 et 3) Délai de rejet 10 jours Complications un anévrysme aortique au niveau de l'anastomose artérielle (Photo 34) et une fistule digestive au niveau de l'anastomose duodeno-duodénale.

(Photo 35).

Prélèvement du greffon :

L'ablation du pancréas greffé a été réalisée lors que la glycémie augmentait ($>2g/l$) aussi que la diurèse ($>30ml/24$ heures) avec glycosurie positive. Le greffon restait bien vascularisé et aisément dissociable des organes voisins.

Macroscopie :

Greffon augmenté de volume environ 5cm x 2cm;

Pancréas natif (WF) normal.

Histologie:

Pancreas natif (WF) : peu d'îlots, en moyenne 5 à 6 par coupe, petits, contenant quelques lymphocytes (photo 36). Un cas avec infiltrat cellulaire à prédominance sous capsulaire avec pancréatite oedémateuse (photo 37)

Greffon : glande pancréatique transformée en un tissu comportant :

- oedème majeur ; infiltrat cellulaire : lymphocytes, macrophages, polynucléaires, neutrophiles (Photo 38).

- occlusions des petits vaisseaux par des thrombi fibrino - cruoriques (thromboses récentes, infiltrat cellulaire lymphocytaire et a polynucléaires ;

- lésions de vascularite pariétale a lymphocytes avec necrose fibrinoide de la paroi des vaisseaux .

- en peripherie du "pancreas" quelques foyers où on reconnait des acinis de glande pancréatique .

- petits canaux infiltrés par des lymphocytes, macrophages, polynucléaires et oedeme, colonisation des acinis par des lymphocytes, cellules exocrines necrosées, pas d'îlots

reconnaissables :

- canaux pancréatiques : canalite oblitérante, nécrose partielle de la paroi, une oblitération de la lumière par des bourgeons conjonctifs jeunes ;
- vaisseaux : quelques fils de suture visibles, réaction inflammatoire minime autour de ces fils ; anastomose vasculaire du greffon : artériopathie du côté greffon avec une prolifération intimo-médiale associée à des éléments inflammatoires ;
- suture digestive : côté receveur (WF) pas d'altération ; côté du greffé: nécrose de la tunique digestive, d'allure ischémique, colonisée pour des lymphocytes et des polynucléaires.

Groupe 3 (n=6) (greffe de pancréas allogénique avec ITGIT):

Isolement des îlots : La durée de la pancréatectomie chez le donneur a été de 15 minutes et la durée de l'isolement a été de 3 heures et demi, en moyenne nous avons obtenu 400 îlots par pancréas, la pureté des îlots à chaque fois a été de 80%

Greffe intra-thymique : nous avons réalisé 6 greffes d'îlots en intra-thymique, par ponction directe, de 750 îlots dans chaque lobe, la durée de la chirurgie a été de 20 minutes. Nous n'avons pas réussi à améliorer significativement l'hyperglycémie mais la survie après la greffe a été de 100%.

Greffe pancréatique nous avons fait jusqu'à présent 2 greffes pancréatiques chez le rat (WF) diabétique avec ITGIT, les résultats de la transplantation ont été les mêmes que dans le groupe 2. L'efficacité de la greffe était manifeste dès le lendemain mais le délai du rejet a été aussi de 10 jours.

Groupe 4 (n=6)(greffe de pancréas allogénique avec ITGIT deuxième donneur différent)

Isolement des îlots : idem groupe 3

Grefte intra-thymique : idem groupe 3.

Grefte pancréatique : nous n'avons pas commencé cette partie du protocole.

DISCUSSION

Le diabète expérimental

Résumé de la question :

Il en existe plusieurs modèles.

1) La pancréatectomie chirurgicale totale.

Elle serait la méthode idéale mais, réalisée chez le rat, la mortalité est proche de 100% à 7 jours (25). Elle n'est pas adaptée aux techniques de greffe vascularisée envisagées.

2) Le diabète spontané des rats BB.

Il survient chez des rats Wistar, non consanguins et non obèses, entre 40 et 140 jours après leur naissance. D'origine génétique (transmission autosomique récessive) et impliquant un désordre immunitaire encore mal connu, ils se caractérisent sur le plan histologique par une "insulite" généralisée et intense avec des lésions identiques à celles observées chez l'homme atteint de diabète insulino-dépendant diagnostiqué précocément (23). Ce modèle, encore récent, n'a pas encore été utilisé pour l'étude des greffes vascularisées de pancréas.

3) Les diabètes chimio-induits.

Alloxane et Streptozocine provoquent la destruction des cellules β de Langerhans (26). Mais les caractéristiques du diabète obtenu et surtout les effets secondaires les opposent.

a) **L'alloxane**: A des doses de 65mg/kg administrées en intra-veineux, il provoque un diabète cétosique avec augmentation du taux circulant des acides gras libres. Mais la mortalité est élevée aux doses diabétogènes (40% de décès à 40mg/kg) essentiellement par néphrotoxicité. De plus une faible variation de la dose modifie beaucoup l'intensité du diabète. Enfin son action est inhibée par les variations de glycémie et surtout par l'hyperglycémie. Néanmoins, elle fut utilisée avec succès par Orloff et Sun Lee, pionniers de la greffe vascularisée chez le rat.

b) **La streptozocine**: antibiotique isolé à partir du milieu de fermentation de streptomyces achromogenes, elle a été décrite pour la première fois par Herr en 1960. Après injection de 65mg/kg administrée en intra-veineux, les animaux présentent une hyperglycémie sévère avec hypoinsulinémie, cétonurie, perte de poids et cataracte. L'hyperglycémie découle d'une augmentation du niveau de néo-glucogénèse et d'une diminution de la glycolyse et du cycle des pentoses-phosphates. L'activité des enzymes glycogénolytiques et de la glycogène synthétase est diminuée et cette activité est restaurée par l'insulinothérapie. Elle présente de nombreux avantages:

- Très faible mortalité à 65mg/kg (DL 50= 140mg/kg);
- Effets toxiques négligeables. En particulier, il n'y a pas de néphrotoxicité
- L'additivité des effets de petites doses successives permet d'obtenir un diabète sévère sans augmenter les risques toxiques généraux
- La relation dose-effet est telle qu'il faut une variation importante de la dose pour modifier l'intensité du diabète

Ces avantages sont tempérés par son instabilité chimique une fois qu'elle est diluée et par la variabilité de sensibilité entre les souches

d'animaux, ce qui nécessite des essais préliminaires pour définir la dose entraînant les effets souhaités .

Notre choix :

La streptozocine est actuellement l'agent diabétogène le plus utilisé et nous l'avons choisi pour notre protocole.

De nombreuses techniques ont été proposées pour réaliser l'injection intraveineuse de streptozocine (dans la veine de la queue, dans la veine dorsale du penis) Neanmoins, nous avons choisi la veine saphène externe pour faire l'injection ce qui assure que l'intégralité de la dose est intraveineuse. L'injection nous a paru très facile, sans effets secondaires sur le site d'injection (pas de sclérose), avec 100% de succès, 0% de mortalité et dans les rares échecs de l'injection d'un côté on peut utiliser l'autre côté Nous n'avons jamais observé de rémission spontanée du diabète

Isolement des îlots de Langerhans.

Mise au point sur la question :

La première méthode d'isolement des îlots de Langerhans consistait à distendre le pancréas, le découper et le digérer par une collagénase (27). Cette technique utilisée pour les premières greffes ne permettait d'obtenir qu'un nombre très limité d'îlots environ 1 à 2% de la masse insulaire, or, il en faut 10% pour corriger un diabète induit chez l'animal et probablement plus chez l'homme C'est dire que l'isolement des îlots de Langerhans demeure l'écueil essentiel à la greffe.

Des travaux ont été réalisés pour améliorer le nombre et la qualité des îlots isolés. Pour faciliter la digestion enzymatique ont été

comparées les distensions glandulaires par voies ductale, artérielle et veineuse (28). De même, ont été essayés de très nombreux procédés de découpage du pancréas. Des tentatives de standardisation de la digestion enzymatique portant sur la concentration, le type de collagénase, la durée et le mode d'incubation, l'utilisation de chambres de digestion, se sont toujours heurtées à la très grande variabilité des lots de collagenase. De fait, ces techniques n'ont pas permis d'obtenir suffisamment d'îlots à partir d'un seul pancréas pour espérer corriger un diabète. Ce n'est que depuis deux ou trois ans que sont apparues des techniques permettant d'obtenir plus de 10% de la masse insulaire.

Pour faciliter la séparation des îlots du tissu exocrine, l'utilisation de tamis métalliques a été proposée. Néanmoins, des fragments de pancréas exocrine passent à travers ces tamis, ce qui nécessite une étape de purification. La technique la plus souvent utilisée est celle d'un gradient de densité (Percoll, Ficoll, albumine). Une centrifugation permet aux îlots, grâce à leur densité spécifique, de se localiser au niveau d'une interphase donnée.

Notre stratégie :

Nous avons utilisé pour notre protocole la méthode de Gotoh (20). Nous avons réussi à obtenir de 400 à 500 îlots par pancréas, ce chiffre est tout à fait comparable à celui des autres publications. Nous avons utilisé le gradient d'histopaque pour la purification, qui donne des résultats reproductibles. La morphologie et la pureté des îlots a été aussi comparable à celle des autres publications (Photo 39) (29). En moyenne nous avons utilisé 4 donneurs (4 x 500) pour chaque greffe.

Greffe d'ilots :

Etat de la question :

La première tentative couronnée de succès pour traiter le diabète expérimental par la transplantation d'ilots de pancréas isolés n'a abouti qu'à une amélioration temporaire de l'hyperglycémie après injection intrapéritoneale chez le rat . Cependant, peu de temps après, Ballinger et Lacy ont rapporté le premier traitement permanent d'un diabète induit expérimentalement par une transplantation d'ilots (7.47). A partir de cette expérience, plusieurs équipes ont réussi des greffes d'ilots pancréatiques chez le rat diabétique dans différents sites : rate, veine porte, capsule rénale, testicule, thymus..., toujours avec succès sur le contrôle métabolique du diabète. Ces découvertes ont conduit à un regain d'intérêt dans le champ du traitement du diabète, et ont donné l'espoir que cette stratégie pourrait devenir éventuellement un traitement chez l'homme (30).

Nos soucis :

Nous n'avons pas réussi un contrôle métabolique suffisant chez le rat diabétique par des greffes d'ilots pancréatiques implantés dans la veine porte (3 500 ilots), sous la capsule rénale (1 500 ilots) ou dans le thymus (1 500 ilots)

Les principales causes d'échec de la greffe d'ilots pancréatiques rapportées dans la littérature sont

nombre d'ilots insuffisant une étude chez le chien fait état d'un nombre minimum de 3 à 5000 ilots/kg

ischémie prolongée altérant probablement le taux de survie des ilots; insuffisance de la purification du tissu transplanté, c'est à dire contamination du tissu endocrine par le tissu exocrine responsable

d'une stimulation de la réponse immunitaire et aussi d'une destruction inflammatoire non spécifique :

la toxicité pour les îlots de l'hyperglycémie existant immédiatement après l'implantation : malgré une insulinothérapie exogène entourant la greffe, nous n'avons pas obtenu d'ambiance glycémique favorable à la prise d'îlots.

Nous pensons que toutes ces causes sont partiellement présentes dans notre travail et que ce point doit être très amélioré.

Greffe de pancréas :

En général :

a) Chez l'homme :

Les greffes segmentaires hétérotopiques sont les plus couramment réalisées mais la greffe de pancréas entier, avec ou sans segment duodénal, trouve actuellement un regain d'intérêt. Les greffes orthotopiques restent l'exception.

Le point essentiel de discussion chirurgicale est l'attitude face à la sécrétion exocrine. Les techniques les plus utilisées sont l'injection de polymère, le drainage urinaire et le drainage entérique.

L'écueil du rejet reste au premier plan. Il doit être traité rapidement pour préserver les îlots. Le diagnostic précoce est mal aisé et plusieurs moyens ont été proposés : dosage de l'amylasurie lorsque le drainage exocrine est assuré dans les voies urinaires, biopsie lorsqu'il se fait dans l'estomac. Lorsqu'il y a une greffe rénale couplée, la détérioration du rein serait un bon indice mais il est possible que les rejets surviennent séparément. Un régime immuno-suppresseur efficace reste à établir.

La durée maximale de conservation du greffon avant greffe est encore incertaine. La plupart des équipes s'attachent à la limiter à 6 heures.

Actuellement dans les meilleurs équipes, la survie du greffon à 1 an est environ de 50% et celle du patient de 90%. Ceci est très supérieur aux chiffres d'il y a une décennie mais reste encore très insuffisant.

b) Chez le rat :

De nombreuses techniques ont été rapportées : elles diffèrent par la masse de tissu greffé, l'attitude face à la sécrétion exocrine, et le mode d'anastomose vasculaire () : les résultats dépendent plus de l'entraînement micro-chirurgical que du choix des techniques.

Nos succès :

Nous avons choisi par notre protocole le greffe hétérotopique de pancréas total avec drainage veineux périphérique sur la veine cave, qui donne de très bons résultats cliniques.

Nous nous sommes entraînés au prélèvement du pancréas. Lors de 10 pancréatectomies totales, la dissection nous a paru très difficile, supérieure à 3 heures, la difficulté majeure résidait dans la ligature un à un des petits vaisseaux pancréatico-duodénaux, toute imperfection entraînant une hémorragie impossible à contrôler par électrocoagulation. Aucun donneur n'est décédé avant la fin de la pancréatectomie, et on a réussi à obtenir 10 greffons de bonne qualité. Nous avons pu ensuite réduire la durée de la pancréatectomie à moins de 2 heures.

Nous nous sommes entraînés aussi à la greffe pancréatique. Nous avons toujours utilisé un receveur diabétique, qui est moins résistant à la chirurgie, pour avoir un modèle plus proche de la réalité de notre protocole. Nous avons pratiqué 10 greffes pancréatiques, toujours avec ligature du canal pancréatique pour seulement l'entraînement à la réalisation des anastomoses vasculaires qui est déjà une procédure très longue. Les cinq premiers receveurs sont

décédés lors du declampage par grosse hémorragie. Les deux suivants sont décédés 24 heures après la chirurgie et les trois derniers sont restés vivants jusqu'au rejet. Nous avons pu constater qu'en cas de ligature du canal pancréatique on trouvait une importante dilatation kystique intra-parenchymateuse avec destruction de quasi la totalité du tissu exocrine et endocrine: nous avons donc décidé d'assurer le drainage exocrine par une anastomose termino-latérale du segment duodénal du donneur à la troisième portion duodénale du receveur. Nous avons réussi dans les groupes 1, 2 et 3 cette modalité de transplantation avec des complications minimales, et nous n'avons plus trouvé de dilatation du canal pancréatique après le drainage. La mise au point finale de cette technique nous a donc permis d'obtenir constamment une guérison du diabète induit par la streptozocine chez le rat dans tous nos groupes expérimentaux d'iso ou d'allogreffe.

Induction de tolérance par greffe intra-thymique :

a) Généralités :

Il existe de nombreuses manières d'induire des tolérances en agissant sur le receveur (irradiation, transfusion, médicaments...) ou le donneur (immunoalteration...).

La greffe intra-thymique a été plus récemment proposée. Dans son principe, l'injection d'allo-antigènes dans le thymus, alors que les lymphocytes circulants ont été détruits par une dose unique de sérum anti-lymphocytaire, permet la maturation de nouveaux lymphocytes au contact de ces allo-antigènes qui sont alors reconnus comme "self", au même titre par exemple que l'établissement de la reconnaissance du soi pendant la vie fœtale.

b) Etat actuel d'avancement :

Cette induction de tolérance a d'abord été obtenue pour et par des îlots pancréatiques chez le rat(31). Elle a été ensuite réussie chez le rat également pour le rein organe à l'aide de glomérules (32). Plus récemment des cellules spléniques ou de moelle osseuse ont été utilisées comme source d'antigènes inducteurs. Un travail chez le rat a également permis l'induction de tolérance pour le coeur .

c) Les raisons de notre protocole :

Les premières échecs de cette stratégie ont également été rapportés . La xenogreffe d'îlots de porc chez le rat n'a pas permis la tolérance ultérieure d'îlots porcins cryoconservés du même donneur. Dans l'optique d'une application clinique chez l'homme, des questions brûlantes se posent. Quels antigènes et quelle quantité d'antigènes sont nécessaire pour induire cette tolérance ? Est-elle "universelle": une source unique d'antigènes (cellules spléniques) peut elle induire cette tolérance pour tous les organes (rein, coeur, foie, pancréas...) ? Cette induction est-elle possible pour toutes les espèces, notamment les gros mammifères . ou est elle limitée aux rongeurs ? Peut-on dépasser le stade des allogreffes et obtenir des xenogreffes tolérées. Encouragés par le travail sur les glomérules permettant une induction de tolérance pour le rein organe entier, nous avons voulu voir si de simples îlots (unité antigénique restreinte) pourraient induire une tolérance pour le complexe pancreas organe (îlots + exocrine + vaisseaux + canaux...), la stratégie de greffe d'organe pancréatique étant actuellement assez efficace métaboliquement chez l'homme

d) Etat d'avancement actuel et réponse partielle :

Alors qu'après une relativement courte période de mise au point, nous greffes de glande pancréatique chez le rat diabétique étaient suivies

d'un succès constant. si nos greffes d'îlots ont toujours été accompagnées d'une amélioration notable de l'état général, nous n'avons pas réussi des greffes suivies de normalisation métabolique significative.

Ceci pourrait être du à la quantité des îlots injectés, mais nous pouvons garantir un chiffre minimum de 1 500 îlots par greffe. Ce chiffre est peut-être insuffisant, des quantités de 3 à 5 000 îlots nécessaire ont été récemment rapportées.

La qualité des îlots peut aussi être responsable. Histologiquement, l'aspect des nos îlots isolés s'est révélé constamment adéquat mais ceci est un critère insuffisant de viabilité (Photo 39). Dans quelque cas, nos îlots ont été étudiés en incubation à 37°C, 5% de CO₂ dans l'air, à bas glucose (5 mmol, 30 minutes) et haut glucose (25 mmol, 30 minutes). Dans la majorité des cas une réponse satisfaisante en insulino-sécrétion a été obtenue. Néanmoins, même si le laboratoire possède depuis longtemps la technique d'isolement, cette méthode reste aléatoire et des lots entiers d'îlots peuvent se révéler inefficaces. Il est sûrement souhaitable de vérifier pour chaque lot, la viabilité par l'étude de l'insulino-sécrétion.

La purification des îlots est importante, des contaminants exocrines par exemple, facilitant la destruction non spécifique de l'endocrine. Nos préparations récentes étaient 80% pures, chiffre qu'il est difficile d'améliorer.

Divers sites ont déjà été proposés pour l'injection des îlots dans le cadre de greffes banales : la rate, la veine porte, le rein. Néanmoins quelques essais témoins dans d'autres sites que le thymus (rein, veine porte) ne nous ont pas apporté de résultats plus satisfaisants. Il n'en reste pas moins que la greffe d'îlots intra-thymique est particulièrement difficile et a nécessité une longue période de mise au point. Même actuellement nous ne pouvons garantir que la quantité

d'îlots intra-thymique soustraite est obtenue à chaque fois. Des fuites sont possibles malgré l'oblitération du point d'injection. L'étude histologique exhaustive des greffons thymiques injectés a montré les aléas de la technique avec une présence souvent insuffisante d'îlots. De plus ceux-ci se trouvaient trop souvent dans des anfractuosités inter-lobulaires et pas dans le cortex thymique lui-même (Photo 40). Néanmoins c'est aussi à de nombreuses reprises que nous avons observé des îlots vivants allogéniques dans le thymus après deux semaines. Cette implantation reste à améliorer.

Plusieurs autres facteurs sont possiblement en cause. Par exemple la survie d'allo-antigènes intra-thymiques en quantité limitée que nous avons obtenue peut être insuffisante en présence de la forte hyperglycémie persistant après une greffe de tissu en quantité et en qualité insuffisante. L'hyperglycémie inhiberait de façon fonctionnelle l'induction de cette tolérance.

A ce jour, il n'a pas été possible d'accomplir la deuxième partie du protocole sur la spécificité de l'induction en démontrant son inefficacité pour un autre donneur allogénique. Globalement l'hypothèse d'une induction de tolérance pour un pancréas organe par des îlots intra-thymique préalables du même donneur dans un modèle allogénique chez le rat ne peut être rejetée en raison de l'état actuel d'avancement de notre travail. Nous devons réussir au même titre que nos greffes pancréatiques, des greffons d'îlots intra-thymiques qui seraient à la fois efficaces métaboliquement et de plus susceptibles d'induire une tolérance.

CONCLUSION

Le diabète insulino - dépendant touche environ 150 000 patients en France, avec près de 3 000 nouveaux cas annuellement. La qualité de vie de ces patients est réduite, les complications microangiopathiques ont une morbidité extrême, source d'insuffisance rénale et de cécité. Au moins ces dernières complications sont très dépendantes du contrôle glycémique qui reste, plus de 60 ans après la découverte de l'insuline, difficile et fastidieux à obtenir avec des injections même multiples sur les 24 heures.

Quand un organe est détruit il est logique de vouloir le remplacer par l'organe homologue donc ici le pancréas

Seuls les îlots étant détruits dans le diabète insulino-dépendant commun auto - immun, c'est leur seul remplacement qui est peut - être, le traitement le plus physiologique et le plus logique.

La greffe d'îlots pancréatiques a de nombreuses potentialités (plusieurs sites d'implantation possibles, cryoconservation, culture, évaluation qualitative...) son essor est pour l'instant freiné par l'inconstance des succès métaboliques bien que des guérisons viennent d'être rapportées ces deux dernières années. La greffe d'organe pancréatique est plus souvent métaboliquement active et la morbidité chirurgicale persistante est en régression. Ces deux allogreffes, îlots et pancréas, partagent la même nécessité d'une immunosuppression "lourde". Si celle-ci est acceptée sans reticence dans le cadre de maladies mortelles à court terme (cardiaque ou hépatique), il en va très différemment du diabète qui n'est pas du tout une maladie à risque vital immédiat et où un traitement, l'insuline, même imparfait existe. Il est donc tout à fait licite de poser le problème en terme de risques de l'immunosuppression avec de plus des succès aléatoires de la greffe versus traitement traditionnel. En fait

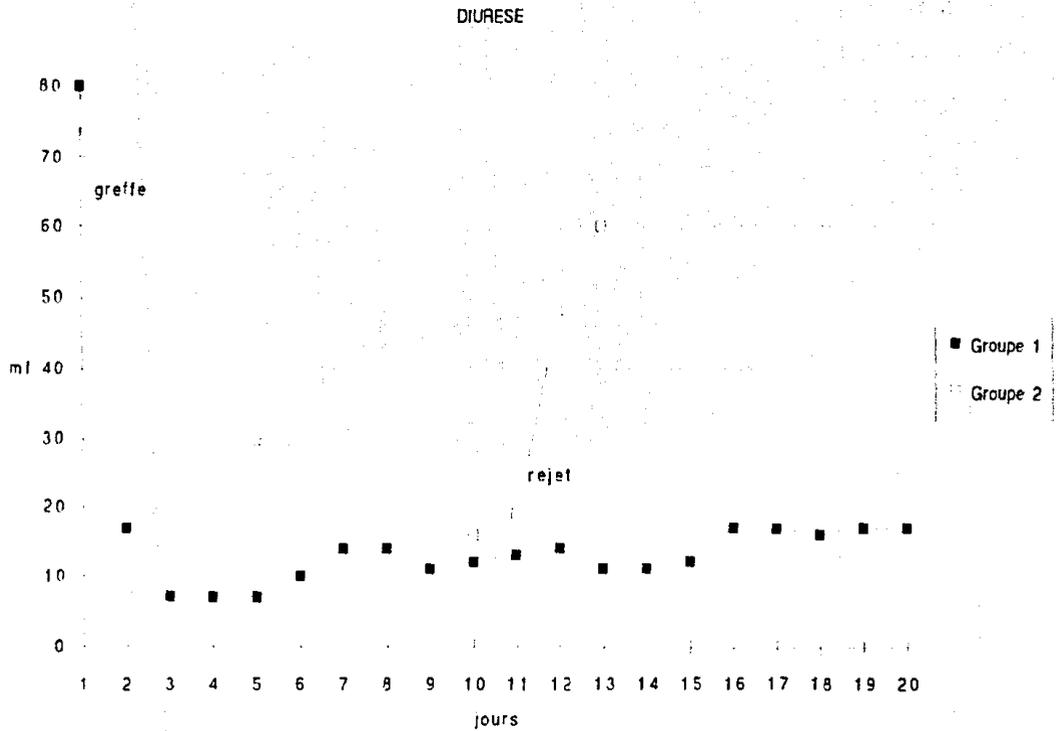
actuellement la communauté scientifique n'est prête à accepter la greffe comme traitement du diabète sucré que si l'immunosuppression est sans danger (émergence de nouvelles drogues) ou supprimée : immunoaltération, immunoprotection ou induction de tolérance.

La greffe d'îlots pancréatiques intra-thymique chez le rat induirait une tolérance donneur spécifique pour les îlots qui peuvent alors être greffés sans immunosuppression en un site quelconque du receveur. Si cette hypothèse a un caractère général, elle pourrait révolutionner la stratégie des greffes : quelques allo (ou xeno) antigènes d'une cellule souche greffés dans le thymus, induirait pour toutes les espèces, homme compris, et avec tous les croisements possibles, une tolérance pour tous les organes (33); quelques cellules spléniques d'un primate dans le thymus d'un humain permettrait à ce dernier de recevoir sans immunosuppression une greffe de cœur du même donneur...

Dans la mesure où la greffe de pancréas est actuellement, nous l'avons vu, plus souvent métaboliquement active que celle des îlots, nous avons cherché à étendre l'hypothèse initiale d'induction de tolérance au pancréas entier, porteur de motifs antigéniques plus complexes que les îlots seuls.

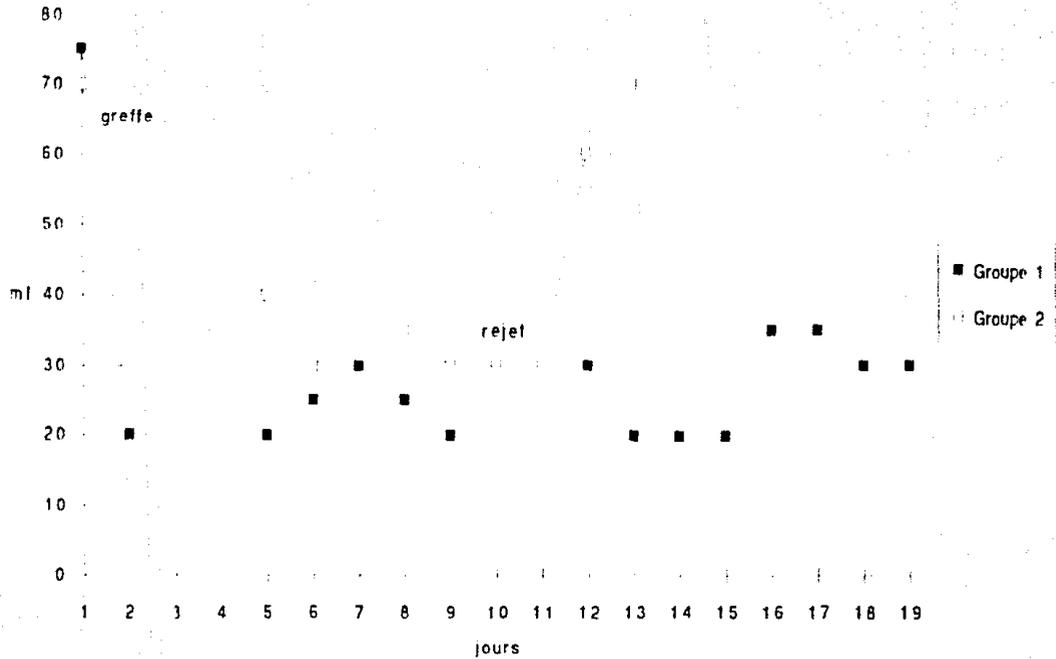
Notre modèle de rat diabétique a été rapidement au point. Le prélèvement du pancréas suivi de sa greffe, avec succès métaboliques constants, malgré sa réputation de difficulté, a été réussi sur un grand nombre de cas. Notre méthode d'isolement d'îlots nous a permis d'obtenir des îlots viables en grande quantité. De façon inattendue nous avons eu les plus grandes difficultés à obtenir des succès métaboliques prolongés avec nos greffes d'îlots intra-thymiques, si bien que nos tentatives d'induction de tolérance prolongée sont actuellement limitées par cette difficulté d'obtention de succès des greffes d'îlots intra-thymiques même si nous obtenons déjà constamment des îlots allogéniques en ce site viables sur une longue

durée. L'hypothèse d'une induction de tolérance chez le rat par des flots intra - thymiques pour un pancréas hétérotopique n'est donc nullement rejetée mais demandera encore quelques temps de mise au point. Ce travail nous a d'ors et déjà permis d'obtenir plusieurs succès au premier desquels se situe l'allogreffe de pancréas métaboliquement active chez le rat diabétique.



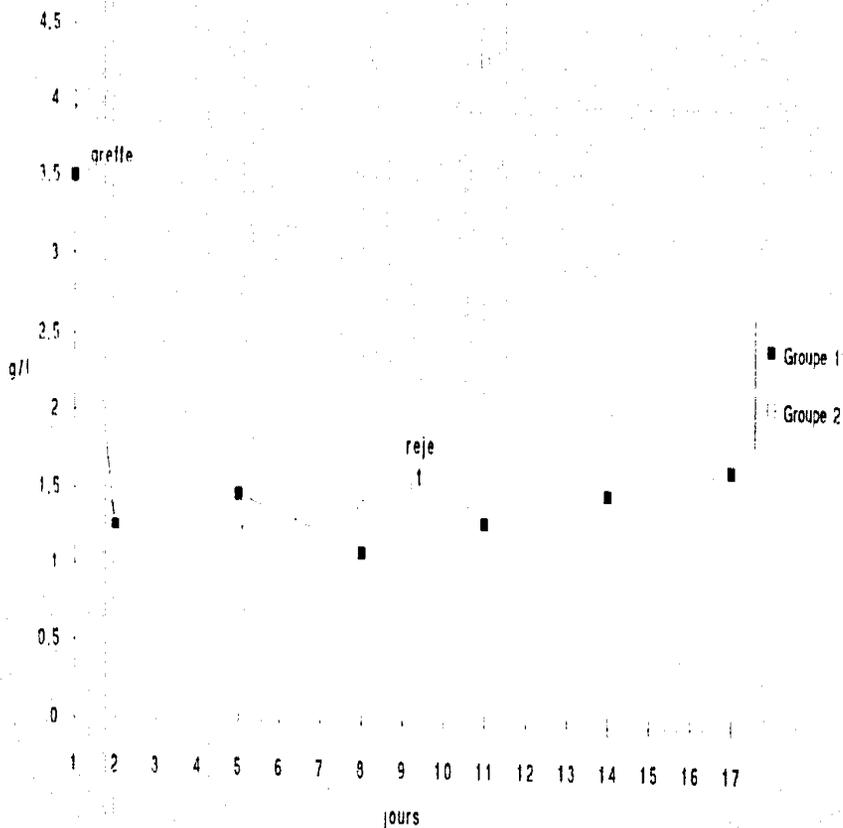
Graphique 1: Diurèse groupes 1 et 2.

CONSOMMATION D'EAU



Graphique 2. Consommation d'eau groupes 1 et 2.

GLYCEMIE



Graphique 3 : Glycémie groupes 1 et 2

BIBLIOGRAPHIE :

- 1.- Borch - Johnsen (K.), Kreiner (S.), Deckert (T.). Mortality of type 1 (insulin - dependent) diabetes mellitus in Denmark : a study of relative mortality in 2 930 danish type 1 diabetic patients diagnosed from 1933 to 1972. *Diabetologia* 1986. 29. 767 - 772.
- 2.- Pirart (J.), Diabetes mellitus and its degenerative complications : a prospective study of 4 400 patients observed between 1947 and 1973. *Diabetes Care* 1978. 1. 168 - 188. 252 - 263.
- 3.- Tchobroutsky (G.). Relation of diabetic control to development of microvascular complication. *Diabetologia* 1978. 15. 143 - 152.
- 4.- Mirouze (J.). Un siècle à la recherche d'une insulinothérapie supplétive idéale (1889 - 1988). *Journées Diabétologie Hôtel - Dieu. Flammarion Médecine - Sciences* 1988. 315 - 336.
- 5.- Timsit (J.), Altman (J.J.). Indications des transplantations pancréatiques : réalités et espoirs. *Journées de Diabétologie Hôtel - Dieu. Flammarion Médecine - Sciences* 1989. 139 - 149.
- 6.- Zheng T., Schang T., Sutherland D.E.R. Monitoring of urinary amylase and pH after pancreas transplantation in rats. *Transplantation Proceedings*. Vol XIX. No 5 (October), 1987: pp 3906 - 3907.
- 7.- Schang T., Zheng T.L., Sutherland D.E.R. Monitoring urinary amylase and pH in pancreas transplantation with urinary drainage in rats. *Transplantation*. Vol 46 No. 6. (December) 1988: pp 806 - 812.
- 8.- Kelly W.D., Lillehei R.C. et al. Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery* 1967. Vol. 61. No. 6. 827 - 837.
- 9.- Altman J.J., Reach G., Slama G., Tchobroutsky G. Y a - t - il des indications de greffe du pancreas ? *Ann. Méd. Interne*. 1990. Vol 141. No 1. pp 8 - 10
- 10 - Sutherland D.E.R., Moudry K.C. Pancreas transplant registry Philadelphia . Saunders W B . 1988 : 357 - 362
- 11.- Martin X., Lefrançois N., Marechal J.M., Gelet A., Viguier J.L., Dubernard J.M. Pancreas transplantation in Lyon : overall results. *Diabetologia*. Vol 34 Suppl. 1. pp S8 - S10 (1991) SIM 12976

- 12.- Lefrançois N., Martin X., Dubernard J.M. Transplantation du pancréas. Traité de diabétologie 1er édition 1990, éditions Pradel. Chapitre 73E. pp 847 - 850.
- 13.- Altman J.J., Houlbert D., Callard P., et al. Long terme plasma glucose normalization in experimental diabetic rats with macroencapsulated implants of benign human insulinoma. Diabetes 1986 ; 35 : 625 - 33.
- 14.- Altman J.J., Penforinis A., Boillot J., Maletti M. Bioartificial pancreas in autoimmune nonobese diabetic mice. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs. 1988 ; 34 : 247 - 9.
- 15.- Legrelle M., Capron F., Chapa O., Altman J.J. Islets and hepatocytes co - transplantations in hollow fibers. Artificial insulin delivery systems. Pancreas and islet transplantation. 11th Workshop of the AIDSPIT study group. January 1992. Igls. Austria.
- 16.- Altman J.J., Legrelle M., Penforinis A., Fakir M., Chapa O., Mallegol S., Capron F. Macroencapsulation as a bioartificial pancreas. Pancreatic Islet transplantation, RG Landes Company, Medical Publishers, edited by Camillo Ricordi, Austin/Berlin, 1992.
- 17.- Darquy S., Reach G. Immunoisolation of pancreatic β cells by microencapsulation : an in vitro study. Diabetologia 1985 ; 28 : 776 - 80.
- 18.- Lafferty K.J., Prowse S.J. Theory and practice of immunoregulation by tissue treatment prior to transplantation. World J Surg. 8, 187 - 195. 1984
- 19.- Posselt A.M., Ali Naji B.S., Roark J.H., James B.S., Markmann F., Barker C.F. Intrathymic islet transplantation in the spontaneously diabetic BB rat. Ann. Surg. October 1991, Vol 214 , No. 4 . pp 363 - 373.
- 20.- Gotoh M., Maki T., Kiyozumi T., Satomi S., et al. An improved method for isolation of mouse pancreatic islet. Transplantation 1985 ; 40 : 437 - 438).
- 21.- Orloff M.J., Sun Lee., Charters A.C., Grambolt D.E., Storck L.G., Knox D. Long term studies of pancreas transplantation in experimental diabetes mellitus Ann Surg 1975; 182, 3, 198 - 205.
- 22.- Squifflet J.P., Sutherland D.E.R. et al. Technical aspects of segmental pancreatic grafting in rats Microsurgery 1983, 4, 61 - 66.

- 23.- Daude F. Transplantation hétérotopique de pancreas total chez le rat. Memoire pour le diplome universitaire de techniques microchirurgicales. Mai 1990.
- 24.- Lugagne - Delpon P.M. La transplantation de pancreas chez le rat diabétique. Memoire pour le concours de medaille de l'internat des hôpitaux de Paris. Jan 1987
- 25.- Houry S., Huguier M. Total splenopancreatectomy in the rat. Technical report. Eur. Surg. Res., 1983, 15, 328 - 331.
- 26.- Schein P.S. Alberti KGGM et Williamson D.H. Effects of streptozotocin on carbohydrate and lipid metabolism in the rat. Endocrinology. 1971, 89, 827 - 834.
- 27.- Lacy P.E., Kostianovsky M. Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes 1976; 18 : 35 - 8.
- 28.- Gotoh M., Maki T., Satomi S., et al. Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. Transplantation 1987 43 : 725 - 30).
- 29.- Barneo L., Esteban M.M. Diaz F. et al. Comparison of various techniques for rat islet preparation. Transplantation Proceedings. Vol. 22, No 2, April 1990 pp 777 - 778.
- 30.- Arbet - Engels C. L'isolement d'îlots de Langerhans : premiere étape avant la greffe. Thèse pour le doctorat de médecine (1992).
- 31.- Posselt A.M., Barker C.F., Ali Naji et al. Induction of donor - specific unresponsiveness by intra - thymic islet transplantation. Science. Vol 249, September 1990 pp 1293 - 1295.
- 32.- Remuzzi G., Rossini M., Imberti O., Perico N. Kidney graft survival in rats without immunosuppressants after intrathymic glomerular transplantation. The Lancet Vol 337, March 1991: pp 750 - 752
- 33 - Lanza R.P., Butler D.H. Chick W.L. et al. Xenotransplantation of canine bovine and porcine islets in diabetic rats without immunosuppression. Proc Natl Acad Sci. USA. Vol. 88. pp 11100 - 11104 December 1991 Medical Sciences