

## THÈSE

Pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS  
UFR de médecine et de pharmacie  
Ischémie reperfusion en transplantation d'organes mécanismes et innovations thérapeutiques -  
IRTOMIT (Poitiers)  
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)  
Secteur de recherche : Biomolécules, Pharmacologie, Thérapeutique

Présentée par :  
Abdelsalam Kasil

### **Impact de l'oxygénation active et d'un transporteur d'oxygène durant la conservation des greffons rénaux sur machine de perfusion avant transplantation**

Directeur(s) de Thèse :  
Thierry Hauet, Lionel Badet, Celine Auxenfans

Soutenue le 10 décembre 2018 devant le jury

#### Jury :

Président	<b>Gilles Blancho</b>	Professeur et praticien hospitalier, Université de Nantes
Rapporteur	<b>René Ferrera</b>	Ingénieur de recherche, INSERM, Université de Lyon
Rapporteur	<b>Marc-Olivier Timsit</b>	Professeur et praticien hospitalier, Université Descartes, Paris
Membre	<b>Thierry Hauet</b>	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers
Membre	<b>Lionel Badet</b>	Professeur, Université Claude Bernard, Lyon
Membre	<b>Denis Angoulvant</b>	Professeur et praticien hospitalier, Université de Tours
Membre	<b>Antoine Thierry</b>	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers
Membre	<b>Christophe Jayle</b>	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers

#### **Pour citer cette thèse :**

Abdelsalam Kasil. *Impact de l'oxygénation active et d'un transporteur d'oxygène durant la conservation des greffons rénaux sur machine de perfusion avant transplantation* [En ligne]. Thèse Biomolécules, Pharmacologie, Thérapeutique. Poitiers : Université de Poitiers, 2018. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

# THESE

Pour l'obtention du Grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine et Pharmacie)  
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale : BioSanté N° 524

Secteur de Recherche : Biomolécules, Pharmacologie, Thérapeutique

Présentée par :

**Abdelsalam KASIL**

\*\*\*\*\*

### **IMPACT DE L'OXYGENATION ACTIVE ET D'UN TRANSPORTEUR D'OXYGENE DURANT LA CONSERVATION DES GREFFONS RENAUX SUR MACHINE DE PERFUSION AVANT TRANSPLANTATION**

\*\*\*\*\*

**Directeurs de Thèse :** Professeur Thierry HAUET  
Professeur Lionel BADET  
Docteur Céline AUXENFANS

\*\*\*\*\*

Soutenue le 10 décembre 2018  
devant la Commission d'Examen

\*\*\*\*\*

### **JURY**

Dr. René FERRERA	Rapporteur
Pr. Marc-Olivier TIMSIT	Rapporteur
Pr. Denis ANGOULVANT	Examineur
Pr. Gilles BLANCHO	Examineur
Pr. Christophe JAYLE	Examineur
Pr. Antoine THIERRY	Examineur
Pr. Lionel BADET	Directeur de thèse
Pr. Thierry HAUET	Directeur de thèse
Dr. Céline AUXENFANS	Directeur de thèse

## Remerciements

D'abord, je remercie **Monsieur René FERRERA** et **Monsieur Marc-Olivier TIMSIT** pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je remercie également **Monsieur Denis ANGOULVANT**, **Monsieur Gilles BLANCHO**, **Monsieur Christophe JAYLE** et **Monsieur Antoine THIERRY** pour avoir accepté d'être examinateurs de mon travail de thèse.

Je tiens de remercier sincèrement **Monsieur Lionel BADET** qui m'a donné l'occasion de découvrir le domaine de recherche en transplantation et m'a soutenu et dirigé dans ce domaine scientifique important.

Je remercie sincèrement **Monsieur Thierry HAUET**, le directeur de l'unité INSERM 1082, de m'avoir accueilli et fait confiance et d'avoir mis à ma disposition les moyens de l'unité pour réaliser ce travail.

Je remercie également **Madame Céline AUXENFANS**, merci Céline pour toutes les manipulations que j'ai apprises à ton service à Lyon et pour corriger le manuscrit.

Je remercie particulièrement **Monsieur Sébastien GIRAUD**. Merci mon ami et mon encadrant, Séb pendant ces années de thèse, pour toutes les manipulations, tes conseils et ton aide pour la correction de thèse.

Je remercie également **Monsieur Raphaël THUILLIER**. Merci Raph pour tes conseils scientifiques et tes commentaires et la correction de thèse.

Je remercie **Madame Sandrine JOFFRION** et **Madame Virginie AMETEAU**. Merci les filles pour toutes les manipulations que nous avons faites ensemble.

Je remercie également tous mes collègues au sein d'U1082 : Thomas, Ophélie, Delphine, Nadège, Maïté, Ludovic, Sonia, Clara, Patrick et Jaques.

Je remercie aussi notre assistante de gestion : **Madame Christine CHALEROUX** qui m'a aidé beaucoup pour finir les papiers administratifs.

Je remercie l'équipe INRA de la plateforme IBiSA du domaine le Magneraud, **Monsieur William HEBRARD**, **Monsieur Pierre COUTURIER**, **Madame Irène LAUNAY** et **Monsieur Joris RAMALINGOM** pour leurs patience, leurs gentillesse et le plaisir que j'ai eu travailler en leur compagnie durant ces années d' recherche expérimentale.

Je remercie l'équipe du service d'urologie à l'hôpital Edouard Herriot, en particulier le **Dr. Xavier MATILLON** et le **Dr. Ricardo CODAS**.

Je remercie la Fondation CENTAURE pour le soutien financier.

Je remercie mes amis **Dr. Suleman Elmadane** et **Dr. Hatim Aljaroushi** pour leurs soutiens.

Je remercie mes collègues des urologues à Alhawari hospital à Benghazi en particulier Dr. Younis Elbishari, Dr. Faraj Elobeidi, Dr. Raouf ELkawafi, Dr. Abdallah Eltabbal, Dr. Khaled Darraz et Dr. Mohammed Attia.

Merci à **mon père** de tes prières et ton soutien.

Merci **Wesal**, ma chérie épouse, de ton aide et ton encouragement.

Merci à **Hamouda** et à **Miral**, mes enfants.

## Acknowledgments

I would like to thank **Mr. Rene FERRERA** and **Mr. Marc-Olivier TIMSIT** for having accepted to be rapporteur of this work.

I also would like to thank **Mr. Denis ANGOULVANT**, **Mr. Gilles BLANCHO**, **Mr. Christophe JAYLE** and **Mr. Antoine THIERRY** for having accepted to be examiners of my work of thesis.

I would like to sincerely thank **Mr. Lionel BADET** who gave me the opportunity to discover transplant research field and he supported and directed me in this important scientific field.

I sincerely thank **Mr. Thierry HAUET**, the director of the INSERM U1082, for having welcomed and trusted me and for having put at my disposal the resources of the unit to carry out this work.

I also thank **Mrs. Céline AUXENFANS**, thank you Céline for all the manipulations that I learned in your department in Lyon and to correct the manuscript.

Especial thanks to **Mr. Sébastien GIRAUD**. Thank you my friend and my supervisor, Séb, during these years of thesis, for all the manipulations, your advice and your help for the thesis correction.

I also thank **Mr. Raphaël THUILLIER**. Thank you Raph, for your scientific advices, your comments and thesis correction.

I thank **Mrs. Sandrine JOFFRION** and **Mrs. Virginie AMETEAU** for all the manipulations we had done together.

I also thank all my colleagues at U1082: Thomas, Ophélie, Delphine, Nadège, Maïté, Ludovic, Sonia, Clara, Patrick and Jacques.

I also thank our management assistant: **Mrs. Christine CHALEROUX** who helped me a lot to finish the paperwork.

I thank the team of the IBiSA platform of INRA the domain Magneraud, **Mr. William HEBRARD, Mr. Pierre COUTURIER, Mrs. Irene LAUNAY and Mr. Joris RAMALINGOM** for their patience, their kindness and the pleasure that I had working with them during these years of experimental research.

I thank the team of urology department at Edouard Herriot hospital, especially, **Dr. Xavier MATILLON and Dr. Ricardo CODAS.**

I thank the **CENTAURE Foundation** for the financial support.

I thank my friends **Dr. Suleman Elmadane and Dr. Hatim Aljaroushi** for their support.

I thank my colleague's urologists to Alhawari hospital in Benghazi in especially Dr. Younis Elbishari, Dr. Faraj Elobeidi, Dr. Raouf ELkawafi, Dr. Abdallah Eltabbal, Dr. Khaled Darraz and Dr. Mohammed Attia.

Thank you to my father for your prayers and your support.

Thank you, Wesal, my darling wife, for your help and encouragement.

Thank you to Hamouda and Miral, my children.

# **TABLE DES MATIERES**

## Table des matières

Liste des figures.....	9
Abréviations .....	12
Résumé.....	16
Abstract .....	17
1. Introduction.....	19
1.1. Anatomie et Physiologie du rein .....	19
1.1.1. Anatomie macroscopique .....	19
1.1.2. Anatomie microscopique .....	20
1.1.3. Fonction rénale .....	21
1.2. Insuffisance rénale chronique et terminale .....	21
1.3. Transplantation rénale en France .....	22
1.4. Type de donneurs.....	24
1.4.1. Donneur Vivant.....	24
1.4.2. Donneur décédé en état de mort encéphalique .....	25
1.4.3. Donneur marginal.....	27
1.4.3.1. Donneur décédé en état de mort encéphalique à critères étendus.....	28
1.4.3.2. Donneur décédé après un arrêt circulatoire .....	28
1.5. Conservation du rein .....	30
1.5.1. Conservation statique .....	31
1.5.2. Conservation avec machine de perfusion .....	33
1.6. Syndrome de l'ischémie-reperfusion .....	39
1.6.1. Lésions d'ischémie.....	43
1.6.2. Lésions de reperfusion .....	45
1.7. Comment éviter les lésions d'I/R : Oxygénation pendant la conservation .....	47
1.7.1. Les nouvelles machines avec oxygénation active .....	47
1.7.2. L'apport passif d'oxygène dans la machine actuelles non-oxygénées : le transporteur d'oxygène .....	50
2. But du projet .....	56
3. Méthode et Matériels .....	58
3.1. Animaux.....	59
3.2. Protocole d'anesthésie.....	60
3.3. Protocole chirurgical .....	62
3.3.1. Mise en place un cathéter jugulaire externe gauche.....	62
3.3.2. Prélèvement du rein gauche après une heure d'ischémie chaude.....	63
3.3.3. Auto-transplantation.....	64

3.4.	Suivi post-opératoire .....	66
3.5.	Sacrifice .....	68
3.6.	Paramètres de surveillance cliniques et biologiques .....	68
3.5.1.	Analyses biochimiques .....	68
3.5.2.	Analyses histopathologiques.....	70
3.5.3.	Analyses protéomiques .....	73
3.7.	Analyses statistiques .....	77
4.	Résultats .....	80
4.1.	Paramètres de perfusion .....	80
4.1.1.	Pression systolique .....	80
4.1.2.	Pression diastolique .....	82
4.1.3.	Débit de perfusion.....	83
4.1.4.	Résistance rénale.....	84
4.2.	Évaluation de la reprise de diurèse .....	86
4.3.	Évaluation des biomarqueurs de lésions rénales durant la première semaine post-transplantation.....	87
4.4.	Évaluation des biomarqueurs de fonction rénale post-transplantation.....	95
4.5.	Évaluation des lésions 3 mois post-transplantation.....	100
4.5.1.	Lésions d'inflammation 3 mois post-transplantation.....	101
4.5.2.	Lésions de fibrose à 3 mois post-transplantation .....	107
4.6.	Marqueur de fonction rénale à 3 mois post-transplantation .....	116
5.	Discussion .....	120
6.	Limites de l'étude .....	128
7.	Conclusion et Perspectives.....	131
8.	Bibliographies .....	133
9.	Publication.....	146

## Liste des figures

Figure 1: Structure du rein (coupe sagittale) .....	19
Figure 2: Représentation schématique d'un néphron et des capillaires péri-tubulaires .....	20
Figure 3: Schéma récapitulatif de la prise en charge de l'IRCT en France en 2016, par le Registre français des traitements de suppléance de l'insuffisance rénale chronique. DP : dialyse péritonéale, DV : donneur vivant, pmh : par million d'habitants.....	22
Figure 4: Évolution de l'âge des sujets en état de mort encéphalique par l'ABM .....	27
Figure 5: Machine de perfusion inventée par Charles Lindbergh (National Museum of American History) .....	34
Figure 6: Machine de Belzer utilisée en Californie dans les années 1960 .....	35
Figure 7: Différents modèles de machine de perfusion. (A) : TM®, (B) : RM3®, (C) : WAVES®, (D) : Lifeport® kidney transporter, (E) : Kidney Assist® .....	37
Figure 8: Principaux mécanismes lésionnels au cours de l'IR .....	40
Figure 9: Machine de perfusion WAVES® .....	49
Figure 10: La cassette WCM .....	49
Figure 11: Courbes d'équilibre de l'oxygène représentant des transporteurs d'oxygène par rapport aux globules rouges humains. $\alpha\alpha$ -Hb : $\alpha\alpha$ -Hémoglobine .....	51
Figure 12: Structure d'hémoglobine du ver marin ( <i>Arenicola Marina</i> ).....	54
Figure 13: Plan expérimental de l'étude .....	59
Figure 14: Installation de l'animal en position décubitus dorsal .....	61
Figure 15: La veine jugulaire externe gauche avant (gauche) et après (droite) la mise en place du cathéter .....	62
Figure 16: Abord par voie extra-péritonéale et clampage du rein gauche .....	63
Figure 17: Lavage du rein avec la solution PERF-GEN® (gauche). Le rein fixé dans la cassette en MP WAVES® (droite).....	64
Figure 18: L'animal transplanté en cage métabolique individuelle .....	64
Figure 19: L'artère carotide interne droite avant (gauche) et après (droite) avoir mis le cathéter .....	65
Figure 20: Le greffon rénal avant (gauche) et après (droite) la déclampage des vaisseaux rénaux .....	66
Figure 21: Trans-blot® .....	75
Figure 22: ChemiDoc® MP Imaging System (Bio-Rad).....	76
Figure 23: Évolution de la pression systolique au cours de la conservation en MP WAVES® (23 h) .....	81
Figure 24: Évolution de la pression systolique au cours de la conservation en MP WAVES® représentant l'aire sous la courbe dans les différents groupes transplantés.....	81
Figure 25: Évolution de la pression diastolique au cours de la conservation en MP WAVES® (23 h) .....	82
Figure 26: Évolution de la pression diastolique au cours de la conservation en MP WAVES® représentant l'aire sous la courbe dans les différents groupes transplantés.....	83
Figure 27: Évolution du débit de perfusion au cours de la conservation en MP WAVES® (23 h) .....	84
Figure 28: Évolution du débit de perfusion au cours de la conservation en MP WAVES® représentant l'aire sous la courbe dans les différents groupes transplantés.....	84
Figure 29: Évolution de la résistance rénale au cours de la conservation en MP WAVES® (23 h).....	85
Figure 30: Évolution de la résistance rénale représentant l'aire sous la courbe au cours de la conservation en MP WAVES® (A) et à la fin de la conservation (B).....	86
Figure 31: Évolution de la reprise de diurèse de J1-J4 post-transplantation chez les animaux des différents groupes transplantés.....	87
Figure 32: Évolution des taux de LDH sérique pendant la première semaine post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux .....	88

Figure 33: Évolution des taux de LDH sérique représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux .....	89
Figure 34: Évolution des taux de NGAL pendant la première semaine post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux.....	90
Figure 35: Évolution des taux de NGAL représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux .....	90
Figure 36: Évolution des taux de KIM-1 pendant la première semaine post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux.....	91
Figure 37: Évolution des taux de KIM-1 représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux .....	92
Figure 38: Évolution des taux d'IL-18 pendant la première semaine post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux.....	93
Figure 39: Évolution des taux d'IL-18 représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux .....	93
Figure 40: Évolution des taux d'ASAT pendant la première semaine post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux.....	94
Figure 41: Évolution des taux d'ASAT représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux .....	95
Figure 42: Évolution du taux de la créatininémie pendant trois mois post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux.....	96
Figure 43: Évolution de la créatininémie représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux .....	97
Figure 44: Évolution des taux de FeNa pendant trois mois post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux .....	98
Figure 45: Évolution des taux de FeNa représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux .....	98
Figure 46: Évolution des taux de GFR pendant trois mois post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux .....	99
Figure 47: Évolution des taux de GFR représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux .....	100
Figure 48: Quantification de l'infiltration leucocytaire rénale dans les différents groupes expérimentaux. les images représentent la coloration de HES sur des coupes de cortex rénal des différents groupes expérimentaux (magnification x100).....	101
Figure 49: Evaluation de l'infiltration des mastocytes (CD117+) dans les reins de différents groupes expérimentaux. les images représentent le marquage des mastocytes infiltrés dans le cortex rénal de différents groupes expérimentaux (magnification X100) .....	103
Figure 50: Expression d'IL-10 analysée par WB à J90 post-transplantation .....	104
Figure 51: Expression de FoxP3 analysée par WB à J90 post-transplantation.....	105
Figure 52: Expression de GP91 <sup>phox</sup> analysée par WB.....	106
Figure 53: Expression de iNOS analysée par WB à J90 post-transplantation .....	107
Figure 54: Quantification de la fibrose rénale de différents groupes expérimentaux. Les images représentent la coloration de rouge Sirius du cortex rénal des différents groupes expérimentaux (magnification X100) .....	109
Figure 55: Quantification de l'expression de la vimentine dans les reins des différents groupes expérimentaux. les images représentent le marquage anti-vimentine dans le cortex rénal des différents groupes expérimentaux (magnification x100).....	110
Figure 56: Expression de MMP-2 analysée par WB à J90 post-transplantation .....	111
Figure 57: Expression de tPA analysée par WB à J90 post-transplantation.....	112

Figure 58: Expression de PAI-1 analysée par WB à J90 post-transplantation.....	113
Figure 59: Le ratio tPA/PAI-1 de différents groupes expérimentaux.....	113
Figure 60: Expression de SMAD 2/3 analysée par WB à J90 post-transplantation.....	114
Figure 61: Le ratio PSMAD3/SMAD2/3 de différents groupes expérimentaux.....	115
Figure 62: Expression de CTGF analysée par WB à J90 post-transplantation.....	115
Figure 63: Évolution de la créatininémie à J90 post-transplantation de différents groupes expérimentaux .....	117
Figure 64: Évolution de FeNa à J90 post-transplantation de différents groupes expérimentaux .....	117
Figure 65: Évolution de protéinurie/créatininurie ratio à J90 post-transplantation de différents groupes expérimentaux .....	118
Figure 66: Évolution de GFR à J90 post-transplantation de différents groupes expérimentaux.....	118

## Abréviations

### A

ABM : Agence de la biomédecine

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMP : Adénosine monophosphate

ASAT : Aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine triphosphate

AUC : Area under the curve (Aire sous la courbe)

### C

CS : Conservation Static

CTGF : Connective tissue growth factor

### D

DCD : Donation after circulatory death (Don après la mort circulatoire)

DBD : Donation after brain death (Don après la mort cérébrale)

DV : Donneur vivant

### E

ECD : Extended criteria donors (donneur à critères étendus)

EEG : Electro-encéphalographie

EMT : Endothelial mesenchymal transition

eNOS : endothelial nitric oxide synthase

### F

FDA : Food and Drug Administration (Agence américaine des produits alimentaire et médicamenteux)

FeNa : Fraction excrétée de Sodium

## **G**

GFR : Glomerular filtration rate

## **H**

Hb : Hémoglobine

HbAm : Hémoglobine du ver marin (*Arenicola Marina*)

HBOC : Hemoglobin- based oxygen carrier

HTA : Hypertension Artérielle

## **I**

IBiSA : Infrastructures en biologie santé et agronomie

IC : Ischémie chaude

ICAM-1 : Intracellular adhesion molecule-1

IF : Ischémie froide

IL-10 : Interleukine-10

IL-18 : Interleukine-18

INRA : Institut national de la recherche agronomique

INSERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale

IRCT : Insuffisance rénale chronique terminale

I/R : Lésion de l'ischémie- reperfusion

## **K**

KIM-1 : Kidney injury molecule-1

## **L**

LDH : Lactate déshydrogénase

## **M**

ME : Mort encéphalique

MMP-2 : Matrix metallo-proteinase-2

MOPICT : Modélisation préclinique- Innovation chirurgicale et technologique

MP : Machine de perfusion

mPTP : Mitochondrial permeability transition pore

## **N**

NFP : Non fonction primaire

NGAL : Neutrophil gelatinase-associated lipocalin

NK : Natural killer cell

NO : Nitrous Oxide (Oxyde d'azote)

## **P**

PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor

PFC : Perfluorocarbones

pmh : Par million d'habitant

PMNs : Cellules polymorphonuclaire

PO<sub>2</sub> : Pression d'oxygène

## **R**

ROS : Reactive oxygen species

RRF : Reprise retardée de fonction

## **S**

SD : Standard deviation (écartype standard)

SIRS : Syndrome inflammatoire de réponse systémique

## **T**

TGF- $\beta$ : Transforming growth factor beta

TNF $\alpha$  : Tumor necrosis factor

tPA: Tissue plasminogen activator

**W**

WB: Western blot

**V**

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1

## Résumé

Il est prouvé que la conservation des greffons rénaux marginaux en machine de perfusion (MP) est bénéfique. Cependant, cette méthode nécessite des améliorations afin de minimiser les lésions d'ischémie-reperfusion (I/R), par l'ajout d'oxygène et/ou d'un transporteur d'oxygène. Nous avons cherché à évaluer les effets de l'oxygénation et de l'ajout d'une hémoglobine de ver marin (HbAm) durant la perfusion rénale hypothermique avant transplantation. Nos critères de jugement étaient basés sur la reprise de fonction du greffon et sur les lésions tardives de dysfonction rénale. Nous avons utilisé un modèle porcin : les reins ont été exposés à 1h d'ischémie chaude, puis perfusés dans une MP WAVES<sup>®</sup> pendant 23h à 4°C avant autotransplantation. Quatre groupes ont été étudiés : W (MP-21% O<sub>2</sub>), W-O<sub>2</sub> (MP-100% O<sub>2</sub>), W-M101 (MP-21% O<sub>2</sub> + 2g/L HbAm), W-O<sub>2</sub>+M101 (100% O<sub>2</sub> + 2g/L HbAm), (n=6 par groupe). Les reins du groupe W-M101 ont montré un débit de perfusion plus élevé et une résistance rénale plus faible comparés aux autres groupes. Pendant la première semaine post-transplantation, les groupes W-O<sub>2</sub> et W-M101 ont montré une créatininémie significativement plus faible et un meilleur taux de filtration glomérulaire. Les niveaux circulants de KIM-1 et IL-18 étaient plus faibles dans le groupe W-M101, tandis que les niveaux de NGAL et d'ASAT étaient plus faibles dans les groupes d'oxygénation active. Trois mois post-transplantation, la fraction excrétée de sodium et le ratio protéinurie/créatininurie étaient plus élevés dans le groupe W. La créatininémie était plus faible dans le groupe W-M101. La fibrose interstitielle évaluée à 3 mois post-transplantation était plus faible dans les groupes W-M101 et W-O<sub>2</sub>+M101. Nous avons observé histologiquement que l'infiltration de mastocytes était significativement élevée dans le groupe W comparé aux autres groupes. Nous avons montré que la combinaison de 21% d'O<sub>2</sub> associé à l'hémoglobine améliore la reprise de fonction du greffon rénale.

**Mots-clés :** transplantation rénale, ischémie-reperfusion, donneurs marginaux, DCD, machine perfusion WAVES<sup>®</sup>, oxygénation active, transporteur d'oxygène, HEMO<sub>2</sub>life<sup>®</sup>, M101.

## Abstract

**Introduction:** It is proved that preservation of marginal kidney graft in machine perfusion (MP) is beneficial. However, this method requires improvement to minimize the ischemia-reperfusion injuries (IRI), as addition of oxygen and/or an oxygen carrier. We aimed to evaluate the effects of oxygenation (100% or 21%) and the addition of marine worm hemoglobin (HbAm, HEMO2life®) during hypothermic renal perfusion before transplantation. Our endpoints were based on graft function recovery and late renal dysfunction. **Method and materials:** We use a porcine model where kidneys were submitted to 1h warm ischemia, followed by WAVES® MP preservation for 23h before auto-transplantation. Four groups were studied: W (MP-21% O<sub>2</sub>), W-O<sub>2</sub> (MP-100% O<sub>2</sub>), W-M101 (MP-21% O<sub>2</sub> + hemoglobin of marine worm 2g/L), W-O<sub>2</sub>+M101 (100% O<sub>2</sub> + hemoglobin of marine worm 2g/L), (n=6 per group). **Results:** Kidneys preserved in W-M101 group showed a higher perfusion flow and lower resistance, compared to other groups. During the first week post-transplantation, W-O<sub>2</sub> or W-M101 groups showed lower blood creatinine and better glomerular filtration rate. Blood levels of KIM-1 and IL-18 were lower in W-M101 group, while blood levels of AST and NGAL were lower in groups with 100% O<sub>2</sub>. Three months after transplantation, the fractional excretion of sodium and the proteinuria/ creatininuria ratio were higher in W group. Blood creatinine was lower in W-M101 group. Interstitial fibrosis evaluated at 3 months was lower in groups W-M101 and W-O<sub>2</sub>+H. We showed that the combination 21% O<sub>2</sub> + hemoglobin improves the kidney graft outcome. **Conclusion:** We showed that the combination 21% O<sub>2</sub> + hemoglobin improved the kidney graft outcome.

**Keywords:** kidney transplantation, ischemia-reperfusion, marginal donors, DCD, machine perfusion WAVES®, active oxygenation, oxygen carrier, HEMO<sub>2</sub>life®, M101.

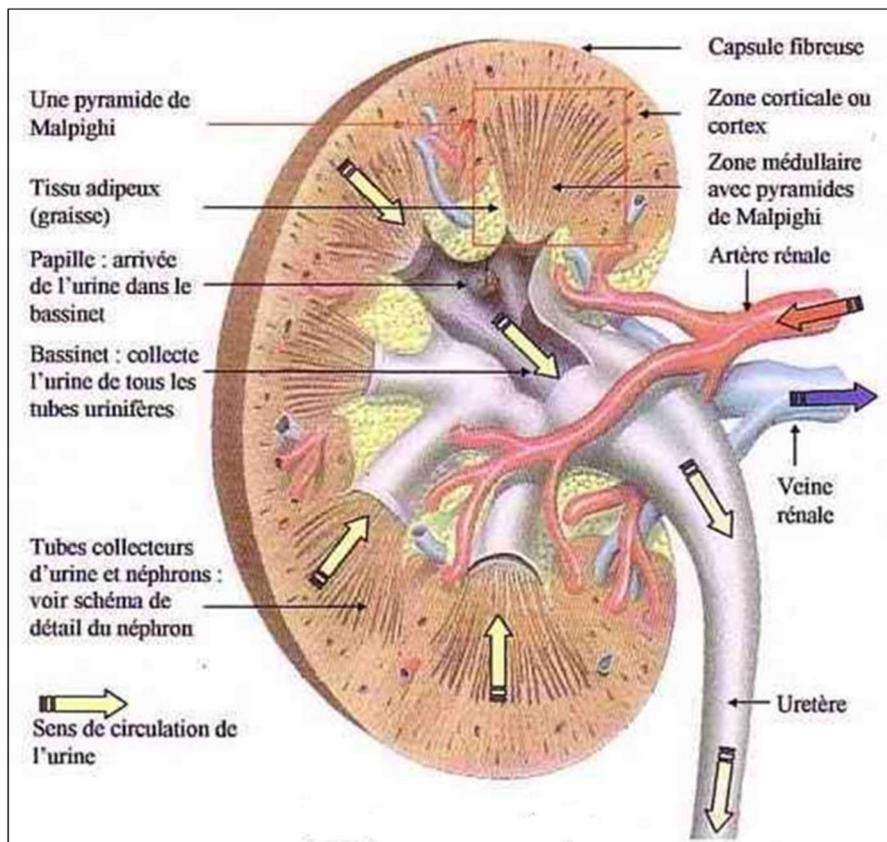
# **INTRODUCTION**

# 1. Introduction

## 1.1. Anatomie et Physiologie du rein

### 1.1.1. Anatomie macroscopique

Le rein normal d'un homme adulte pèse environ 150 g et mesure 11-14 cm de long et 3-5 cm de large. Le rein se consiste de deux zones, la zone corticale (zone extérieure) qui comporte les glomérules, les tubes contournés proximaux et distaux et les tubes collecteurs. La zone médullaire (la zone intérieure) qui comporte pyramides rénales, les tubes droits proximaux et distaux ainsi que l'anse de Henle (**Figure 1**).

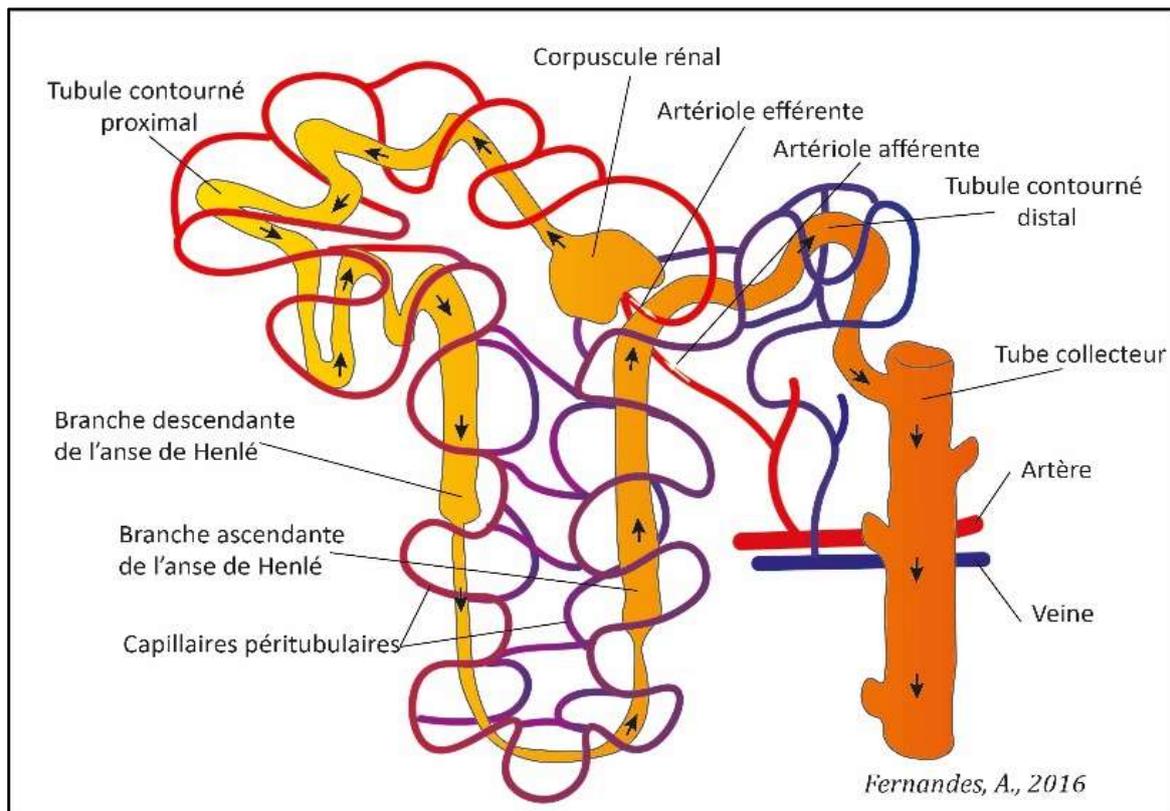


**Figure 1: Structure du rein (coupe sagittale)**

(Photo de <http://infirmi.e-monsite.com/pages/schema/le-systeme-urinaire.html>)

### 1.1.2. Anatomie microscopique

L'unité fonctionnelle du rein est le néphron (**Figure 2**). Le rein adulte contient environ un million de néphrons. Le néphron représente la partie filtrante ; dans laquelle se déroulent les étapes de la formation de l'urine. Chaque néphron est constitué d'un pôle vasculaire et un pôle urinaire. Le pôle vasculaire est le corpuscule rénal formé par le glomérule de Malpighi et la capsule de Bowman. Le pôle urinaire est le système tubulaire composé d'un tube contourné proximal, anse de Henle et un tube contourné distal. Après la filtration du plasma sanguin dans le glomérule de Malpighi, le filtrat glomérulaire circule dans les tubules rénaux et tubes collecteurs et est excrété sous la forme d'urine.



**Figure 2: Représentation schématique d'un néphron et des capillaires péri-tubulaires**

(Photo de <http://know.net/fr/sciences-terre-vie/reabsorption-et-secretion-tubulaires>)

### 1.1.3. Fonction rénale

En plus de la formation d'urine et de l'élimination des déchets du corps (urée, créatinine, acide urique) et des produits chimiques exogènes (toxines - médicaments), le rein joue aussi un rôle endocrine important : sécrétion d'érythropoïétine, activation de la vitamine D, sécrétion de rénine et maintien de l'équilibre hydro électrolytique des milieux de l'organisme. Bien que la masse rénale représente 1% du poids corporel total, le flux sanguin rénal constitue 20% du débit cardiaque (soit 1-1,2 L/min) et 90% de ce flux est dédié au cortex. Les tubules rénaux sont capables de réabsorber de l'eau et certaines substances dont le corps a besoin et en même temps ils sont capables de sécréter des substances indésirables. Par conséquent, la composition finale des urines est déterminée par la filtration glomérulaire, la réabsorption tubulaire du filtrat glomérulaire et la sécrétion tubulaire de certaines substances.

## 1.2. Insuffisance rénale chronique et terminale

L'insuffisance rénale chronique se caractérise par une altération irréversible du système de filtration glomérulaire, de la fonction tubulaire et endocrine des reins. La maladie rénale chronique est une cause importante d'invalidité et de décès, le taux de patients atteints augmente continuellement.<sup>1</sup> En 2014, l'incidence de l'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) en France est de 165 par million d'habitant (pmh) (données 2016 du Réseau Épidémiologique et Information en Néphrologie – REIN). Les patients atteints d'IRCT sont traités soit par la dialyse (hémodialyse ou dialyse péritonéale) soit par la transplantation rénale (**Figure 3**). L'histoire et la naissance de la dialyse ont été merveilleusement racontées par le Pr. Gabriel Richet (1916-2014), qui a rapporté cette technique des États-Unis dès novembre 1954 à l'hôpital Necker en France (Paris). Les résultats après transplantation rénale se sont améliorés avec l'introduction de médicaments immunosuppresseurs et l'amélioration de la technique chirurgicale tandis que la dialyse est devenue coûteuse tant sur le plan médico-

économique que médico-social. En effet les séances de dialyse impactent sur la qualité de vie des patients. La majorité des patients ayant 3 séances de dialyse par semaine, chacune d'une durée médiane de 4 heures. De plus, il a été montré que l'hémodialyse au long cours est responsable d'une augmentation du risque de carcinome rénal chez le patient l'hémodialysé.<sup>2,3</sup> En revanche, la transplantation rénale est associée à de meilleurs résultats que la dialyse en termes de qualité de vie des patients et du risque de mortalité.<sup>4,5</sup>

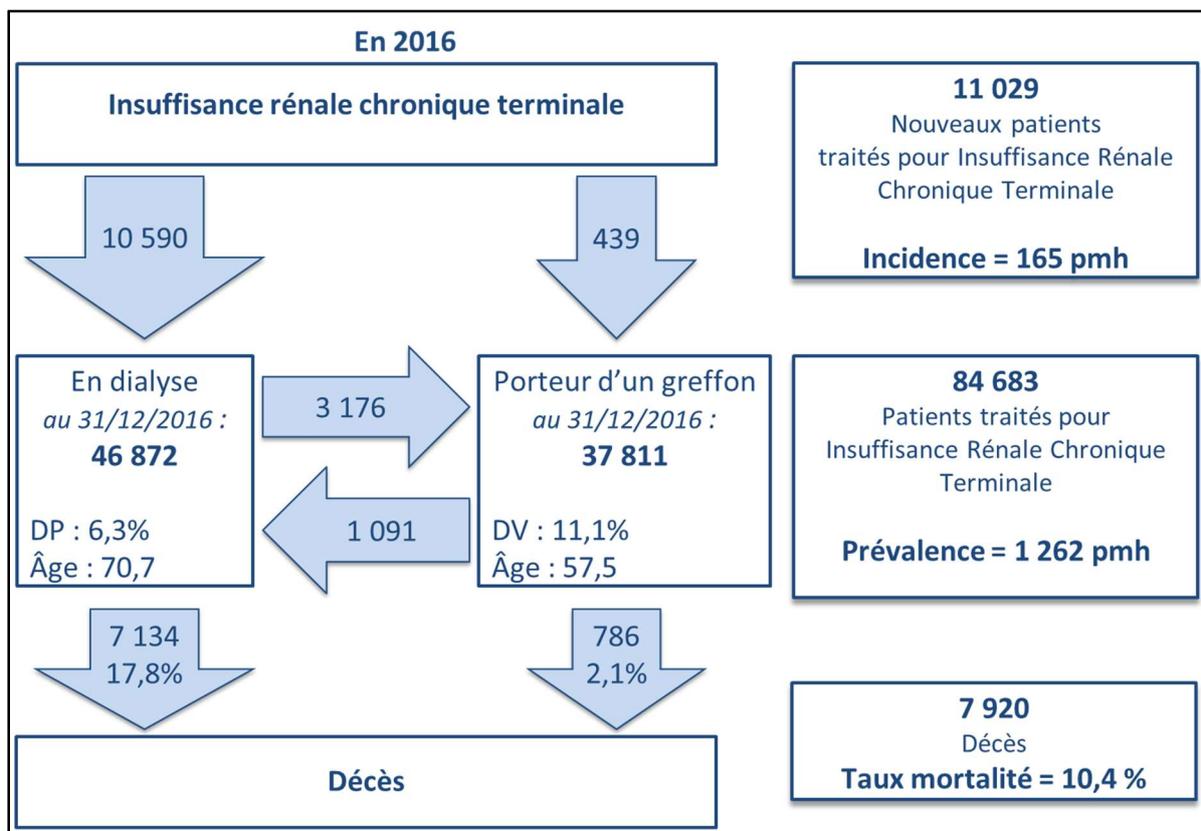


Figure 3: Schéma récapitulatif de la prise en charge de l'IRCT en France en 2016, par le Registre français des traitements de suppléance de l'insuffisance rénale chronique. DP : dialyse péritonéale, DV : donneur vivant, pmh : par million d'habitants

### 1.3. Transplantation rénale en France

Il est établi que la transplantation rénale est la meilleure option thérapeutique<sup>4,5</sup> dans l'insuffisance rénale terminale. De plus, la transplantation de rein offre aux patients une

meilleure qualité de vie, mais est également financièrement avantageuse en termes de santé publique,<sup>6,7</sup> la greffe de rein étant une solution moins coûteuse que la dialyse. La première année suivant la greffe coûte environ 80000 euros. La facture annuelle est ensuite de 20000 euros, alors que celle d'une dialyse est évalué à 62000 euros par an pour l'hémodialyse et 50000 euros pour la dialyse péritonéale. Ainsi financièrement, deux années d'hémodialyse à peu près équivaldraient à cinq ans avec un greffon rénal fonctionnel.

En France, le nombre de greffes rénales ne cesse d'augmenter et a atteint 3615 greffes réalisées en 2016, soit 54,1 pmh, ce qui représente une augmentation de 4% (+ 129 greffes) par rapport à 2015. Au 31 décembre 2016, il y avait 38178 personnes porteuses d'un greffon rénal fonctionnel.<sup>8</sup> Mais malgré ces chiffres et cette activité remarquable, le nombre des patients sur la liste nationale d'attente est toujours en augmentation. En 2016, 5181 nouveaux patients ont été inscrits sur la liste national d'attente avec une augmentation de 29% depuis 2011 soit un taux d'inscription de 77,6 nouveaux candidats pmh pour atteindre 17698 malades en attente de transplantation rénale en 2016. De ce fait il y a actuellement 4,9 candidats pour 1 greffon rénal ce qui conduit à l'augmentation de la médiane d'attente passant de 14,5 mois pour les patients inscrits entre 1996-1999 à 29,5 mois pour les malades inscrits entre 2010-2015. Ainsi, seulement un quart des patients sur la liste nationale d'attente sont greffés. Ce constat amène à rechercher de nouvelles ressources de greffons pour tenter de remédier à cette pénurie. Les centres de transplantation ont ainsi élargi les critères de sélection des donneurs pour y inclure les greffons marginaux (donneurs décédés après arrêt circulatoire {DCD}, donneurs décédés de mort encéphalique à critères étendus {ECD}). Depuis 2006 il y a eu 644 greffes rénales à partir de DCD non contrôlé (Maastricht I, II) tandis que les donneurs de DCD appartenant à la catégorie Maastricht III (situation d'arrêt de soins) sont autorisés en France depuis 2014 ; 114 greffes rénales sont réalisées jusqu'à 2016 grâce à ces donneurs. Ce type de donneur (DCD) permettrait une augmentation de 30% du nombre de donneurs.<sup>9-11</sup>

Plusieurs équipes sont encore réticentes à l'utilisation des greffons marginaux, compte tenu du risque plus élevé de non fonction primaire (NFP) et de retard de reprise de la fonction (RRF) qui impacte sur la survie des greffons, et s'associe à une augmentation de l'incidence du rejet aigu et tardif.<sup>12-15</sup>

## 1.4. Type de donneurs

### 1.4.1. Donneur Vivant

Le don d'organe de son vivant concerne essentiellement le rein et (ou un lobe de foie). Il est possible de vivre tout à fait normalement avec un seul rein. Une personne majeure vivante, volontaire et en bonne santé peut donner un rein dans les conditions définies par la loi. En France, pour répondre aux attentes des patients et de leurs familles et favoriser ce type de greffe, la loi de bioéthique du 7 juillet 2011 a élargi le cercle des donneurs vivants d'organes qui peuvent être le père ou la mère et, par dérogation, un fils ou une fille, un frère ou une sœur du receveur, son conjoint, ses grands-parents, oncles ou tantes, cousins germains et cousines germaines ainsi que le conjoint du père et de la mère. Le donneur peut également être toute personne apportant la preuve d'une vie commune d'au moins deux ans avec le receveur ainsi que toute personne apportant la preuve d'un lien affectif étroit et stable depuis au moins deux ans avec le receveur.

En cas d'incompatibilité entre le malade et le candidat au don, la loi révisée en juillet 2011 permet désormais de procéder à un don croisé : le receveur (receveur 1) bénéficie du don d'une autre personne (donneur 2), également en situation d'incompatibilité avec son receveur (receveur 2) qui lui bénéficie du don du premier donneur (donneur 1). Les deux opérations chirurgicales sont alors engagées simultanément, tout en respectant l'anonymat. En France, la greffe rénale à partir de donneur vivant (DV) augmente progressivement depuis le début des années 2000 avec une progression de 146% depuis 2008, mais cela reste moins que d'autres

pays européens et que l'Amérique du nord. Ce type de greffe a représenté en France 16% de l'activité de greffe rénale en 2016, soit 576 greffes rénales.<sup>8</sup> En effet le donneur vivant est favorisé par l'Agence de la Biomédecine et le reste du monde grâce à une meilleure survie des greffons en comparaison avec les donneurs décédés en mort encéphaliques et peu importe qu'ils soient apparentés ou non apparentés.<sup>16-19</sup> Les objectifs ont été réévalués dans le nouveau plan greffe à la hausse avec 1000 greffes rénales à partir de donneurs vivants, soit 14,7 pmh en 2021.<sup>20</sup>

#### 1.4.2. Donneur décédé en état de mort encéphalique

Les donneurs décédés en état de mort encéphalique (DBD) représentent la première source de greffons en France. La mort encéphalique (ME) se définit comme la perte complète et irréversible des fonctions de l'encéphale chez un sujet dont la ventilation et le rythme cardiaque sont contrôlés et maintenus par des moyens artificiels. Comme nous le savons, la mort encéphalique est un état clinique et son diagnostic essentiellement clinique et a été réglementé par l'article R671-7-2 du décret : Patient assisté par ventilation mécanique et conservant une fonction hémodynamique avec tous les signes cliniques suivants :

- Absence totale de conscience et d'activité motrice spontanée.
- Abolition de tous les réflexes du tronc cérébral.
- Absence totale de ventilation spontanée.

En plus des trois critères cliniques mentionnés ci-dessus, un examen paraclinique de confirmation est obligatoire pour attester du caractère irréversible de la destruction de l'encéphale (cerveau + tronc cérébral) composant un des deux examens suivants :

- 2 EEG nuls et aréactifs sur une durée minimum d'enregistrement de 30 minutes et réalisés à 4 h d'intervalle.
- Angiographie cérébrale objectivant l'arrêt de la circulation encéphalique au niveau des 4 axes (carotides internes et artères vertébrales).

Les DBD à critères standards sont des donneurs de moins de 60 ans ou de plus de 60 ans sans facteurs de comorbidité tels que l'hypertension artérielle (HTA) et le diabète ... ces donneurs proviennent essentiellement d'accidents de la voie publique.

La mort encéphalique induite un important syndrome inflammatoire de réponse systémique (SIRS) touchant l'ensemble des organes et responsable d'une partie de leur dysfonctionnement primaire et de leur moins bonne survie après transplantation. Ce SIRS est à l'origine d'une large activation de phénomènes impliquant l'endothélium vasculaire, la cascade du complément et les facteurs de coagulation auxquels s'ajoutent les composants de l'immunité innée et adaptative.<sup>21</sup> L'activation endothéliale vasculaire est considérée comme la première étape du processus inflammatoire suivi la mort encéphalique. Les lésions cérébrales induisent la libération de nombreux des cytokines qui vont provoquer l'activation endothéliale telles que les interleukines (IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) et de nombreuses molécules d'adhésion (E-selectine, P-selectine, intracellular adhesion molecule (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule (VCAM-1). Les cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) jouent un rôle important pour activer l'immunité innée.<sup>22,23</sup> De plus, différentes cellules inflammatoires (macrophages, cellules natural killer (NK), lymphocytes T helper) peuvent également infiltrer les tissus lors de la ME qui pourraient jouer un rôle responsable sur la reprise de fonction post-transplantation et l'avenir du greffon.<sup>24,25</sup>

### 1.4.3. Donneur marginal

Grâce à l'augmentation de l'espérance de vie et à l'augmentation du taux de survie dans plusieurs pathologies chroniques, l'utilisation des donneurs marginaux a été développée pour agrandir le pool de donneur et donc le nombre d'organes transplantables afin de diminuer le déficit de greffons disponibles.<sup>26</sup>

Ainsi, le prélèvement d'organes chez le sujet âgé ( $\geq 65$  ans) a augmenté progressivement : de 2% en 1998 pour atteindre 38% en 2016<sup>8</sup> (**Figure 4**). Cela il conduit à la question qui est toujours posée «devrais-je accepter ce rein marginal ?». Il existe actuellement deux types de donneurs marginaux : les donneurs en mort encéphalique à critères étendus (ECD) et les donneurs décédés après arrêt circulatoire (DCD).

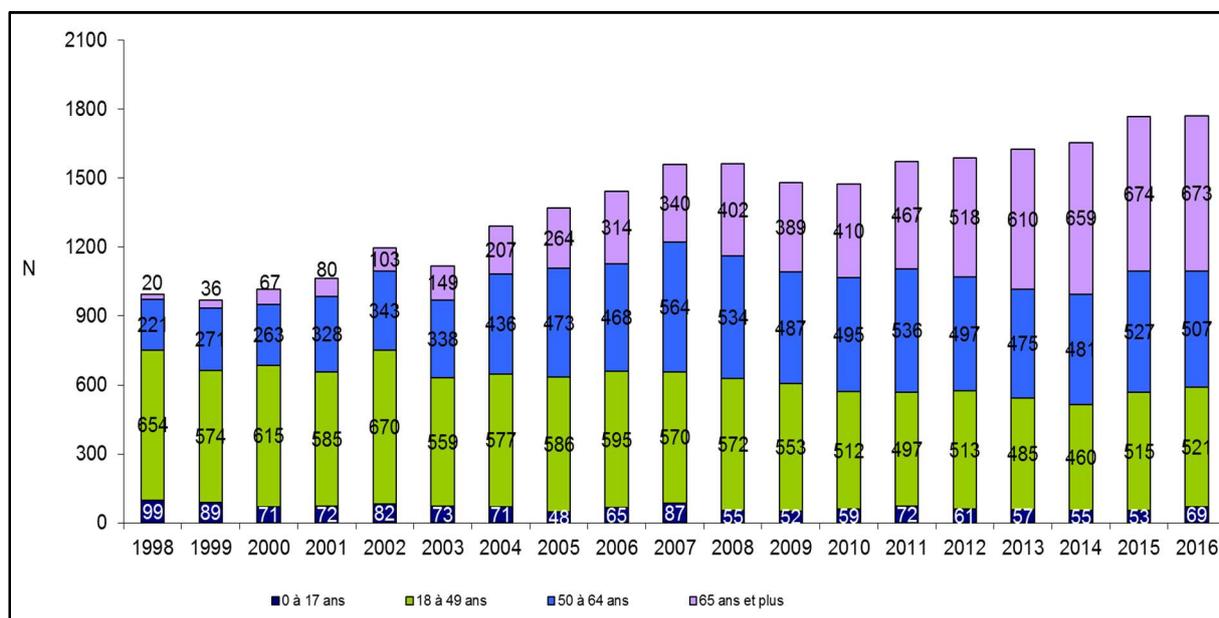


Figure 4: Évolution de l'âge des sujets en état de mort encéphalique par l'ABM

#### 1.4.3.1. Donneur décédé en état de mort encéphalique à critères étendus

Avec les progrès des soins médicaux et de la sécurité routière, le nombre de DBD à critères standards régresse ce qui conduit à un renforcement de l'écart entre le nombre des patients sur la liste d'attente et le nombre des patients greffés. Les critères d'inclusion ont donc été élargis pour maintenir le nombre de donneurs. L'United Network for Organ Sharing (UNOS) a défini un donneur de critère élargis (étendus) comme étant un sujet âgé de 60 ans ou plus ou âgé de 50-59 ans avec au moins deux facteurs de risque associés parmi les trois suivants : un antécédent d'hypertension artérielle (HTA), une mort encéphalique de cause cérébro-vasculaire ou une créatinémie supérieure à 150  $\mu\text{mol/l}$  lors du prélèvement.<sup>27,28</sup>

#### 1.4.3.2. Donneur décédé après un arrêt circulatoire

Le deuxième type de donneur à critères étendus est représenté par les donneurs décédés après arrêt circulatoire (DCD) pour lesquels les reins subissent une période d'ischémie chaude suite à la période d'asystolie. En France, depuis la circulaire Jeanneney en 1968 jusqu'en août 2005, le prélèvement d'organes a été limité aux donneurs DBD et donc à cœur battant. Mais à cause du gap entre le nombre des patients sur la liste d'attente et le nombre des greffes réalisées, les autorités françaises ont autorisé en 2006 le prélèvement d'organes de donneurs décédés après un arrêt circulatoire suite à un arrêt cardiaque inopiné (Maastricht I et II). Ce type de prélèvement peut augmenter de 30% le pool de greffons.<sup>11,29</sup> Les techniques de prélèvement d'organes sur des sujets à cœur arrêté visent à conserver les organes *in situ* au décours de l'arrêt cardiaque le plus tôt possible car l'arrêt de la circulation

sanguine et la durée d'ischémie chaude exacerbent les lésions liées à l'ischémie-reperfusion (I/R).

Néanmoins ces greffons présentent un risque plus élevé :

- de non fonction primaire (NFP). La NFP est définie comme l'absence de reprise de fonction du greffon rénal dans la première semaine après la transplantation.
- et un risque de reprise retardée de fonction (RRF). La reprise retardée de fonction est définie comme la nécessité d'au moins une séance de dialyse au cours de la première semaine post-transplantation.<sup>30,31</sup>

Depuis 1995 lors d'une réunion à Maastricht aux Pays-Bas, une classification des décès après arrêt circulatoire a été établie. Dans cette classification il s'agit de deux types de donneurs différents : les donneurs dits contrôlés (catégorie III et IV) où l'état hémodynamique du donneur est connu par l'équipe médicale et où la durée d'ischémie chaude et le temps d'arrêt circulatoire sont définis et plus courts, et les donneurs dits non contrôlés (catégories I et II) où l'arrêt cardiaque est inopiné et la durée de l'ischémie chaude est incertaine. Les DCD sont classés en quatre catégories selon la classification de Maastricht qui a été révisée en février 2013 :

- **Catégorie I (non contrôlé)** : les personnes qui font un arrêt cardiaque en dehors de tout contexte de prise en charge médicalisée, déclarées décédées à la prise en charge.
- **Catégorie II (non contrôlé)** : les personnes qui font un arrêt cardiaque avec mise en œuvre d'un massage cardiaque et d'une ventilation mécanique efficaces, mais sans récupération d'une activité circulatoire.

- **Catégorie III (contrôlé)** : les personnes pour lesquelles une décision de limitation ou d'arrêt programmé des thérapeutiques est prise en raison du pronostic des pathologies ayant amené la prise en charge en réanimation.
- **Catégorie IV (contrôlé)** : les personnes décédées en mort encéphalique qui font un arrêt cardiaque irréversible au cours de la prise en charge en réanimation.

En France, le prélèvement d'organes sur les DCD des catégories non contrôlé (I et II) de la classification de Maastricht est autorisé depuis octobre 2006 à la suite de la publication de l'arrêté du 2 août 2005 mais à cause de difficultés concernant la sensibilité culturelle, religieuse et législative les prélèvements sur donneurs de la catégorie III de la classification de Maastricht ont été retardé jusqu'à 2014. Même si ce type de donneur (DCD) reste encore peu utilisé en France, les donneurs de Maastricht catégorie III sont considérés comme une source indispensable de greffe à partir de DCD aux États-Unis, au Canada, au Royaume-Unis, en Belgique et aux Pays-Bas.<sup>32</sup>

## 1.5. Conservation du rein

Cette conservation est essentiellement liée à l'hypothermie avec un objectif d'une température aux environs de 4 à 6° C. Le but principal de la conservation extracorporelle d'un organe à froid est de maintenir la viabilité des différents types cellulaires *ex vivo* pendant une période suffisante pour le transport éventuel des organes du centre préleveur vers les centres transplantateurs. Au cours de l'ischémie, le manque d'oxygène conduirait à une baisse immédiate des niveaux d'ATP, une perturbation des fonctions de la membrane cellulaire et ensuite une accumulation des déchets métaboliques avec des suites irréversibles sur la cellule et l'organe.

La conservation à froid a permis une augmentation du temps de conservation des reins, un partage géographique des reins, une diminution du nombre de reins perdus et du coût de la transplantation rénale.<sup>33</sup> Donc, le principe de la conservation hypothermique est de ralentir les réactions métaboliques qui nécessitent l'ATP et ainsi réduire rapidement l'activité métabolique rénale dépendant de l'énergie. L'effet de l'hypothermie sur le métabolisme cellulaire peut être exprimé par l'équation de Van't Hoff :

$$Q_{10} = (k_1/k_2)^{10 / (t_2 - t_1)}$$

$Q_{10}$  : Coefficient de Van't Hoff

$k$  : la constante d'équilibre

$t$  : la température respectivement.

Selon la loi de Van't Hoff : une augmentation de la température entraînera une augmentation du taux de réaction endothermique. Alors, sous l'effet de la conservation froide le métabolisme est ralenti d'un facteur de 2 pour chaque palier de 10°C de température.<sup>34</sup> Donc, à 4°C le métabolisme résiduel est de l'ordre de 10%.

Il y a deux types de conservation du rein à froid, la conservation statique (static cold storage) et la conservation à la machine de perfusion (hypothermic pulsatile storage).

### 1.5.1. Conservation statique

La transplantation d'organes de donneurs cadavériques implique, invariablement, une phase *ex vivo* plus ou moins prolongée. Une fois l'organe prélevé, il a une durée de vie limitée due aux effets délétères de l'interruption de la circulation sanguine entraînant une nécrose cellulaire rapide. En général, le greffon est lavé et conservé par simple

immersion à 4°C dans une solution de conservation. Donc, l'hypothermie est le principe de base pour la conservation des organes où la diminution de la température entraîne une baisse des besoins énergétiques (les besoins en O<sub>2</sub> à 5°C sont à 5% de leur valeur à 37°C) permettant de maintenir la viabilité des organes *ex vivo* suffisamment longtemps pour permettre le transport et l'attribution de l'organe selon les critères d'urgence, de priorité ou de meilleure compatibilité tissulaire. Les solutions de conservation ont été conçues pour répondre aux modifications physiologiques dues à la conservation et prévenir des lésions d'I/R.<sup>35-37</sup> Les conditions de conservation des greffons pendant et après leurs prélèvements semblent jouer un rôle déterminant pour la survie du greffon à court (nécrose tubulaire aiguë) et à long terme (néphropathie chronique du greffon).

Depuis les années 70, les prélèvements multi-organes sur des donneurs en état de mort encéphalique ont augmenté et par conséquent les organes commencent à circuler entre le centre où l'organe est prélevé et le centre où il est transplanté. Plusieurs solutions de conservation ont été développées pour assurer des conditions de conservation optimales d'organes. Ces solutions (Euro-Collins<sup>®</sup>, UW<sup>®</sup>, Celsior<sup>®</sup>, SCOT15<sup>®</sup>, Custodiol<sup>®</sup>, IGL-1<sup>®</sup>, ...) présentent toutes des formulations différentes avec parfois des effets protecteurs (**Table 1**). Cependant, les solutions de conservation ne peuvent pas prévenir complètement les lésions liées à l'I/R.<sup>38-40</sup> Néanmoins, aucune méta-analyse ni aucun consensus national ni international n'est disponible pour le choix de la solution de conservation idéale. De plus, la température à 4°C de conservation est actuellement remise en question et de nouvelles stratégies apparaissent afin de conserver les organes de façon plus physiologique. En effet, la conservation statique à 4°C n'est pas optimale parce que le froid n'arrête pas totalement le métabolisme cellulaire et de plus cette température basse cause de dommages cellulaires. Sans un apport suffisant en O<sub>2</sub>, le métabolisme est dirigé vers la voie anaérobie (glycolyse

anaérobie), génératrice d'acide lactique avec acidification tissulaire, rupture des membranes lysosomales et destruction cellulaire conduisant à l'accumulation de toxines cytotoxiques.<sup>41</sup>

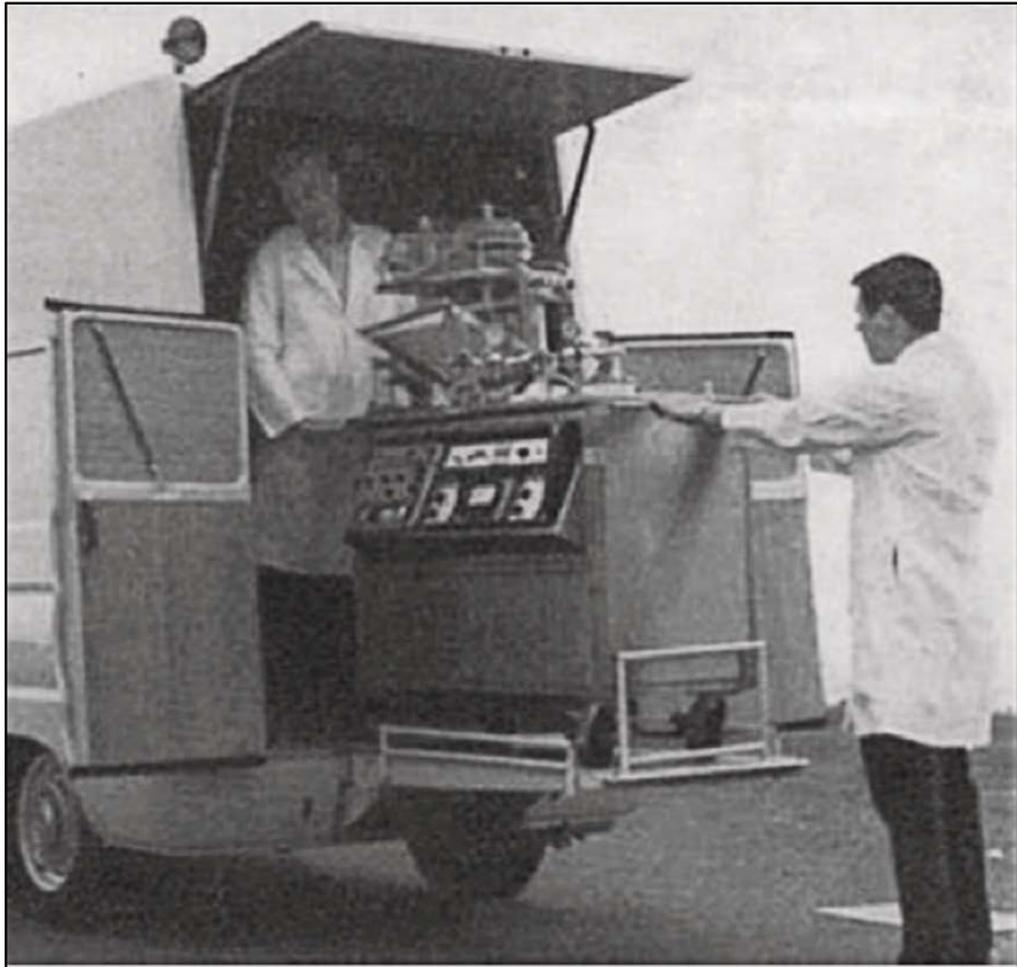
### 1.5.2. Conservation avec machine de perfusion

La conservation des organes en machine perfusion (MP) a été étudiée depuis les années 1930s. En 1935 Alexis Carrel (1873-1944) et Charles A. Lindbergh (1902-1974) qui ont réussi à inventer un modèle de MP en Pyrex (**Figure 5**) qui a été utilisé dans des études expérimentales.<sup>42,43</sup> Dans les années 1960 la machine de perfusion hypothermique a été utilisée pour la première fois en clinique par Folkert O Belzer (1931-1995) (**Figure 6**). En 1971 à grâce lui, pour la première fois, un rein est transporté de San Francisco aux États-Unis jusqu'aux Pays-Bas où il a été transplanté avec succès après avoir été conservé pendant 37 heures. Cette utilisation disparaît rapidement devant la conservation statique plus économique et plus facilement transportable que la machine de perfusion de cette époque.<sup>44,45</sup> Depuis de nouvelles machines de perfusion transportables ont vu le jour (ORS, Water et Organ Assist).



**Figure 5: Machine de perfusion inventé par Charles Lindbergh (National Museum of American History)**

*(photo de <https://www.smithsonianmag.com/smithsonian-institution/save-his-dying-sister-law-charles-lindbergh-Invented-medical-device-180956526/>)*



**Figure 6: Machine de Belzer utilisée en Californie dans les années 1960**

(Photo de <http://www.edimark.fr/ressources/machines-perfusion-transplantation-renale-passe-present-avenir-figure-1>)

Au cours des deux dernières décennies, l'utilisation des greffons marginaux a augmenté afin de diminuer la pénurie d'organe. Les greffons marginaux sont plus sensibles aux lésions d'I/R que les organes provenant de donneurs vivants ou en mort encéphalique.<sup>46,47</sup> Pour les DCD, la reprise retardée de fonction (RRF) est corrélée à la durée de l'ischémie chaude.<sup>48,49</sup> Cette sensibilité des reins marginaux (les reins DCD en particulier) à l'I/R, implique que les méthodes de conservation ont dû être adaptées. En particulier l'utilisation de MP. Des recherches cliniques ont démontré le bénéfice de l'utilisation de machine de perfusion (MP) transportables pour conserver tous les reins, notamment ceux qui sont prélevés de donneur à critères étendus (ECD) et de DCD, reflété par une diminution de la

RRF<sup>50-54</sup> et une meilleure fonction immédiate réduisant le nombre de séances de dialyse post-transplantation. Lodhi *et al.* ont repris les données de la base américaine national pour analyser le devenir de 4923 greffes rénales à partir de DCD entre 2000 et 2010 dont 67% des greffons ont été perfusés par la MP. Il a constaté que les reins des DCD présentent un risque de reprise retardée de fonction plus élevé que les reins prélevés de DBD. Or, les reins perfusés ont un risque moindre de RRF comparés à ceux conservés en CS.<sup>55</sup> En effet, la machine de perfusion permet d'allonger les temps de conservation en préservant leur intégrité tissulaire.<sup>56,57</sup> Par ailleurs, le principe d'utilisation de ce type de conservation par machine de perfusion assure une conservation prolongée et de meilleure qualité du rein. La machine de perfusion permet de délivrer de l'oxygène et des précurseurs de la synthèse d'ATP et également élimine les produits du métabolisme cellulaire en continu. De plus, les données de la machine permettent d'évaluer la qualité du greffon avant la transplantation, et permettent donc une meilleure gestion des greffons dits 'à risque'.<sup>58-63</sup> Ces observations ont conduit les instances sanitaires françaises comme celles de l'Europe à imposer l'utilisation des machines pour la conservation des reins prélevés sur les DCD. En Europe, les machines de perfusion sont principalement utilisées pour les greffes de DCD.<sup>64</sup>

Il existe plusieurs modèles de MP. La société américaine Waters Medical System a été en mesure de développer des modèles de la MP non transportable de type TM<sup>®</sup> (**Figure 7A**) jusqu'à la MP transportable RM3<sup>®</sup> (**Figure 7B**) et WAVES<sup>®</sup> (**Figure 7C**), cette dernière a été commercialisée en clinique au cours des dernières années. De plus la société américaine Organ Recovery Systems et la société néerlandaise Organ Assist ont présenté leurs transportable MP LifePort<sup>®</sup> kidney transporter (**Figure 7D**) et Kidney Assist<sup>®</sup> (**Figure 7E**) qui sont utilisées actuellement en clinique (**Table 1**).

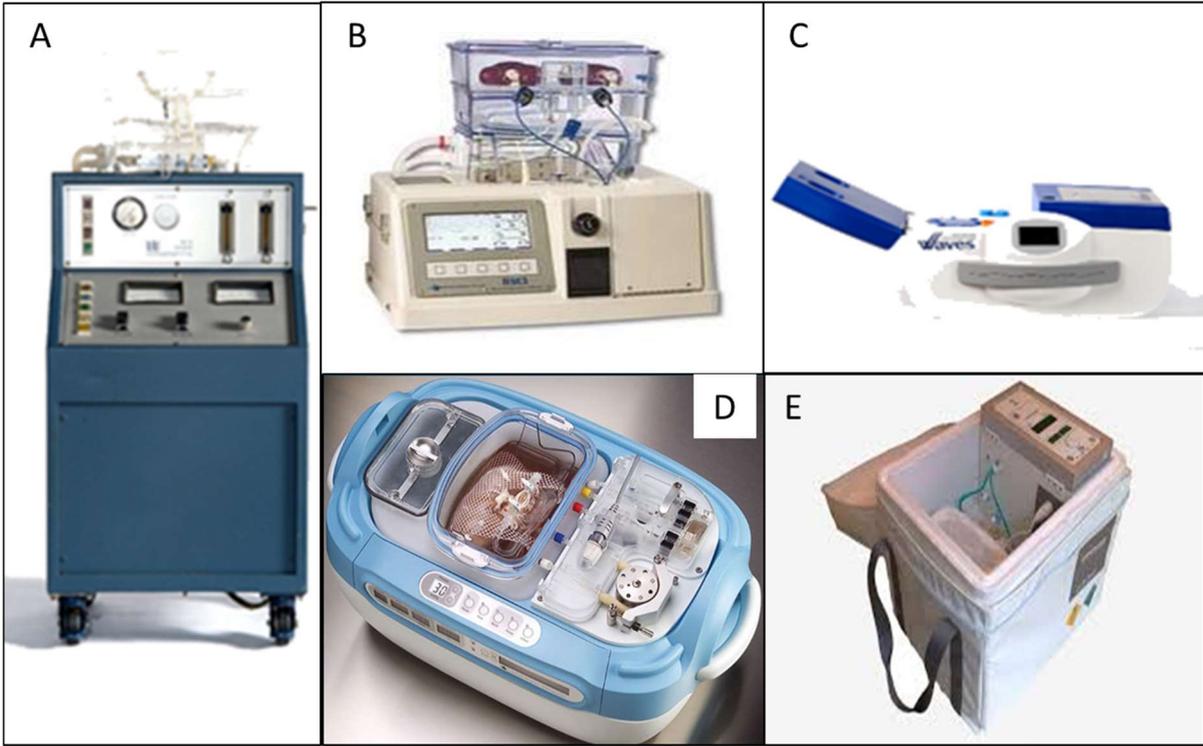


Figure 7: Diffèrent modèles de machine de perfusion. (A) : TM<sup>®</sup>, (B) : RM3<sup>®</sup>, (C) : WAVES<sup>®</sup>, (D) : Lifeport<sup>®</sup> kidney transporter , (E) : Kidney Assist<sup>®</sup>

Solutions	K <sup>+</sup> (mM)	Na <sup>+</sup> (mM)	Buffer	pH	Impermeant	Adenosine (mM)	Anti-oxidant	Colloid (g/L)
<b>Flush and Static cold storage</b>								
Blood	4.25	139	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	7.4	+	0	+	Albumin (50 g/L)
HTK (Custodiol®)	10	15	Histidine	7.2	+	5	-	-
UW (Viaspan®) (Bridge to life®)	100	28.5	(K)H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> HEPES	7.4	+	5	Glutathione	HES (50 g/L)
Celsior®	15	100	HEPES	7.3	+	0	Glutathione	-
IGL-1®	30	125	(K)H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.3	+	5	Glutathione Allopurinol	PEG 35kDa (1g/L)
Lifor®	16	98	Phosphate s	7.07	+	?	?	?
Polysol®	15	120	(K)H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> HEPES Histidine	7.4	+	5	Glutathione Acid ascorbic	PEG 35kDa (20g/L)
SCOT 15®	5	118	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	7.4	+	0	-	PEG 20 kDa (15g/L)
<b>Flush solutions</b>								
Carolina RS®	5	115	(K)H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,5	+	1	Glutathione Allopurinol	HES (50 g/L)
<b>Dynamic preservation solution (for hypothermic perfusion machine)</b>								
KPS-1®	25	97.5	(K)H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> HEPES	7.4	+	5	Glutathione	HES (50 g/L)
PERF-GEN®	25	100	(K)H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> HEPES	7.4	+	5	Glutathione	HES (50 g/L)
MPS®	25	100	(K)H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> HEPES	7.4	+	5	Glutathione	HES (50 g/L)
<b>Kidney hypothermic perfusion machines</b>								
Machine	Solution type	Pulsatile perfusion	Temperature	Oxygen supply (100%)				
LifePort®	KPS-1® MPS®	-	4°C	No				
WAVES®	PERF-GEN®	+	4°C	100%				
Kidney Assist-Transport®	KPS-1® MPS®	-	4°C	100%				

**Table1: Characteristics of current kidney preservation solutions and machine perfusion**

HTK (Custodiol®, Dr Franz Köhler Chemie GMBH, Alsbach-Hähnlein, Germany); UW (University of Wisconsin, Alumni Research Foundation, Madison, WI, USA); Celsior® (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA); IGL-1® (Institut Georges Lopez, Civrieux d’Azergues, France); Lifor™ (Lifeblood Medical, Freehold, NJ, USA); Polysol® (Doorzand Medical Innovations B.V., Amsterdam, The Netherlands); SCOT15® (MacoPharma, Tourcoing, France); Carolina RS® (Carolina Rinse Solution, University of North Carolina, Chapel, USA); KPS-1® (Organ Recovery Systems, Chicago, USA and Brussels, Belgium); MPS® (Belzer MPS® UW Machine Perfusion Solution, Bridge to life; Columbia, USA); PERF-GEN® (Institut Georges Lopez, Civrieux d’Azergues, France) ; LifePort® (Organ Recovery Systems, Chicago, USA and Brussels, Belgium); WAVES® (Institut Georges Lopez, Civrieux d’Azergues, France) ; Kidney Assist-Transport® (Organ Assist B.V, Groningen, The Netherlands); HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid); HES (hydroxyethyl starch); PEG (Polyethyleneglycol).

## 1.6. Syndrome de l'ischémie-reperfusion

Les lésions cellulaires après la reperfusion du tissu ischémié sont définies comme des lésions de l'I/R. Les lésions d'I/R sont liées aux deux conditions d'hypoxie et d'hypothermie pendant la conservation (phase de l'ischémie), mais également au réchauffement associé à la réoxygénation du greffon après l'anastomose et le déclampage vasculaire (phase de la reperfusion)<sup>38,65</sup> (**Figure 8**). L'I/R rénale est un des facteurs majeurs à l'origine de la reprise retardée de fonction du greffon rénal qui entraîne un surcoût de la transplantation par l'hospitalisation prolongée et la nécessité des séances de dialyse et surtout un risque accru de rejet aigu et une réduction de la survie du greffon à long terme. Le taux de reprise retardée de fonction du greffon rénal varie entre 2% à 50% selon les différents facteurs y compris le type de donneur (DBD, DCD ou ECD), la durée de conservation et les difficultés techniques.<sup>66</sup> C'est la raison pour laquelle les greffons à partir de donneur vivant (durée d'ischémie très courte) présentent des lésions d'I/R moins sévères que les greffons de donneur cadavérique (DBD et DCD).<sup>67</sup> Ainsi, due à la pénurie d'organes, les stratégies pour prolonger la survie des greffons des patients sont un domaine important de recherche. L'un des sujets les plus étudiés est la lésion d'I/R que tous les organes solides développent à certains degrés pendant la conservation extracorporelle et après la transplantation. La lésion d'I/R est une séquence complexe d'événements qui influent sur les résultats à court et à long terme de la transplantation rénale, en particulier dans le contexte de DCD en raison des effets cumulatifs de l'ischémie chaude et froide. Le mécanisme est multifactoriel, interdépendant et complexe comprenant plusieurs types de cellules impliquant de nombreux signaux et voies intra et extracellulaires.

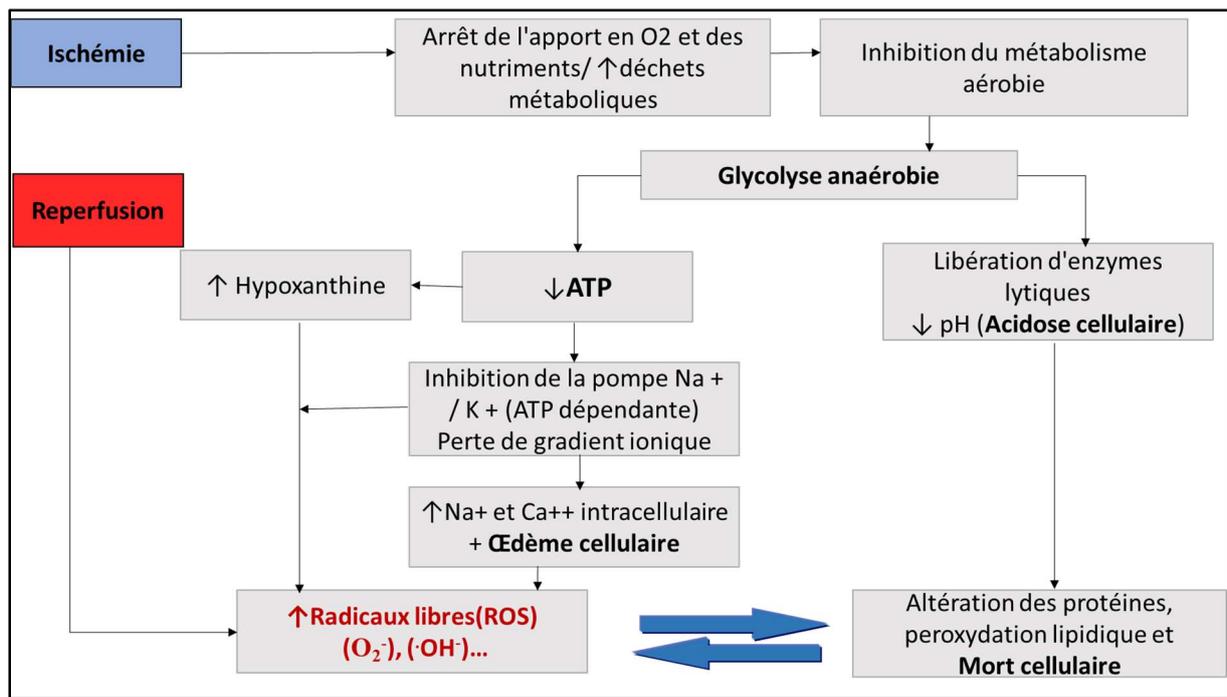


Figure 8: Principaux mécanismes lésionnels au cours de l'IR

Une meilleure compréhension des mécanismes responsables des lésions d'I/R permettra d'améliorer la qualité des greffons et leur survie. Tous les organes transplantés subissent une cascade d'événements d'ischémie-reperfusion (I/R) de leur prélèvement jusqu'à la transplantation.

Lors de la conservation à froid, il y a des changements biochimiques, électrolytiques en plus de l'accumulation des produits de dégradation de l'ATP (AMP et puis adénosine et inosine) dans un environnement ischémique qui amènent les cellules se tourner vers la glycolyse anaérobie en essayant de produire une quantité suffisante d'ATP.

L'arrêt de la circulation du sang entraîne l'ischémie, les tissus sont privés de nutriments et d'oxygène. Les substrats et la production d'ATP diminuent rapidement de sorte que le métabolisme aérobie s'oriente vers le métabolisme anaérobie dont le rendement bas conduit à l'arrêt d'élimination des produits du métabolisme et donc à l'accumulation de déchets métaboliques toxiques. De plus, l'acidose intracellulaire apparaît par l'acide lactique

qui est produite pendant la synthèse d'ATP par la voie anaérobie. Ce déficit énergétique accélère le processus inévitable de dégradation structurelle et fonctionnelle d'organe, dû au manque d'oxygène.<sup>68,69</sup> Ce processus conduit à :

- L'inhibition d'activité des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase entraînant une perturbation des mouvements d'électrolytes ( $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ ) entre les espaces extra et intracellulaires conduisant à une diminution de  $\text{K}^+$  extracellulaire et une augmentation intracellulaire de  $\text{Na}^+$ , induisant une entrée massive d'eau dans la cellule provoquant un œdème cellulaire.<sup>70,71</sup>
- L'activation des pompes  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  et de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  par la mitochondrie afin de maintenir l'équilibre ionique des électrolytes. Cette étape va exacerber le déséquilibre électrolytique et conduire à un influx de  $\text{Ca}^{+2}$  et d' $\text{H}^+$  intracellulaire.
- L'augmentation de  $\text{Ca}^{+2}$  intracellulaire va activer les enzymes dépendantes du  $\text{Ca}^{+2}$ , telles que les protéases et phospholipases qui vont participer à la dégradation des composants cellulaires.
- La déstabilisation de lysosome : entraînant une fuite d'enzymes et de la rupture de la structure cellulaire.
- La production de ROS suite à la perturbation du métabolisme mitochondriale et activation de la xanthine oxydase (enzyme important en formation de ROS).<sup>72</sup>

Donc, l'instabilité cellulaire et le déséquilibre ionique mettent la cellule affectée dans un état de stress appelé lésion d'ischémie.<sup>71,73</sup>

L'organe est soumis à deux types d'ischémie : ischémie chaude et ischémie froide. La lésion d'I/R débute au clampage des vaisseaux ou à l'arrêt circulatoire chez le donneur et continue durant le prélèvement et de conservation extracorporelle de l'organe jusqu'à la transplantation d'organe. De plus, une ischémie chaude (tiède) a aussi lieu lors de

l'anastomose vasculaire du greffon au moment de la transplantation. Il ne faut pas oublier les facteurs de risque du donneur ; antécédents pathologiques et raison du décès (comme l'instabilité hémodynamique conduisant à la mort encéphalique) ; qui peuvent contribuer au développement des lésions au sein du greffon.<sup>74,75</sup> La reprise de fonction immédiate du greffon est vitale après la transplantation d'organes tels que le cœur, le poumon ou le foie pour lesquels le support artificiel pour la fonction des organes ne peut être fourni, donc en clinique, l'exposition de ces organes à l'ischémie est maintenue au minimum. En revanche, ce n'est pas le cas des reins qui proviennent de donneurs cadavériques. Ils sont souvent soumis à de longues périodes de conservation d'ischémie surtout l'ischémie froide, qui peuvent conduire à de graves dommages lors de la transplantation. Ce syndrome regroupe actuellement un ensemble de processus physiopathologiques responsable de lésions importantes au niveau du greffon.

Lors de la reperfusion, la conversion de l'enzyme xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase prend place sous l'effet de la protéase calcium dépendante activée par l'ischémie.<sup>72,76</sup> L'enzyme xanthine oxydase est une enzyme importante de formation des radicaux libres permettant de catalyser une réaction qui produit l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).<sup>77</sup> L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) a été considéré d'abord comme le seul radical libre (Reactive Oxygen Species [ROS]) responsable des lésions, mais depuis il a été montré que tous les autres types de ROS (le peroxyde d'hydrogène [ $H_2O_2$ ], le radical hydroxyle [ $HO^{\cdot}$ ]) sont impliqués dans les lésions de reperfusion. Le radical libre est défini chimiquement comme une molécule ou un atome contenant un nombre impair d'électrons dans son orbitale externe. Ce radical libre réagit de façon particulière avec d'autres atomes ou molécules ; comme un oxydant ou un réducteur ; afin d'apparier son électron impair. Les ROS générés, par l'hypoxie ou la reperfusion, sont maintenant reconnus comme étant en interaction avec les transducteurs de signaux physiologiques en plus de se comporter comme

des réactifs simples qui peroxydent des membranes lipidiques, oxydent l'ADN ou dénaturent les protéines enzymatiques.<sup>78-80</sup>

### 1.6.1. Lésions d'ischémie

Les lésions d'ischémie résultent de l'interruption de l'apport de sang artériel à l'organe, entraînant une diminution de l'apport d'oxygène aux tissus. Ces lésions commencent à partir de l'arrêt de la vascularisation de l'organe chez le donneur et se poursuivent jusqu'au moment de déclampage vasculaire chez le receveur. Il y a deux types d'ischémie : ischémie chaude et ischémie froide.

#### 1.6.1.1. *Ischémie chaude*

L'ischémie chaude (IC) du rein est la période, *in situ*, où l'organe n'est plus perfusé par le sang et où les apports en oxygène sont insuffisants pour assurer le métabolisme cellulaire rénal de façon aérobie. Plusieurs études montrent que les lésions rénales, l'échec du greffon et la mortalité après la transplantation rénale sont directement proportionnelle à la durée de l'ischémie chaude.<sup>49,81,82</sup> Hellegering *et al.* a montré dans son étude sur 472 transplantations rénales de donneurs vivants que l'ischémie chaude prolongée affecte la survie du greffon à long terme.<sup>83</sup> En fait, le rein est soumis à deux périodes d'ischémie chaude une chez le donneur et l'autre chez le receveur :

- Chez le donneur : la période qui dure de l'interruption de la vascularisation (l'arrêt circulatoire chez les DCD) jusqu'au début du refroidissement du rein *in situ* à l'aide d'un liquide de conservation ou lorsque que l'organe est prélevé.

- Chez le receveur pendant la transplantation (ischémie tiède) : la période s'étend entre le placement du rein dans la cavité abdominale et la reperfusion du rein à la suite du déclampage vasculaire (la période pendant l'anastomose vasculaire).

Les lésions d'I/R sont également impliquées dans le lien entre les lésions qu'elle génère et l'immunité innée *via* la maturation des cellules dendritiques et la voie des récepteurs Toll-like.<sup>84,85</sup> Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le dysfonctionnement de l'organe induit par l'I/R, cependant, la plus grande attention a porté sur le rôle des ROS et des leucocytes inflammatoires. Plusieurs types cellulaires interviennent au cours de l'inflammation mais leur rôle n'est pas tout à fait établi. Les lymphocytes T peuvent participer à l'implication de la reconnaissance antigénique, mais également pour certains types de cellules T ont des effets protecteurs.<sup>86-88</sup> Les neutrophiles (polymorphonuclear cells ; PMNs) sont observés dans la nécrose tissulaire après une ischémie. L'accumulation de neutrophiles semble être le médiateur cellulaire principal de la création d'un thrombus microvasculaire responsable d'un bouchage (plugging) et de la destruction cellulaire locale. L'infiltration de monocytes et de macrophages se produit au cours de la fin de lésions d'I/R et probablement contribue à l'extension des lésions précoces, mais aussi aux mécanismes de la réparation.<sup>89</sup>

#### 1.6.1.2. *Ischémie froide*

L'ischémie froide (IF) débute lors du prélèvement au moment où le rein est perfusé et refroidi par une solution de conservation avant d'être placé dans un conteneur rempli de glace ou connecté à la machine de perfusion ; et se termine au moment où le rein est mis en place chez le receveur pour réaliser les anastomoses vasculaires et urinaire. Il est bien connu que la conservation hypothermique réduit la consommation d'oxygène et également le

métabolisme cellulaire de l'organe conservée.<sup>90</sup> Pendant cette période les fonctions glomérulaires et tubulaires sont inhibées tant que la température du rein est inférieure à 18°C.<sup>91</sup>

Malgré ces effets bénéfiques de la conservation hypothermique, les lésions d'ischémie froide sur le greffon rénal sont associées à une nécrose tubulaire aiguë pouvant conduire à la reprise retardée de fonction (RRF) du greffon, diminuant la survie du greffon à court terme<sup>71,92</sup> et sont associées à un taux accru de rejet aigu.<sup>93</sup> Donc, il est essentiel d'atténuer les lésions d'I/R afin d'éviter la RRF et améliorer l'évolution de la transplantation rénale. Une caractéristique importante de l'ischémie froide est le gonflement cellulaire secondaire à l'arrêt de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pompe à cause du manque d'ATP, qui est encore plus délétères après une période d'IC et les plus mauvais résultats sont observés avec les reins de DCD.<sup>94</sup>

### 1.6.2. Lésions de reperfusion

Malgré le rétablissement de la circulation sanguine dans le greffon, la reperfusion entraîne des réponses de coagulation et d'inflammation qui peuvent s'ajouter aux lésions produites par l'ischémie seule.<sup>95</sup> La reperfusion augmente encore les mécanismes d'activation des dégâts parmi lesquels la réponse immunitaire innée et adaptative et augmente le risque de mort cellulaire supplémentaire et donc peut limiter la récupération de la fonction du greffon.<sup>96</sup>

Les lésions de reperfusion sont en partie dues au choc de température du greffon, à l'afflux sanguin au sein d'un endothélium lésé, et à l'arrivée massive et l'augmentation brusque de la pression d'oxygène qui surviennent après la période d'ischémie

hypothermique.<sup>97</sup> Depuis quelques années, il ne fait plus aucun doute qu'une importante production des radicaux libres d'oxygène (ROS) anormalement élevées se produit au cours de la reperfusion.<sup>67,98-102</sup> En fait, il existe de nombreux mécanismes par lesquels l'I/R génère les ROS. Après le rétablissement du flux sanguin rénal, l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine accumulées pendant la période d'ischémie rénale, en raison d'un épuisement de la déshydrogénase, génère des radicaux libres.<sup>103</sup> Ces radicaux libres réduisent les pyridines nucléotides et le glutathion dans la mitochondrie diminuant ainsi le mécanisme de défense contre les insultes oxydatives. De plus, les ROS provoquent une peroxydation lipidique, des dommages membranaires cellulaires qui conduisant à une augmentation de sa perméabilité, une oxydation des protéines membranaires et des dommages de l'ADN entraînant des désordres cellulaires.<sup>72,104</sup> En 2004, Petrosillo *et al.* ont décrit la cascade de phénomènes menant à l'apoptose cellulaire (l'apoptose intrinsèque)<sup>105</sup> de la manière suivante :

- Surcharge calcique dans les mitochondries.
- Influx de  $\text{Ca}^{+2}$  augmentant la production de ROS dans la mitochondrie.
- Les ROS peroxydent les cardiolipines qui retiennent le cytochrome C dans la membrane mitochondriale interne, induisant ainsi la sortie du cytochrome C dans l'espace cytoplasmique entraînant l'apoptose.
- Modification du canal anionique voltage-dépendant.
- L'ouverture de pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) (mitochondrial Permeability Transition Pore) entraîne une chute dramatique du potentiel électrique transmembranaire mitochondrial qui se termine par la rupture de la membrane mitochondriale externe et la libération du cytochrome C.

La mort cellulaire se produit principalement en raison de la reperfusion après la conservation à froid et fournit des informations supplémentaires concernant l'étendue des lésions d'I/R de l'organe.<sup>106</sup>

## 1.7. Comment éviter les lésions d'I/R : Oxygénation pendant la conservation

Comme exposé ci-dessus, la qualité de conservation du greffon rénal pour la transplantation doit être optimale pour le maintien et l'amélioration des résultats de la transplantation. Donc, il est nécessaire d'éviter ou de diminuer les lésions I/R.

Comme mentionné précédemment, l'hypothermie ralentit le métabolisme cellulaire mais ne l'arrête pas complètement. Même à basse température, l'organe a encore besoin de l'oxygène. Or, les liquides de conservation ne permettent pas ni une préservation optimale des greffons, ni de répondre au manque d'oxygène. Donc, il faut optimiser les conditions de conservation pour apporter l'oxygène au greffon soit en améliorant les technologies de conservation en termes de machine de perfusion (MP) soit en utilisant les intrants dans la solution de conservation. Il existe plusieurs possibilités pour apporter de l'oxygène lors de la perfusion machine.

### 1.7.1. Les nouvelles machines avec oxygénation active

La stratégie d'oxygénation active est soutenue par des données récentes rapportant un bénéfice de l'oxygénation lors de la perfusion machine dans des modèles de transplantation avec ou sans ischémie chaude.<sup>107-109</sup>

Cependant cette stratégie d'oxygénation implique d'utiliser une machine capable d'oxygéner la solution par bullage ou une machine connectée à un système d'oxygénation actif de manière continue comme la machine de perfusion WAVES<sup>®</sup> que nous avons utilisé pour ce projet. Pour mettre en place ce nouveau mode de conservation, il faudrait donc remplacer le parc de machines non-oxygénées actuellement utilisées en clinique. Il existerait cependant une alternative au remplacement des machines cliniques qui s'appuierait sur l'ajout d'un transporteur d'oxygène à la solution de conservation dans la machine afin d'augmenter l'apport d'oxygène de façon passive.

En 2010, le groupe IGL (Institut Georges Lopez, Lissieu, France) a mis sur le marché une machine de perfusion pulsatile avec oxygénation du liquide de perfusion. Cette machine permet de diffuser l'oxygène de façon continue dans le liquide de conservation et, ainsi, vers le rein au moyen de la membrane d'oxygénation dans la cassette et une pompe à air installée dans l'unité de contrôle WAVES<sup>®</sup> (**Figure 9**). Une fois la cassette installée dans son compartiment, le circuit d'air se raccorde automatiquement et la pompe à air démarre. Selon les instructions du fournisseur IGL, à la condition normale, la MP WAVES<sup>®</sup> a une pompe à air qui soufflait l'air ambiant à travers la chambre de l'oxygénateur au niveau de 21% O<sub>2</sub> (appelé « Non-oxygénation active »). Lorsque la MP WAVES<sup>®</sup> connecte la source d'oxygène actif, le niveau sera de 100% d'O<sub>2</sub> (appelé « Oxygénation active »).

Chaque fois qu'un rein est perfusé, un "kit de perfusion" est nécessaire. Ce kit de perfusion comprend les consommables nécessaire en vue de compléter le processus de perfusion du prélèvement des reins à leur transplantation éventuelle. Le kit se compose de (**Figure 10**) :

- Cassette à usage unique (système fermé avec un filtre en ligne et le capteur de pression et température, soufflet de pompage pulsatile et membrane oxygénatrice).
- Canule et clamps pour connexion du rein.
- Champ stérile.

- Un litre de solution de conservation (PERF-GEN®).

Les bénéfices de l'oxygénation sur la reprise de fonction restent à démontrer en clinique.



Figure 9: Machine de perfusion WAVES®



Figure 10: La cassette WCM

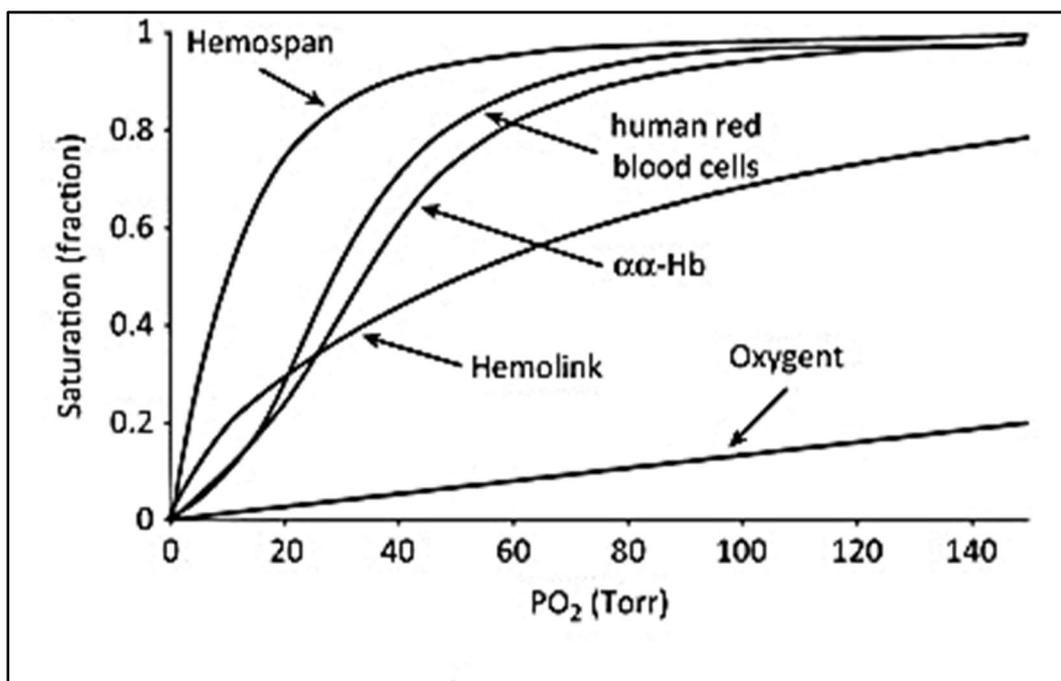
## 1.7.2. L'apport passif d'oxygène dans la machine actuelles non-oxygénées : le transporteur d'oxygène

Bien qu'il existe plusieurs types de transporteurs d'oxygène incluant les transporteurs chimiques comme les perfluorocarbones et les transporteurs protéiques basés sur l'hémoglobine de mammifères ou sur l'hémoglobine d'un ver marin, aucun substitut sanguin n'est encore disponible pour l'utilisation en clinique.

### 1.7.2.1. Les transporteurs chimiques d'oxygène : Perfluorocarbones

Les perfluorocarbones (PFC) sont l'un des deux types principaux de substituts sanguin actuellement en développement. Les PFC sont des molécules synthétiques chimiquement inertes qui se composent de molécules organiques fluorés de formule  $C_xF_y$ , c'est-à-dire, qu'ils ne contiennent que du carbone et de fluor. Le préfixe perfluoro- représente des hydrocarbures, y compris ceux avec des hétéroatomes, dans lequel toutes les liaisons CH ont été remplacées par les liaisons FC. Ils ont la capacité de dissoudre des quantités importantes des nombreux gaz y compris l'oxygène et le dioxyde de carbone. Les PFC transportent l'oxygène sous forme dissoute dans l'émulsion qu'ils forment. Fluosol-DA<sup>®</sup> (Alpha Therapeutics of Grifols, Los Angeles, CA, USA) était le seul transporteur d'oxygène approuvé par le FDA pour utilisation en clinique avant d'être retiré. Les PFC ont une très forte solubilité pour l'oxygène, mais contrairement à l'hémoglobine (Hb), ils libèrent l'oxygène de façon linéaire par rapport à la  $PO_2^{110}$  (**Figure 11**). Donc, la majorité de l' $O_2$  va se libérer avant d'arriver au réseau capillaire où se produit l'échange de gaz sanguins. Plusieurs chercheurs ont réussi à conserver des organes plus de 24 h à 4°C en utilisant différentes solutions de conservation supplémentées par des PFC oxygénés par la two-layer method

(TLM) et les études ont démontré de bonnes fonctions pour le pancréas<sup>111,112</sup>, le cœur<sup>113,114</sup>, l'intestin<sup>115</sup> et le rein<sup>116</sup> après leur transplantation. Les études des PFC sur les animaux semblaient montrer une amélioration pour le transport et la libération de l'O<sub>2</sub>, mais pour obtenir cet effet les animaux (et patients) devaient inspirer de l'O<sub>2</sub> pur.<sup>110</sup> Or, cette situation doit être évitée en clinique en raison de la toxicité de l'oxygène sur les poumons. Pour être efficace, les PFC doivent être émulsifiés avec un agent émulsifiant tel que des lipides qui conduisent à moins de PFC par volume par rapport aux solutions pures et ensuite moins d'oxygène dissous et transporté par ces produits. Il n'y a pas à ce jour d'étude sur les PFC testés dans les machines de perfusion.



**Figure 11: Courbes d'équilibre de l'oxygène représentant des transporteurs d'oxygène par rapport aux globules rouges humains. αα-Hb : αα-Hémoglobine**

*(Photo de Vox Sanguinis (2006) 91, 102-110. DOI : 10.1111/j.1423-0410.2006. 00789.x)*

### 1.7.2.2. *Transporteur d'oxygène à base d'hémoglobine de mammifères (hemoglobin- based oxygen carriers)*

Les transporteurs protéiques d'oxygène basés sur l'hémoglobine (en anglais : Hemoglobin-Based Oxygen Carrier -HBOC) ont été développés comme substitut sanguin. Les HBOC sont obtenus par purification d'hémoglobine bovine (Hemopure<sup>®</sup>, Baxter) ou par synthèse de l'hémoglobine humaine par génie génétique (Optro<sup>®</sup>, Baxter), puis ces Hb sont modifiées chimiquement pour augmenter leur stabilité hors des globules rouges.<sup>117</sup> L'idée d'utiliser l'Hb purifiée comme substitut universel pour les globules rouges a été émise il y a près d'un siècle. Jusqu'à aujourd'hui, aucun produit sûr n'a encore été mis au point car le sang dans son ensemble a des composants et des fonctions diverses tel que transport d'oxygène, l'hémostase, la coagulation et la tension des vaisseaux. Bien que l'idée de l'HBOC soit basée sur les propriétés uniques de fixation de l'oxygène de l'Hb,<sup>118</sup> les effets de ce type de transporteur d'oxygène n'ont jamais été évalués en préservation d'organe.

L'un des principaux défis auxquels est confronté le développement des HBOCs est leur effet vasoconstricteur augmentant les résistances vasculaires systémiques et pulmonaires et donc augmentant la pression artérielle. En effet, l'HBOC, contrairement à l'Hb contenue dans les globules rouges, n'est plus entourée de molécules antioxydantes empêchant l'Hb riche en fer d'oxyder les molécules environnantes.<sup>119</sup> Dans le plasma, l'Hb libre et les HBOCs consomment l'oxyde d'azote (NO) tout en subissant une oxydation soit par NO-dioxygénation de l'oxy-Hb aboutissant à la formation de metHb (non oxygen- carrying ferric heme iron « Fe<sup>+3</sup> ») et de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans les artères, soit par nitrosylation du fer de la déoxy-Hb (formation de NO-Hb) dans les veines.<sup>119,120</sup>

Le NO, est un vasodilatateur endothélial puissant qui inhibe la contraction des cellules musculaires lisses et inhibe la conversion de la proendotheline en

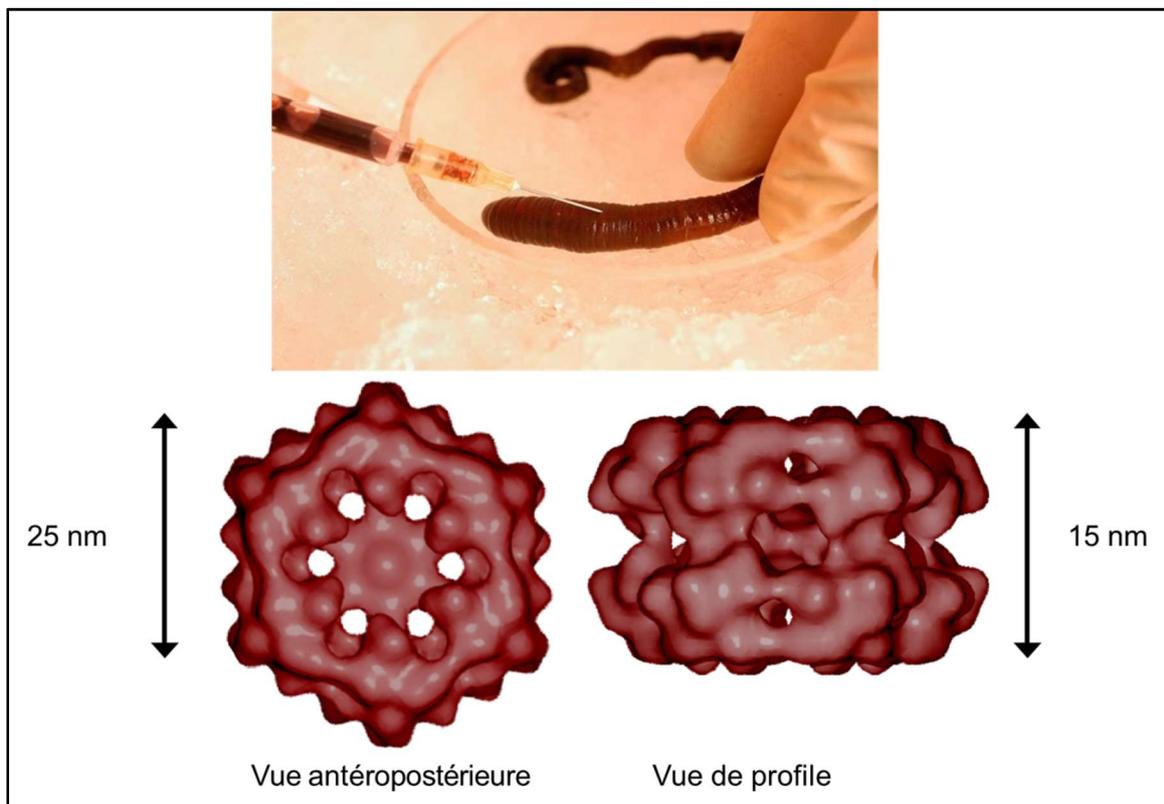
endotheline, cette dernière est sécrétée par l'endothélium et un effet vasoconstricteur puissant sur les cellules musculaires lisses. En présence d'HBOCs, la diminution de la concentration de NO due à sa réaction avec l'hémoglobine extracellulaire est responsable de la vasoconstriction. De plus, les processus d'oxydation associés à l'hémoglobine extracellulaire sont bien caractérisés *in vitro* et peuvent entraîner une fuite d'hème, une formation de radicaux libres, une fuite de fer réactif provoquant des lésions cellulaires importantes.<sup>120,121</sup>

### 1.7.2.3. Hémoglobine de ver marin

L'hémoglobine du ver marin *Arenicola Marina* (HbAm) est une hémoglobine extracellulaire qui est en solution dans le système circulatoire du ver. L'HbAm est sans typage sanguin, possède naturellement une activité antioxydant (de type superoxyde dismutase) la rendant moins toxique que l'Hb libre des mammifères.<sup>122</sup>

Les propriétés physicochimiques de cette hémoglobine ont été en partie caractérisées par l'équipe de recherche CNRS UMP 7144 (Station de Roscoff, équipe du Dr. F Zal). Cette hémoglobine peut lier l'oxygène et d'autres ligands gazeux réversiblement.<sup>122</sup> HbAm est une macromolécule (3600 kDa) ayant une très haute affinité pour l'oxygène : une molécule d'HbAm est capable de fixer 156 molécules d'oxygène (**Figure 12**). L'HbAm est capable de fonctionner à faible température (4°C), ce qui fait que ce transporteur d'oxygène pourrait être adapté à la conservation hypothermique des greffons. Thuillier *et al.* ont montré que l'ajout d'HbAm dans la solution de conservation statique améliore les résultats de la transplantation rénale dans un modèle porcin d'autotransplantation<sup>123</sup>. Cette hémoglobine semble un additif approprié aux liquides de conservation afin de limiter les lésions induites par le manque d'oxygène dans l'organe lors de l'ischémie et lutter contre le syndrome d'IR.

Par ailleurs, l'HbAm est en cours de validation par l'ANSM afin d'être utilisée en clinique. De nombreux tests ont d'ores et déjà été effectués et montrent l'absence d'immunogénicité, de génotoxicité ou de vasoactivité chez le rongeur.<sup>122</sup> Toutes ces données supportent l'évaluation des bénéfices de la supplémentation du liquide de conservation avec l'HbAm dans la machine de perfusion.



**Figure 12: Structure d'hémoglobine du ver marin (*Arenicola Marina*)**

(Photo de R. Thuillier doi : 10.1111/j.1600-6143.2011.03614.x)

# **BUTS DE PROJET**

## 2. But du projet

Les modalités de conservation influencent la reprise de fonction rénale et la survie de greffon. Donc, la communauté scientifique doit répondre à certaines problématiques majeures de la conservation rénale avant transplantation :

- Choix du type de MP.
- Choix de l'oxygénation lors de la perfusion du greffon.
- Choix de la composition de solution de préservation et notamment ajout ou non d'un transporteur d'oxygène.

Afin d'y répondre, dans ce projet, nous avons cherché à évaluer dans notre modèle expérimental porcin de DCD l'intérêt de l'utilisation de la machine de perfusion WAVES<sup>®</sup> avec et sans oxygénation active et en ajoutant de l'hémoglobine du ver marin *Arenicola Marina* (HbAm) dans la solution de perfusion (Pulsatile perfusion solution - Perf-GEN<sup>®</sup>) durant la période d'ischémie froide.

Ce travail de thèse a donc eu pour objectifs d'évaluer dans un modèle de perfusion rénale durant l'ischémie froide :

1. L'effet de la perfusion en machine WAVES<sup>®</sup> à sur la fonction des greffons après transplantation.
2. L'effet de l'oxygénation active durant la perfusion sur la fonction des greffons après transplantation.
3. Les effets d'HbAm durant la perfusion sur la fonction des greffons après transplantation.

# **METHODE ET MATERIELS**

### 3. Méthode et Matériels

Nous avons inclus **30** porcs de type Large White repartis en cinq groupes :

- Groupe I (**NEP**) : groupe témoin (Uni néphrectomisé) (n=6).
- Groupe II (**W**) : PERF-GEN<sup>®</sup> seul + Non-oxygénation active (n=6).
- Groupe III (**W-O2**) : PERF-GEN<sup>®</sup> seul + Oxygénation active (O<sub>2</sub> 100%) (n=6).
- Groupe IV (**W-M101**) : PERF-GEN<sup>®</sup> + 2 g/L HbAm + Non-oxygénation active (n=6).
- Groupe V (**W-O2+M101**) : PERF-GEN<sup>®</sup> + 2 g/L HbAm + Oxygénation active (O<sub>2</sub> 100%) (n=6).

Les animaux du groupe I ont subi une néphrectomie du rein droit et le rein gauche natif a été laissé en place. Les reins des animaux transplantés (groupe II, III, IV, V) ont subi une ischémie chaude de 60 minutes suivie de 23h de conservation en machine de perfusion (WAVES<sup>®</sup>) contenant de solution de conservation (pulsatile perfusion solution (PERF-GEN<sup>®</sup>)). Pour les groupes IV et V, nous avons ajouté 2 g/L d'HbAm dans la solution de conservation PERF-GEN<sup>®</sup>. Dans les groupes III et V, la machine de perfusion est connectée à l'apport en oxygène pour avoir une oxygénation active (O<sub>2</sub> 100%) aux taux de 1L/min. Dans les groupes II et IV, la machine de perfusion n'est pas connectée à la source d'oxygénation active, mais l'oxygène peut diffuser dans le liquide de conservation et donc dans le rein de façon passive à l'aide de la membrane d'oxygénateur (oxygenator membrane) dans la cassette et donc le taux d'oxygène dans la cassette dans ce cas-là est égal de celui de l'atmosphère (21%) (**Figure 13**). Le travail chirurgical s'est déroulé au sein de la plateforme MOPICT (site du Magneraud, INRA, Surgères, France) et les analyses expérimentales ont eu lieu dans l'unité de recherche INSERM U1082 à Poitiers.

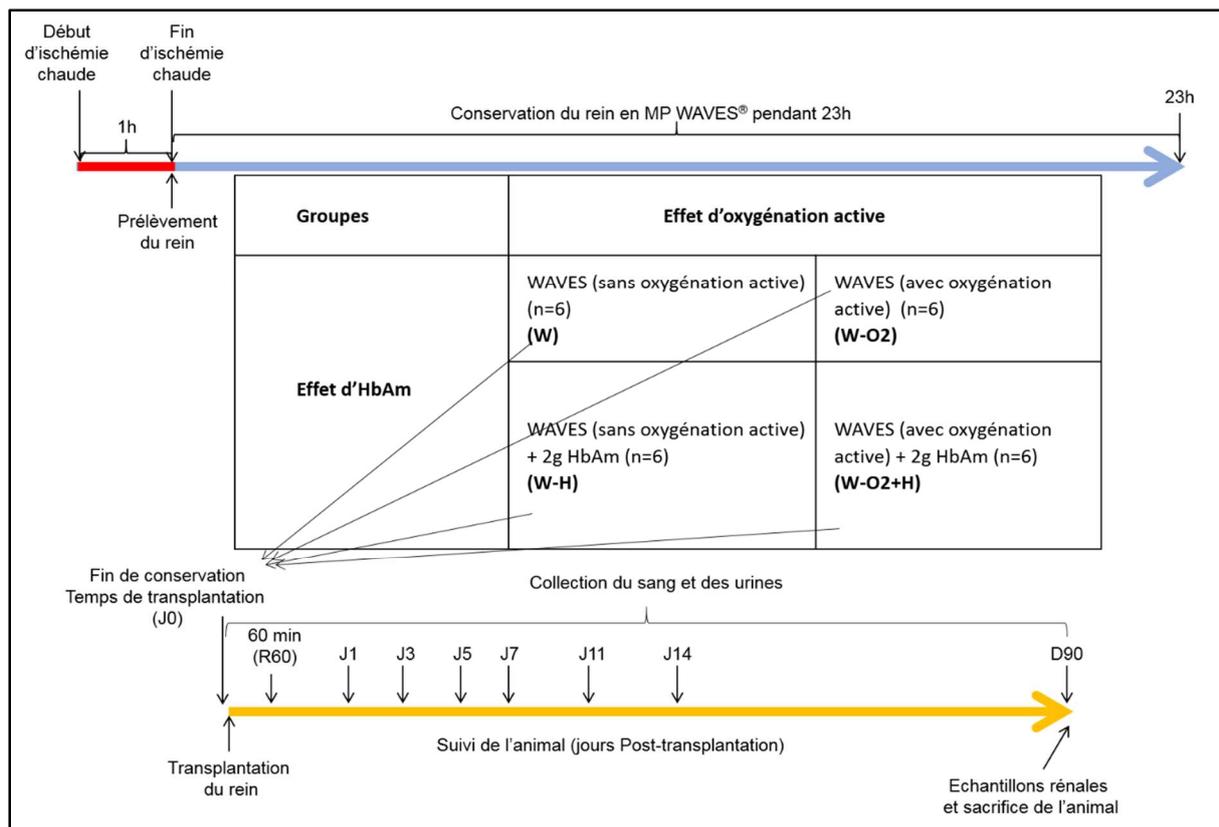


Figure 13: Plan expérimental de l'étude

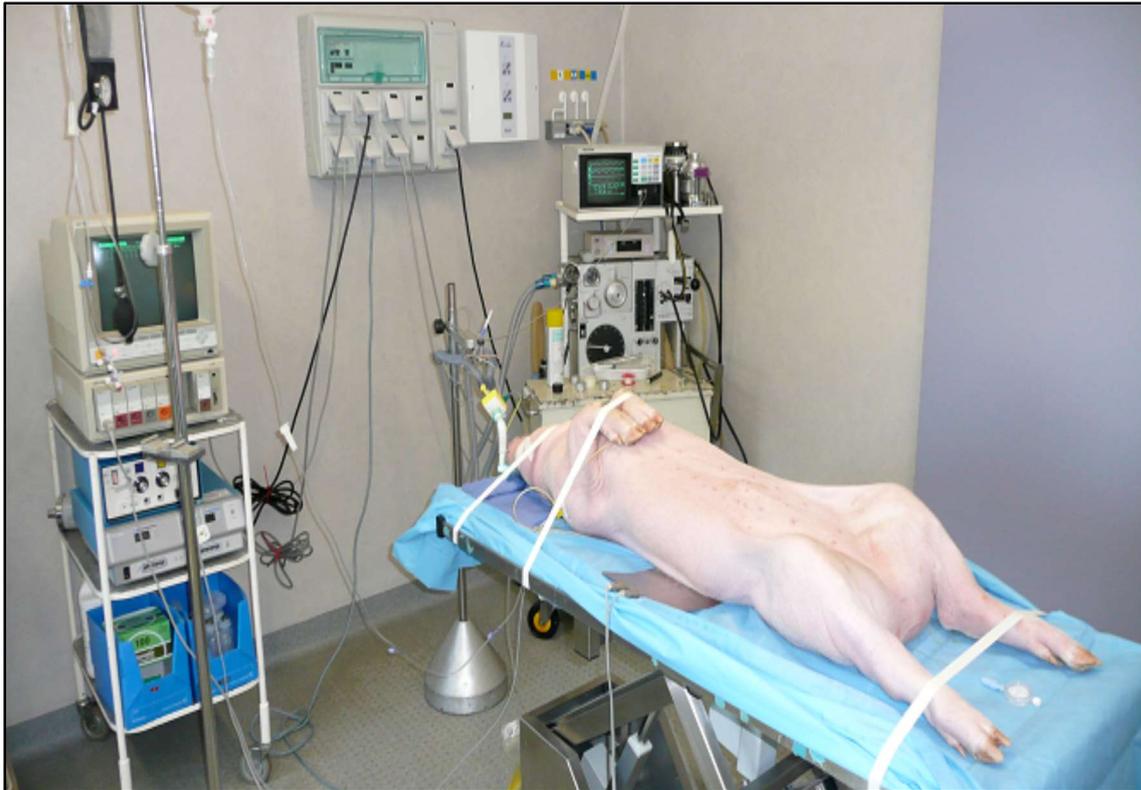
### 3.1. Animaux

Afin de n'étudier que les effets de la conservation et de l'apport d'oxygène sur la fonction des greffons, nous avons choisi d'utiliser un modèle d'autotransplantation rénale chez le porc afin de nous affranchir des effets confondants du rejet immunitaire. Nous avons utilisé des porcs Large White mâles, âgés de 3 mois d'un poids de  $40 \pm 5$  kg, (INRA, GENESI, Le Magneraud à Surgères, France). Les animaux ont été préparés selon la méthode développée par l'unité INSERM au sein de la plateforme MOPICT-IBiSA. Les animaux étaient placés dans des boxes individuels à une température ambiante constante ( $23^{\circ}\text{C}$ ). La nourriture est retirée 24 heures avant l'intervention chirurgicale. Le rein gauche a été prélevé après une heure d'ischémie chaude *in situ*. Ensuite le rein a alors été conservé pendant 23 heures en machine de perfusion WAVES® (Waters Medical Systems, Rochester, MN, USA). Avant de réimplanter le greffon dans le même animal, nous avons réalisé une néphrectomie

controlatérale afin de mimer la réduction de la masse néphronique présente chez les patients transplantés. Toutes les manipulations réalisées chez l'animal sont en conformité avec les recommandations des Ministères de l'Agriculture, de la Santé et de la recherche dans le respect des règles éthiques et avec l'accord des comités d'éthique régional du Poitou-Charentes et national (Numéro d'accréditation du comité C2EA-84, Numéro d'agrément du protocole : CE2012-4).

### 3.2. Protocole d'anesthésie

L'anesthésie a été assurée par les techniciens du laboratoire, Mr W. HEBRARD et Mme I. LAUNAY. L'animal installé en décubitus dorsal (**Figure 14**), a été anesthésié au masque de Hunter par un mélange de Sévoflurane (Sévorane<sup>®</sup>, Baxter, USA) 8% associé à du protoxyde d'azote et de l'oxygène en proportions égales. Un cathéter de 20 gauge en plastique (Becton Dickinson Vascular Access Inc. Sandy, UT, USA) a été inséré dans une veine marginale de l'oreille gauche.



**Figure 14: Installation de l'animal en position décubitus dorsal**

L'anesthésie a été maintenue à l'aide de Propofol (B. Braun, Melsungen, Germany) 4 mg/kg IV, Midazolam (Mylan, Saint-Priest, France) 0,05 mg/kg IV, Fentanyl (Mylan, Saint-Priest, France) 1 g/kg IV, Rocuronium (B. Braun, Melsungen, Germany) 1mg/kg IV et une sonde d'intubation orotrachéale (n° 6,5) (Covidien, Mansfield, MA, USA) a été mise en place sous contrôle laryngoscopique, l'animal a été ventilé par respirateur Dräger Primus (Drägerwerk AG & Co., Lübeck, Germany). La ventilation contrôlée a été pratiquée avec une fréquence respiratoire de 20/min et le taux CO<sub>2</sub> expiré a été maintenu entre 35 et 45 mm Hg.

L'anesthésie a ensuite été entretenue à l'aide de Midazolam (bolus 0,05 mg/kg) et de Rocuronium (bolus 0,5 g/kg) toutes les 30 minutes jusqu'à laparotomie. Une perfusion de 1,25 g/kg/h de Fentanyl soit 50 mg/h a été réalisée puis arrêtée 45 minutes avant la mise en réveil. Une perfusion de 3 mg/kg/h de Propofol soit 120 mg/h a également été réalisée puis arrêtée à la fermeture de la laparotomie. La surveillance peropératoire a été assurée par le

contrôle de la fréquence cardiaque, de la saturation en oxygène et de la température de l'animal. Les pertes hydrosodées ont été compensées par 10 ml/kg/h de gélofusine 4% (B. Braun, Melsungen, Germany). Une sonde gastrique (Covidien, Mansfield, MA, USA) a été mise en place et enlevée en fin d'intervention.

### 3.3. Protocole chirurgical

#### 3.3.1. Mise en place un cathéter jugulaire externe gauche

L'animal en décubitus dorsal, un cathéter jugulaire externe gauche (Promed, Le Plessis-Bouchard, France) a été posé par cervicotomie et extériorisé après un trajet sous-cutané derrière l'oreille gauche (**Figure 15**). Ce cathéter a été laissé en place pendant 15 jours pour assurer l'administration intraveineuse des solutés de réanimation et les prélèvements sanguins.

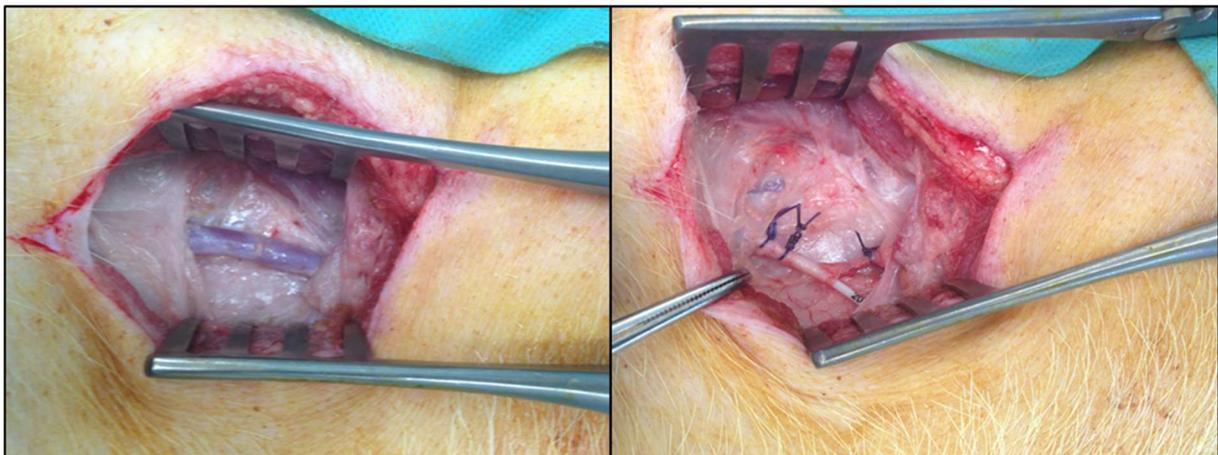
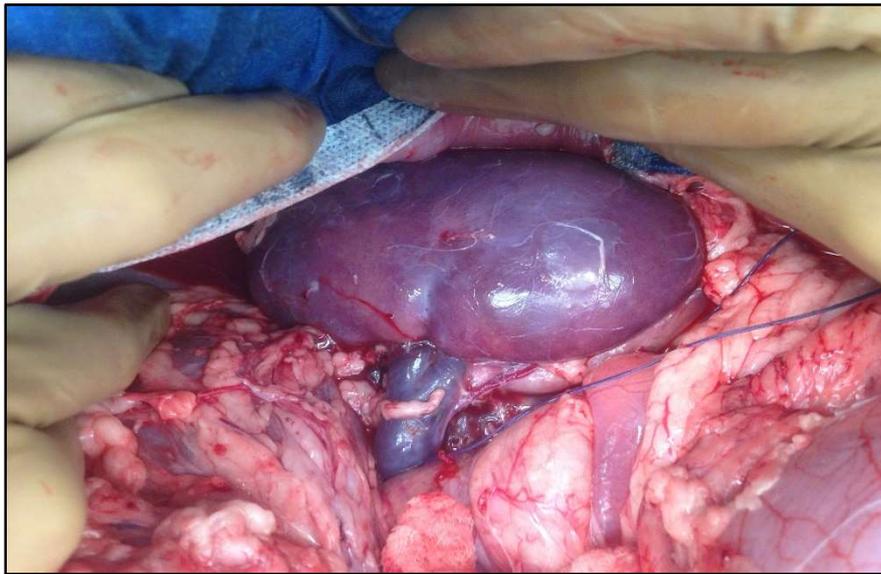


Figure 15: La veine jugulaire externe gauche avant (gauche) et après (droite) la mise en place le cathéter

### 3.3.2. Prélèvement du rein gauche après une heure d'ischémie chaude

Via une incision transrectale gauche, le rein gauche a été bordé par voie extra péritonéale. L'artère et la veine rénales gauche ont été disséquées respectivement jusqu'à l'aorte et la veine cave inférieure. L'uretère gauche a été disséqué sur environ 15 cm.

5000 UI d'héparine (Sanofi-Aventis, Gentilly, France) est induite in situ par clampage de l'artère puis de la veine rénale par une ligature pendant 60 minutes afin de reproduire les conditions d'ischémie chaude présentes chez les DCD (Figure 16).



**Figure 16: Abord par voie extra péritonéale et clampage du rein gauche**

Au bout d'une heure, la néphrectomie gauche a été réalisée et le rein a été immédiatement plongé dans un sérum physiologique à 4°C. L'artère rénale a été canulée, le rein a été rincé avec 700 ml de la solution de conservation (PERF-GEN®) refroidi à 4°C (Figure 17). Le rein a ensuite été pesé et placé sur la machine afin de débiter la perfusion pendant 24h.

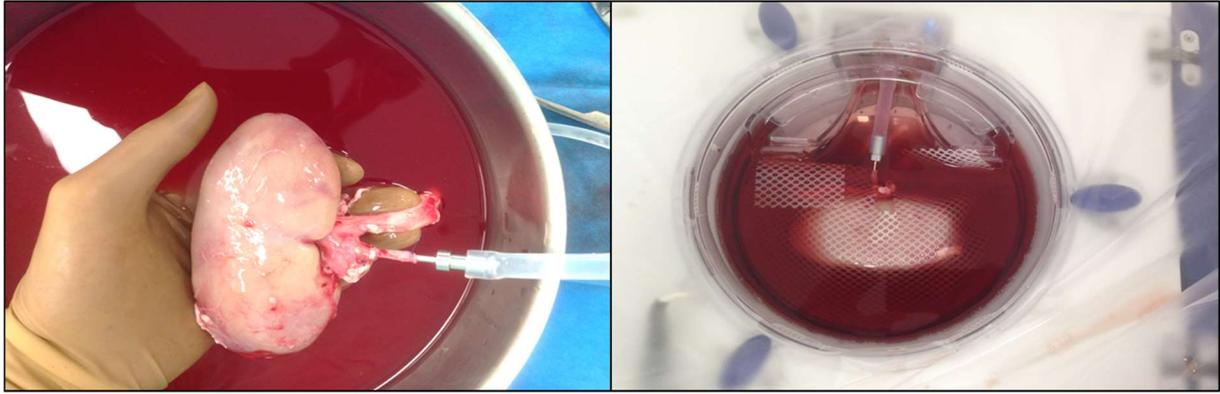


Figure 17: Lavage du rein avec la solution PERF-GEN® (gauche). Le rein fixé dans la cassette en MP WAVES® (droite)

Une fois le prélèvement terminé, l'incision abdominale a été suturée plan par plan par un chirurgien à Novosyn® (B. Braun, Melsungen, Germany), et l'animal a été placé dans une cage métabolique individuelle (Figure 18).

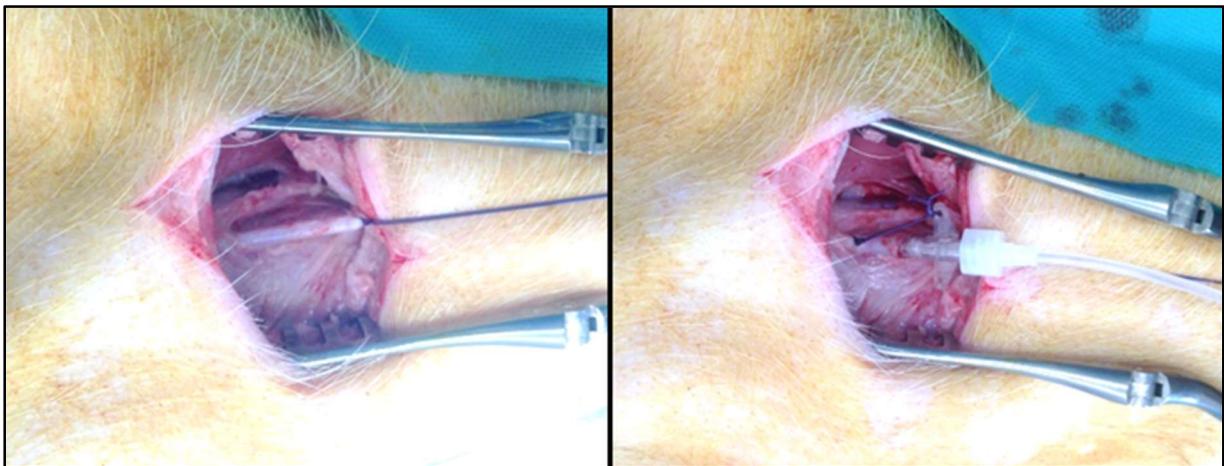


Figure 18: L'animal transplanté en cage métabolique individuelle

### 3.3.3. Auto-transplantation

Au terme des 24 heures de conservation en machine de perfusion WAVES®, le porc a de nouveau été endormi selon le protocole d'anesthésie suscitée.

En décubitus dorsal, une cervicotomie droite a été réalisée afin d'aborder l'artère carotide interne droite qui a été liée et une artériotomie transversale a été effectuée permettant de mesurer la pression artérielle tout au long de l'intervention (**Figure 19**). L'incision abdominale a été reprise, puis une néphrectomie droite a été réalisée par voie extra péritonéale après ligature pédiculaire. Ensuite l'aorte abdominale et la veine cave inférieure ont été exposées de côté antérolatérale gauche sur environ 15 cm par décollements colo-pariétal et duodénal.

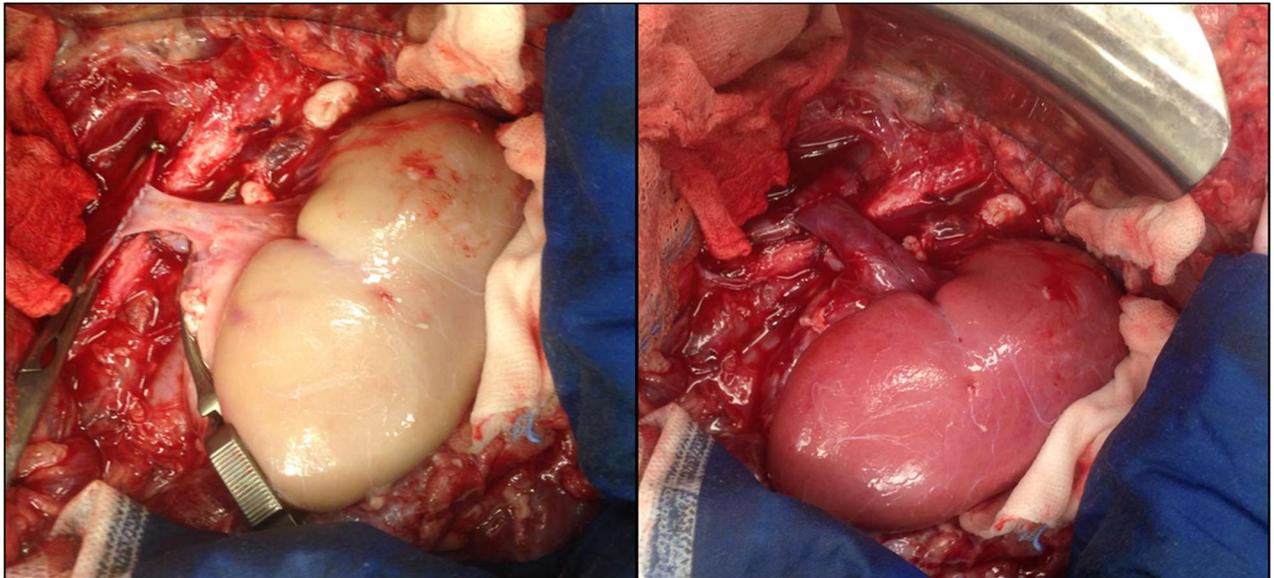


**Figure 19: L'artère carotide interne droite avant (gauche) et après (droite) avoir mis le cathon**

5000 UI d'héparine sodique ont été injectés en bolus 10 minutes avant le clampage aortique.

La réimplantation du greffon rénal a débuté par l'anastomose artérielle. L'aorte a été clampée latéralement par un clamp de Satinsky. Une artériotomie a été effectuée et une anastomose termino-latérale a été réalisée avec du fil de polypropylène 5/0 (Covidien, Mansfield, MA, USA). Un clamp Bulldog a été posé sur l'artère rénale et l'aorte a été déclampée. Ensuite l'anastomose veineuse a été pratiquée sur la veine cave inférieure. Pour cela, la veine cave a été clampée latéralement par un clamp de Satinsky. Une veinotomie longitudinale large a été pratiquée et l'anastomose termino-latérale a été réalisée avec du fil de polypropylène 5/0. Une

fois l'anastomose veineuse terminée, déclampage artérielle et veineuse ensemble ont été effectuée (**Figure 20**). La durée des anastomoses vasculaires a été de  $30\pm 5$  minutes.



**Figure 20:** Le greffon rénal avant (gauche) et après (droite) la déclampage des vaisseaux rénaux

La transplantation est achevée par le rétablissement de la continuité urinaire via une anastomose urétéro-urétérale directe avec un fil résorbable de PDS 4/0. Cette anastomose a été protégée par une endoprothèse double J de longue durée (Karl Storz ; GmbH & Co, Tuttlingen, Germany) qui a été laissée en place jusqu'au sacrifice de l'animal. Le rein a été rétro-péritoinisé et la paroi est fermée.

### 3.4. Suivi post-opératoire

La surveillance a été assurée tous les jours par les techniciens du laboratoire. Les porcs auto transplantés ont été surveillés dans des cages métaboliques individuelles pendant 7 jours (**Figure 18**). Ces cages ont permis les recueils quotidiens d'urine et de sang pendant cette période.

Les animaux ont reçu les traitements suivants :

- ❖ **Analgésie** : 20 mg de nalbuphine (Mylan, Saint-Priest, France) ont été systématiquement administrés le jour de l'intervention et les deux jours suivants. Les doses ont été renouvelées en fonction du comportement de l'animal.
- ❖ **Antibioprophylaxie** : amoxicilline et acide clavulanique (Sandoz, Levallois-Perret, France) 1 g/j IV le jour du prélèvement et les 7 jours suivants. Puis amoxicilline IM à chaque biopsie rénale effectuée.
- ❖ **Rééquilibration hydro électrolytique** : 2000 ml/j de NaCl 0,9% (B. Braun, Melsungen, Germany), sont perfusés avec une pompe Abott® avant la reprise de diurèse. A la reprise de diurèse, une compensation volume à volume de la diurèse a été instaurée en plus des 500 ml de perfusion de base pendant les premières 48 heures. Si la diurèse dépassait 4000 ml, 1 à 2 grammes de KCl par litre de NaCl 0,9% ont été perfusés.
- ❖ **Diurétiques** : 125 mg de furosémide (Sanofi-Aventis, Gentilly, France) ont été administrés le jour de la greffe puis la dose a été adaptée à la diurèse.
- ❖ **Eau et alimentation** : l'animal a été laissé à jeun le jour suivant la transplantation. L'eau a été réintroduite à J2 et l'alimentation à J3.

Au terme de ces 7 jours de surveillance, les animaux ont été gardés pendant 3 mois en box individuel avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Le porc n'ayant pas repris de diurèse au terme des 7 jours de surveillance en cage métabolique (défini comme une non-fonction primaire) sera sacrifié.

## 3.5. Sacrifice

Trois mois après l'autotransplantation, l'animal a été endormi au masque. En décubitus latéral droit, une lombotomie sous costale a été pratiquée en incisant plan par plan jusqu'au péritoine qui a été décollé de l'espace rétropéritonéal pour laisser apparaître le rein autotransplanté. Puis le pédicule du greffon a été clampé en masse et une injection d'un bolus de KCl (0,04g/kg) en intraveineux a été effectuée où l'animal meurt dans les secondes qui suit l'injection par un arrêt cardiaque.

Après la transplantectomie, des échantillons de médullaire et de cortex du greffon ont été prélevés immédiatement et conservés dans le formol tamponné à 10% pour permettre la réalisation des analyses histologiques plus tard. Des morceaux cortex du greffon ont également été prélevés et disposés dans un tube avant de plonger dans l'azote liquide afin de conserver à -80°C pour les analyses futures.

## 3.6. Paramètres de surveillance cliniques et biologiques

### 3.5.1. Analyses biochimiques

Toutes les analyses biochimiques sanguines et urinaires sont réalisées dans le service de biochimie du CHU de Poitiers par analyseur modulaire Cobas 8000® (Roche Diagnostics, France).

#### 3.5.1.1. Fonction rénale

Afin d'évaluer la fonction du greffon, nous avons examiné :

- ❖ La survie des animaux (correspondant à la survie des greffons).

- ❖ La reprise de diurèse : quantifiée par les mictions sur 24 h grâce au recueil des urines de J0 à J7 et puis à J11, J14, M1 et M3. Elle est significative pour des volumes d'urine supérieurs à 500 ml.
- ❖ La créatinémie : la mesure de la créatinine plasmatique a été réalisée grâce aux prélèvements sanguins effectués à J0, R60, J1, J3, J5, J7, J11, J14, M1 et M3 post-transplantation.
- ❖ La clairance de la créatinine et la fraction d'excrétion du sodium (FeNa) : nous avons étudié à J0, J1, J3, J5, J7, J11, J14, M1 et M3 post-transplantation la reprise biologique de fonction du greffon par l'évaluation de la clairance de la créatinine et de la fraction d'excrétion du sodium (FeNa) selon la formule :

$$FeNa = \frac{Natriurie \times Créatininémie}{Natrémie \times Créatininurie} \times 100$$

- ❖ Le débit de filtration glomérulaire (GFR) : le dosage de créatinine est notre critère de jugement principal pour la fonction glomérulaire. Alors, nous avons calculé le GFR selon la formule :

$$GFR = \frac{Débit Urinaire \times Créatininurie}{Créatininémie}$$

- ❖ Protéinurie : nous avons mesuré la protéinurie sur 24 h grâce au recueil des urines de J0 à J7 puis à J11, J14, M1 et M3. Ensuite nous avons recensé le ratio de protéinurie sur la créatininurie.

### 3.5.1.2. Lactate déshydrogénase plasmatique

Nous avons mesuré le taux de lactate déshydrogénases plasmatique (LDH) à J0, R60, J1, J3, J5, J7, J11, J14, M1 et M3 post-transplantation.

### 3.5.1.3. Biomarqueurs de lésion rénale

Nous avons mesuré le taux sérique de NGAL, KIM-1, IL-18 et ASAT en tant que biomarqueurs de lésion rénale pendant la première semaine post-transplantation à l'aide des kits d'ELISA destiné à chaque type biomarqueur et selon les instructions de fabricant. NGAL (Réf. Eurobio, 044), KIM-1 (Réf. Eurobio, EP0102), IL-18 (Réf. Invitrogen, BMS672) et ASAT (Réf. Roche, 05850819190). Malheureusement, nous n'avons pas pu réaliser ces dosages dans les urines suite à des problèmes techniques de conservation des urines.

## 3.5.2. Analyses histopathologiques

Les morceaux du cortex rénal prélevés à la fin de 3 mois de suivi ont été conservés dans une solution du formol et puis inclus en paraffine. Les coupes de tissus ont été déparaffinées par des bains successifs aux histosol et concentrations différentes d'éthanol et puis coloré selon la coloration d'intérêt afin de réaliser les études histologiques. Les lames sont lues en aveugle par un pathologiste senior au service d'anatomopathologie du CHU de Poitiers.

### 3.5.2.1. Coloration à l'acide périodique de Schiff et à l'hématoxyline éosine-safran

Les coupes déparaffinées sont colorées à la coloration à l'Acide Périodique de Schiff (PAS) et à l'Hématoxyline Eosine Safran (HES) avec la machine Leica ST5020 (Leica Biosystems, Nussloch GmbH, Germany) dans le service d'anatomopathologie du CHU de Poitiers. Le PAS colore en rose les membranes basales et les bordures en brosse

des tubules. L'Hématoxyline colore en bleu-violet le noyau les fibres, l'éosine colore en rouge-rosé le cytoplasme et le safran colore les fibres conjonctives en jaune-orangé. Ces colorations nous permettent d'évaluer l'étendue de la nécrose et le degré de 'inflammation interstitielle selon l'échelle/score suivante :

#### **Cortex NTA 1-4**

1. Pas de lésions
2. Lésions 0-25%
3. Lésions 25-50%
4. Lésions 50-100%

#### **Inflammation**

1. Pas d'inflammation
2. Inflammation minime
3. Inflammation modérée
4. Inflammation sévère

#### **Fibrose interstitielle-atrophie tubulaire (FIAT)**

1. Absente
2. Minime
3. Modérée
4. Sévère

### **3.5.2.2. Coloration Rouge Sirius**

Les coupes déparaffinées sont couvertes par la solution de rouge Sirius pendant 30 minutes. Ensuite le colorant est rincé avec d'acide acétique 5% et d'éthanol 95% et 100%. Les fibres de collagène sont colorées en rouge, permettant de caractériser la fibrose

rénale. La surface colorée en rouge a été mesurée sur au moins 10 photos pour chaque lame. La fibrose rénale est exprimée en pourcentage de la surface examinée à l'aide de logiciel (Irfan View- Image Viewer version 4.38 1996-2014 by Irfan Skiljan, Autriche).

### 3.5.2.3. Immunohistologie anti-Vimentine

Les coupes déparaffinées sont démasquées antigénique en les mettant dans un bain contenant un tampon de 1X (60ml de tampon 10X « Tris 1,21g, EDTA 0,37g qsp 1000 ml d'eau distillée, mettre à pH 9 » + 540ml d'eau distillée + 300µl de tween 20) à 95-100°C pendant 30 minutes sous agitation puis nous avons laissé les lames refroidir jusqu'à une température d'environ 50°C afin de les laver à l'eau distillée. Après lavage en sérum physiologique et un temps d'incubation nécessaire en eau oxygéné à 0,3% (10 min), nous avons mis l'anticorps primaire vimentine (Cell marque, mouse monoclonal antibody V9, Réf : 347M-16) pendant une heure suivie par l'anticorps secondaire : Anti-mouse prêt à l'emploi (EnVision+ System-HRP, Réf: K4000) pendant 30 min à température ambiante. La coloration a été interprétée à l'aveugle par un pathologiste senior au service d'anatomopathologie au CHU de Poitiers.

### 3.5.2.4. Immunohistologie anti-CD117+ (Mastocyte)

Afin de détecter l'infiltration des mastocytes dans les tissus rénaux, 3 mois après transplantation, un immunomarquage anti CD117 (Anticorps anti CD117, Dako, Réf: A4502) a été réalisé sur les coupes de tissus rénaux au sein du laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Poitiers.

### 3.5.3. Analyses protéomiques

#### 3.5.3.1. Quantification des protéines tissulaires par Western blot

Sur des tissus de greffon 3 mois après transplantation, afin de caractériser la fibrose et l'inflammation, différentes protéines impliquées dans ces processus physiopathologiques ont été quantifiées par la technique de Western Blot<sup>124</sup>. Les protéines étudiées sont CTGF (1/500<sup>ème</sup>), MMP-2 (1/200<sup>ème</sup>), Pai-1 (1/2500<sup>ème</sup>), tPA (1/500<sup>ème</sup>), IL-10 (1/2000<sup>ème</sup>), iNOS (1/1000<sup>ème</sup>), Smad 2/3 (1/200<sup>ème</sup>), Psmad 3 (1/2500<sup>ème</sup>), FoxP3 (1/1000<sup>ème</sup>), GP91<sup>phox</sup>(1/500<sup>ème</sup>). Ces protéines sont classées en deux catégories les protéines anti-fibrose et les protéines pro-fibrose.

##### 3.5.3.1.1. Extraction des protéines

Nous avons réalisé l'extraction des protéines à partir des homogénats de tissus rénaux afin de quantifier les protéines totales et de réaliser ensuite la technique de Western Blot. Environ 100 mg d'échantillon de tissu rénal / 900 µl de tampon de lyse 1X (5 ml de buffer IIII 2X (Réf. RB4477, Euromedex, France) + 1 pastille d'antiprotéase complète mini (Réf. 11697498001, Sigma-Aldrich, MO, USA) + 1 pastille d'anti phosphatase (Réf. 04906837001, Sigma-Aldrich, MO, USA) + 5 ml d'eau distillée), puis la solution est broyée pendant 15 secondes à 20000 rpm par polytron PT 10-35 GT (Distributing and mixing technology by Kinematica) pour obtenir un homogénat. Cet homogénat est décanté décanter pendant 1h à 4°C puis centrifuger à 12000 rpm pendant 15 minutes, afin de récupérer le surnageant contenant les protéines.

### 3.5.3.1.2. Dosage et préparation des extraits protéiques

Le dosage des protéines est effectué par le Kit Bicinchoninic Acid Protein Assay (BCA) (Réf. 1001868205, Sigma-Aldrich, MO, USA). L'homogénat qui a été préparée comme décrit ci-dessus est dilué au 1/25<sup>ème</sup> dans de l'eau, une gamme étalon de Bovine Serum Albumin (BSA : solution mère 1000 µg/ml) est effectuée (0, 50, 100, 200, 250, 500, 750 et 1000 µg/ml), 25 µl de chaque points (échantillons et gamme) sont mélangés à 200 µl d'un mix d'acide Bicinchoninic (BCA) et de Copper (II) Sulfate Pentahydrate 4% (pour une plaque 96 puits : 19 ml d'acide Bicinchoninic + 380 µl de Copper (II) Sulfate Pentahydrate 4%). Après incubation à 60°C pendant 15 minutes, l'absorbance de la gamme BSA et des échantillons est mesurée à 560 nm par un spectrophotomètre (Perkin Elmer, Victor). Les concentrations protéiques sont obtenues grâce à la régression linéaire réalisée à partir de la gamme étalon de BSA. Un aliquot de chaque extrait correspondant à une quantité de 80 µg de protéines totales est dilué dans un tampon dénaturant de Laemmli 4X (Tris-HCl 62,5 mM (Réf. Sigma T-7149 PM157.6), 10% glycérol (Réf. Euromedex EU3550-1Litre Pm92.09), 1% SDS à 20% (Réf. Euromedex EU0660-B), 0,005% Bleu de Bromophénol, 6% βMercaptoéthanol, pH 6,8) et chauffé à 100°C pendant 10 min.

### 3.5.3.1.3. Électrophorèse

12 µl de protéines totales de chaque échantillon et 10µl d'un marqueur de poids moléculaire (BioRad Precision Plus Protein Kaleidoscope) sont déposés dans les puits d'un gel d'électrophorèse (gels 26 puits Criterion TGX free, 4-15% / 4-20%) et une migration à 140 Volts, 3 Ampères pendant 45 à 60 minutes est réalisée dans un tampon de migration {H<sub>2</sub>O et Tris glycine sodium dodecyl sulfate (TG-SDS)}.

#### 3.5.3.1.4. Transfert sur membrane

Le transfert des protéines du gel d'électrophorèse est réalisé sur une membrane de Poly Vinylidene Fluoride (PVDF) par le système dit « Trans-blot® » (Bio-Rad) (Figure 21) pendant 7 minutes à 25V et 2,5A.



Figure 21: Trans-blot®

#### 3.5.3.1.5. Saturation des membranes

Les membranes sont ensuite saturées dans du Régilait à 5% ou dans de la BSA à 5% homogénéisés dans du tampon Tris Buffer Salin-Tween 20% {TBS-T EU0510) : 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20} sous agitation pendant 1 h à température ambiante afin de bloquer les sites de fixation non spécifiques.

### 3.5.3.1.6. Anticorps primaires et secondaires

Dans un premier temps, la membrane est incubée avec des solutions d'anticorps primaires dilués dans du lait à 5% ou de la BSA à 5% pendant la nuit à 4°C sous agitation, puis à température ambiante pendant 20 min. La membrane est lavée 3 fois 5 minutes au TBS-T et est incubée avec des solutions d'anticorps secondaires couplés à de la HRP (Horseshoe peroxidase) dilués dans du lait à 5% pendant 1h sous agitation à température ambiante. La membrane est lavées 3 fois 5 min avec du TBS-T.

### 3.5.3.1.7. Révélation

La membrane est incubée avec une solution contenant le substrat (Millipore X Luminata Forte Western HRP Substrate) pour l'HRP, permettant la révélation des bandes protéiques par l'émission de luminescence avec l'appareil ChemidocM (Bio-Rad) (Figure 22).



Figure 22: ChemiDoc® MP Imaging System (Bio-Rad)

### 3.5.3.2. Dosages des protéines plasmatiques par ELISA

Nous avons utilisé la technique d'Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) avec des kits spécifiques de l'espèce porcine pour doser KIM-1 (Réf. ELISA KIT : EP0102, Wuhan Fine Biotech Co. Ltd), HMGP-1 (Réf. ELISA KIT : SEA399PO, Cloud-Clane Corp. Tx. USA) NGAL (Réf. ELISA KIT: 044, Bio Porto Diagnostics, Denmark), IL-18 (Réf. ELISA KIT: BMS672, Invitrogen, Bander MedSystems GmbH, Austria).

La plaque est initialement recouverte par un anticorps de capture. Les échantillons ainsi qu'une gamme sont déposés dans les différents puits. Après un premier lavage, un anticorps de détection dirigé contre la protéine d'intérêt couplé à la biotine est ajouté. Suite le deuxième lavage, un complexe Streptavidine (molécule très affine pour la biotine) HRP (horseradish peroxidase) est ajouté. Après le troisième lavage, le substrat TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) ajouté est métabolisé par l'enzyme HRP, cette réaction de catalyse forme un produit coloré (jaune). Enfin, la réaction est stoppée par une solution acide, une coloration bleue apparaît et la concentration est mesurée par l'absorbance à 450 nm (Perkin Elmer 2030 Manager).

## 3.7. Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écartype standard (SD) en utilisant le logiciel GraphPad PRISM<sup>®</sup> version 5.01 (1992-2007 GraphPad Software, Inc.). Toutes les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R version 3.4.2 (2017 The R Foundation for Statistical Computing) en utilisant le test du Kruskal-Wallis et le test du Dunn

pour comparer les groupes. Tous les résultats pour lesquels la p value est inférieure ou égale de 0,05 sont considérés comme significatifs.

# RESULTATS

## 4. Résultats

### 4.1. Paramètres de perfusion

Nous avons perfusé tous les reins en machine de perfusion WAVES<sup>®</sup> pendant 23h. la pression du perfusât a été fixée à 40 mmHg au début de perfusion. Nous avons évalué l'évolution de différents paramètres de perfusion, tels que la pression systolique, la pression diastolique, le débit de perfusion et les résistances de perfusion, comme marqueurs de qualité de la perfusion hypothermique.

#### 4.1.1. Pression systolique

Pendant la première heure de la conservation en machine de perfusion WAVES<sup>®</sup>, la pression systolique varie entre les quatre groupes transplantés avant de se stabiliser plus tard. La pression systolique des reins du groupe V (W-O2+M101), au cours de la conservation en MP, était la plus basse comparée aux quatre groupes expérimentaux avec une moyenne de  $35,2 \pm 8,2$  mmHg. Tandis que les reins du groupe non oxygénation active (W) montrait une pression systolique plus élevée avec une moyenne de  $37,6 \pm 7,5$  mmHg (Figure 23). L'évolution de cette pression au cours de la conservation hypothermique en MP, chez les différents groupes expérimentaux, a été présentée sous forme d'aire sous la courbe (Area Under Curve AUC). Une différence significative a été mise en évidence entre le groupe V (W-O2+M101) vs le groupe II (W) ( $P = 0,003$ ) et le groupe IV (W-M101) ( $p = 0,05$ ) (Figure 24).

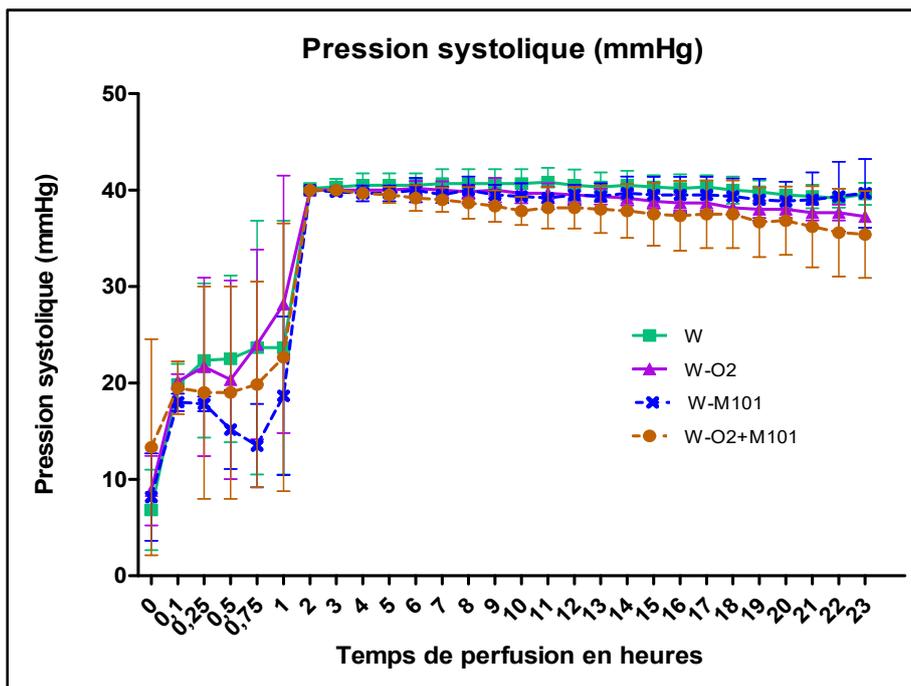


Figure 23: Évolution de pression systolique au cours de la conservation en MP WAVES® (23 h)

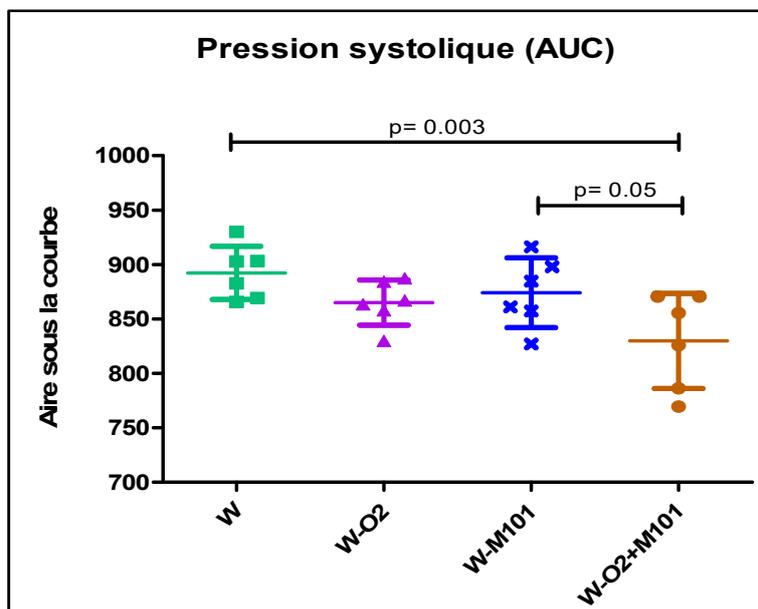


Figure 24: Évolution de pression systolique au cours de la conservation en MP WAVES®  
représentant l'aire sous la courbe dans les différents groupes transplantés

### 4.1.2. Pression diastolique

En parallèle à la pression systolique, la pression diastolique s'est stabilisée après 2h de perfusion. Au cours la conservation hypothermique en MP, la pression diastolique des reins de groupe II (W) était la plus élevée (moyenne de  $23,2 \pm 11,2$  mmHg) comparé aux quatre groupes expérimentaux. En revanche les reins du groupe V (W-O2+M101) ont affiché la plus basse pression diastolique avec une moyenne de  $18,7 \pm 11,6$  mmHg. Néanmoins, la pression diastolique des reins de groupes III et IV (W-O2, W-M101) était de respectivement  $20,9 \pm 9,5$  mmHg et  $19,7 \pm 10,2$  mmHg (Figure 25). L'évolution de la pression diastolique, illustrée par une aire sous la courbe (Figure 26) a mis en évidence une différence significative entre le groupe II (W) vs le groupe V (W-O2+M101) ( $p=0,04$ ) et le groupe II (W) vs le groupe IV (W-M101) ( $P=0,04$ ).

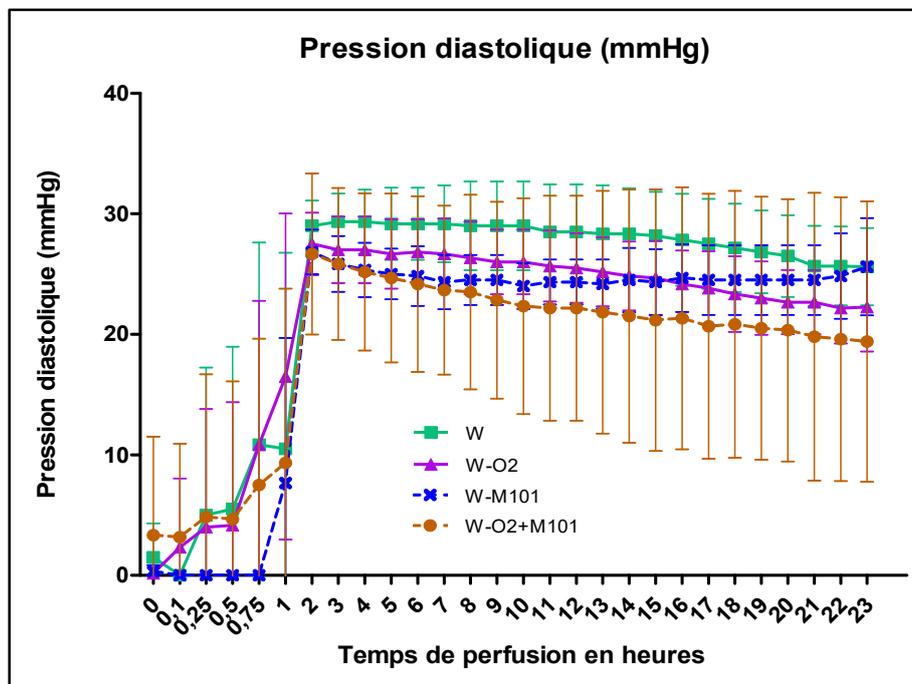


Figure 25: Évolution de pression diastolique au cours de la conservation en MP WAVES® (23 h)

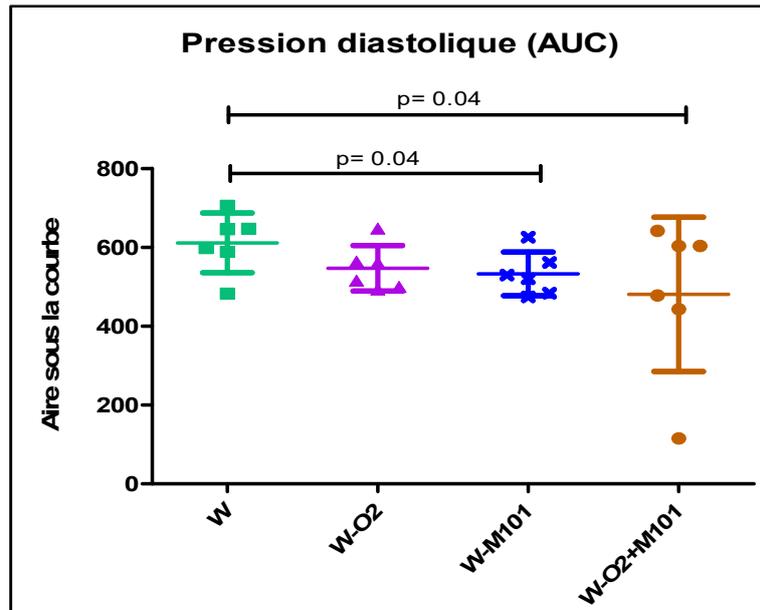


Figure 26: Évolution de pression diastolique au cours de la conservation en MP WAVES® représentant l'aire sous la courbe dans les différents groupes transplantés

#### 4.1.3. Débit de perfusion

Au cours de la conservation, l'analyse d'AUC (moyenne  $\pm$  écartype standard) a montré qu'il y a un meilleur débit de perfusion dans les groupes supplémentés avec HbAm (W-M101 et W-O2+M101) (respectivement  $982,6 \pm 174,9$  et  $995,1 \pm 513,1$ ) comparés aux groupes sans supplémentation d'HbAm (W et W-O2) (respectivement  $732,4 \pm 213,2$  et  $834,4 \pm 87,4$ ) (Figure 27). L'analyse statistique par le test de Kruskal-Wallis montre un effet significatif de l'ajout d'hémoglobine du ver marin entre le groupe II (W) vs le groupe IV (W-M101) ( $p=0,01$ ) (Figure 28).

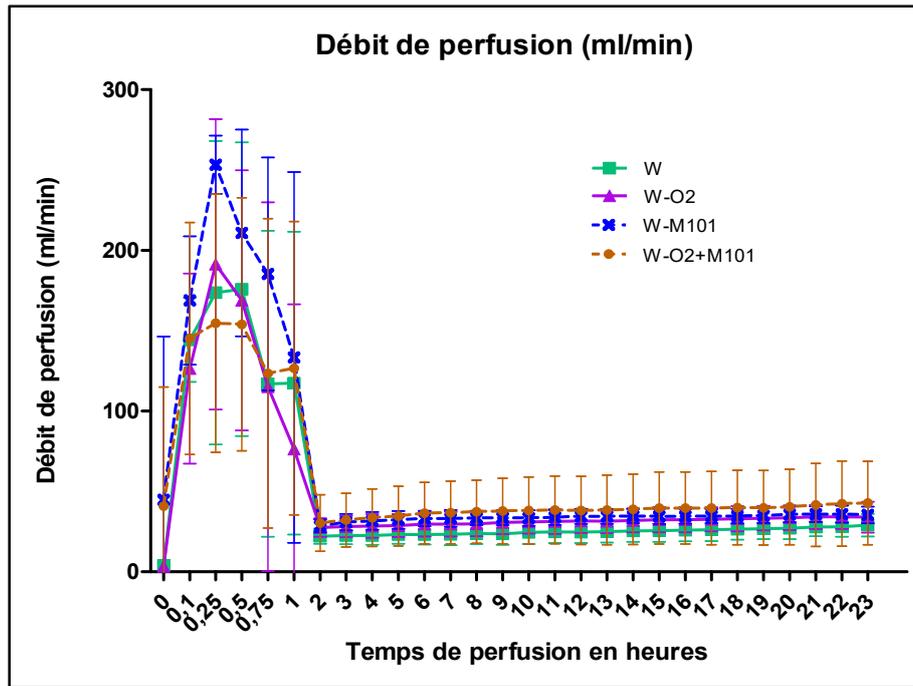


Figure 27: Évolution du débit de perfusion au cours de la conservation en MP WAVES® (23 h)

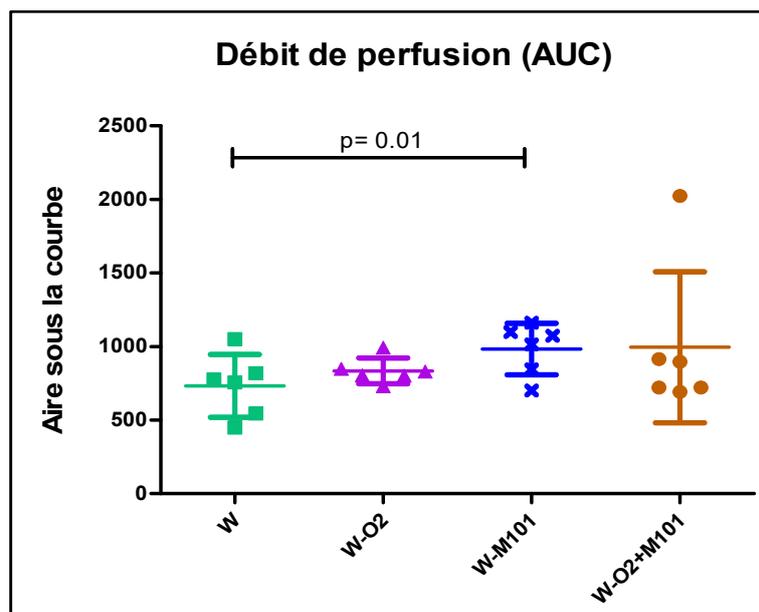


Figure 28: Évolution du débit de perfusion au cours de la conservation en MP WAVES® représentant l'aire sous la courbe dans les différents groupes transplantés

#### 4.1.4. Résistance rénale

Les reins qui ont été conservés en machine de perfusion avec addition d'HbAm (W-M101 et W-O2+M101) montraient une résistance diminuée comparé aux autres

groupes (Figure 29) avec une différence significative entre le groupe W vs le groupe W-M101 ( $p=0,01$ ) et le groupe W vs W-O2+M101 ( $p=0,05$ ) (Figure 30A). Cela a été confirmé par l'analyse de la résistance rénale à la fin de perfusion avec une différence significative entre le groupe W vs le groupe W-M101 ( $p=0,04$ ) (Figure 30B).

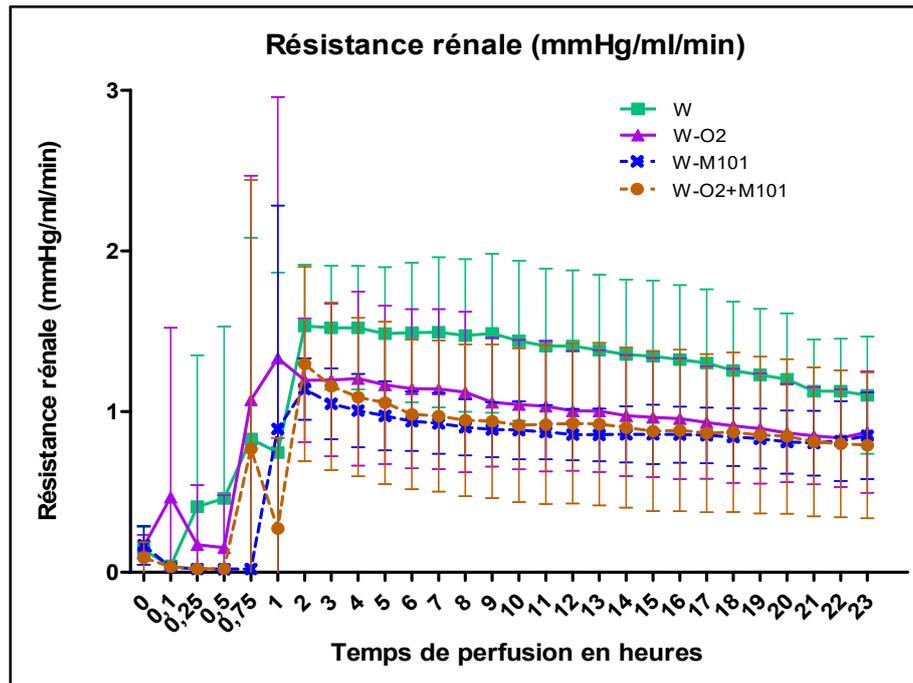


Figure 29: Évolution de la résistance rénale au cours de la conservation en MP WAVES® (23 h)

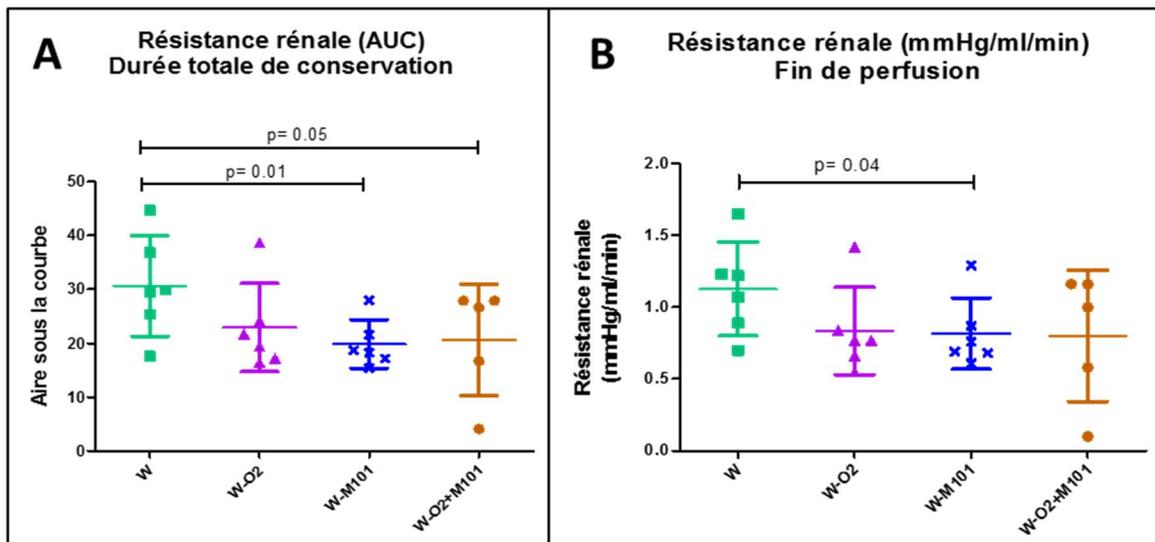


Figure 30: Évolution de la résistance rénale représentant l'aire sous la courbe au cours de la conservation en MP WAVES® (A) et à la fin de conservation (B)

L'ensemble de ces paramètres est en faveur d'une meilleure qualité de perfusion pour les reins du groupes W-M101.

## 4.2. Évaluation de la reprise de diurèse

Il est clairement établi que les lésions d'I/R impactent la qualité du greffon et participent au retard de reprise de fonction caractérisé par un retard de reprise de diurèse au cours de la première semaine après transplantation.

Les résultats de la reprise de diurèse de J1 à J4 post-transplantation, ont montré que la moitié des animaux du groupe IV (W-M101) (3/6) ont uriné à J1 post-transplantation. Tandis qu'un tiers des animaux des groupes oxygénés active (III et V) (W-O2 et W-O2+M101) (2/6) avaient uriné à J1 post-transplantation, et uniquement un seul animal du groupe II (W) avait uriné à J1 (Figure 31).

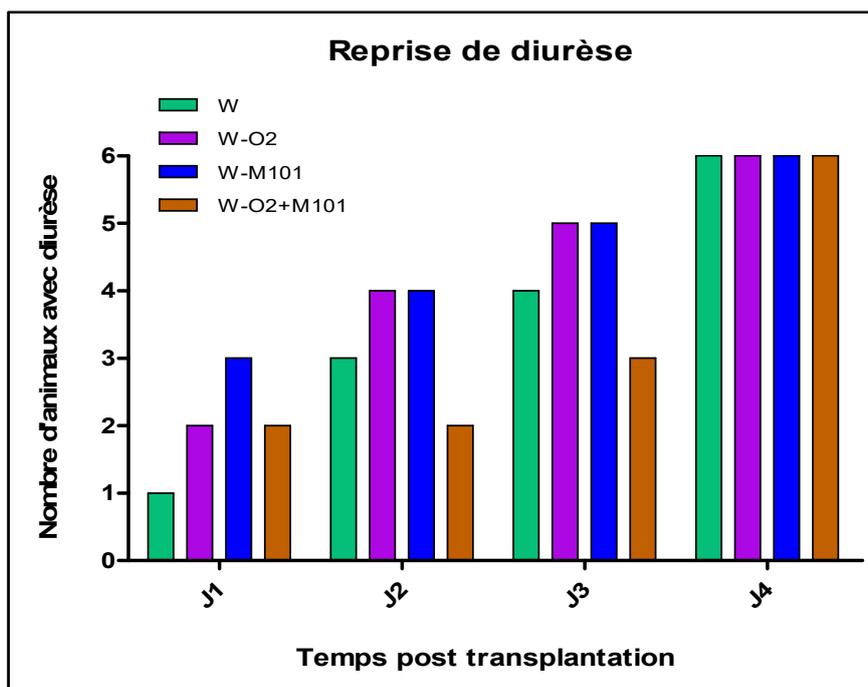


Figure 31: Évolution de la reprise de diurèse de J1-J4 post-transplantation chez les animaux des différents groupes transplantés

En association avec les données de perfusion en machine, les animaux du groupe W-M101 présentent une meilleure reprise de fonction que les autres groupes.

### 4.3. Évaluation des biomarqueurs de lésions rénales durant la première semaine post-transplantation

Il est clairement établi que les lésions d'ischémie impactent la qualité du greffon et participent aux lésions de reperfusion caractérisées par un « relargage ou sécrétion » de marqueurs de lésions prédictifs de la fonction et survie du greffon.

Le lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme importante dans la transformation des sucres en énergie. Son augmentation témoigne d'un dommage tissulaire dans l'organisme. Pendant la première semaine post-transplantation, les niveaux de LDH

varient entre les quatre groupes transplantés. Les niveaux de LDH sont plus élevés dans le groupe IV (W-M101) pour atteindre  $1103,0 \pm 734,0$  UI/L à J1 vs  $494,5 \pm 89,3$  UI/L à J0. Tandis que, les animaux du groupe III (W-O2) présentaient des niveaux de LDH plus bas comparé aux autres groupes expérimentaux ( $451,5 \pm 170,4$  UI/L à J1 vs  $324,0 \pm 45,2$  UI/L à J0) (Figure 32). L'analyse en aire sous la courbe présentait une différence significative entre le groupe III (W-O2) vs le groupe II (W) ( $P=0,005$ ), le groupe III (W-O2) vs le groupe IV (W-M101) ( $P=0,0005$ ), et le groupe III (W-O2) vs le groupe V (W-O2+M101) ( $P=0,006$ ) (Figure 33).

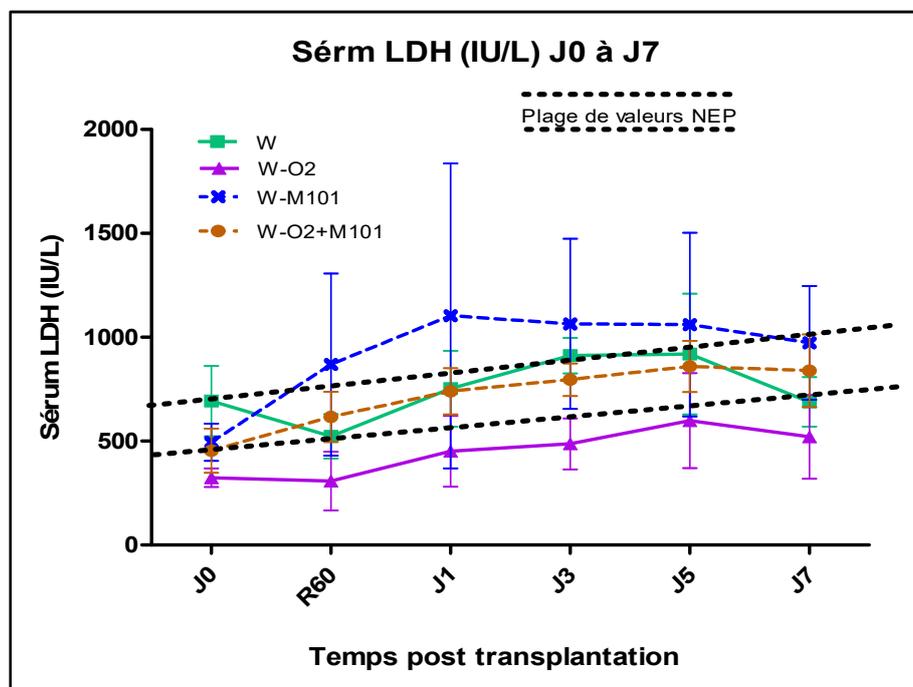
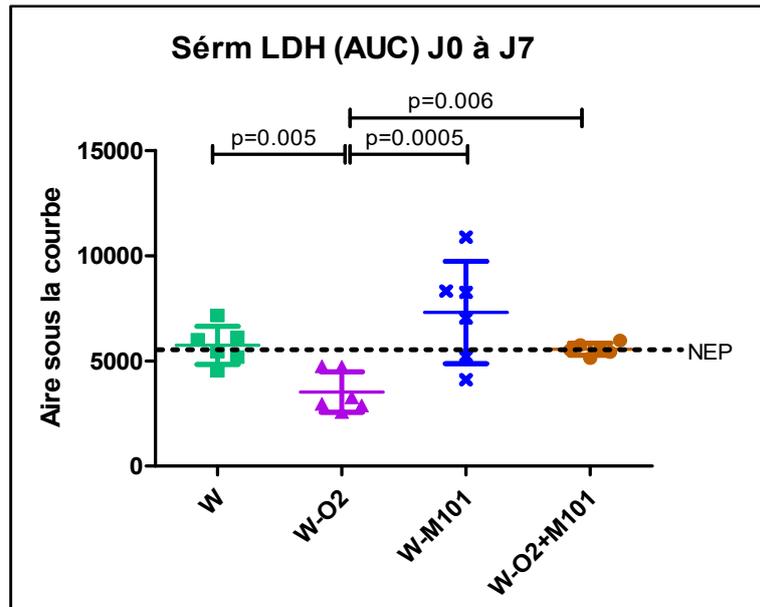


Figure 32: Évolution des taux de LDH sérique pendant la première semaine post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux



**Figure 33: Évolution des taux de LDH sérique représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux**

La neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) est une glycoprotéine appartenant à la superfamille des lipocalines. Les études cliniques de plus en plus nombreuses suggèrent que la NGAL, dosée au niveau urinaire ou au niveau plasmatique, pourrait être un marqueur pertinent de l'insuffisance rénale aiguë.<sup>125</sup> Les niveaux de l'NGAL sérique ont augmenté dans les quatre groupes transplantés pendant la première semaine post-transplantation. Le groupe III (W-O2) présentait le plus bas pic de NGAL sérique à J1 ( $1,08 \pm 0,47 \mu\text{g/ml}$ ) comparé autres groupes (environ  $1,5 \mu\text{g/ml}$ ) (Figure 34). L'aire sous la courbe a montré une différence significative entre les groupes W-O2 vs le groupe W-M101 ( $p=0,006$ ) (Figure 35).

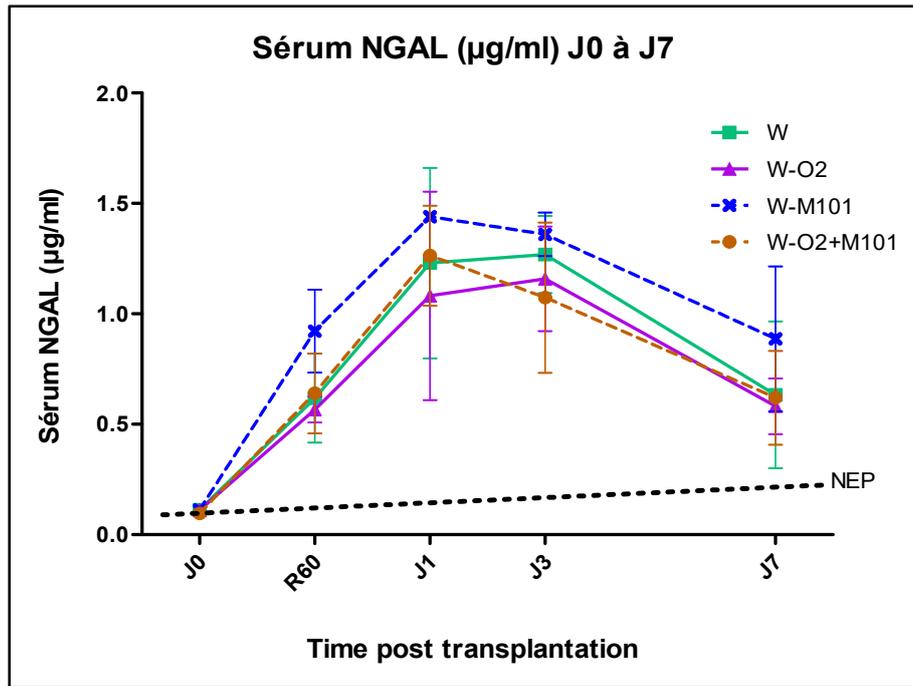


Figure 34: Évolution des taux de NGAL pendant la première semaine post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux

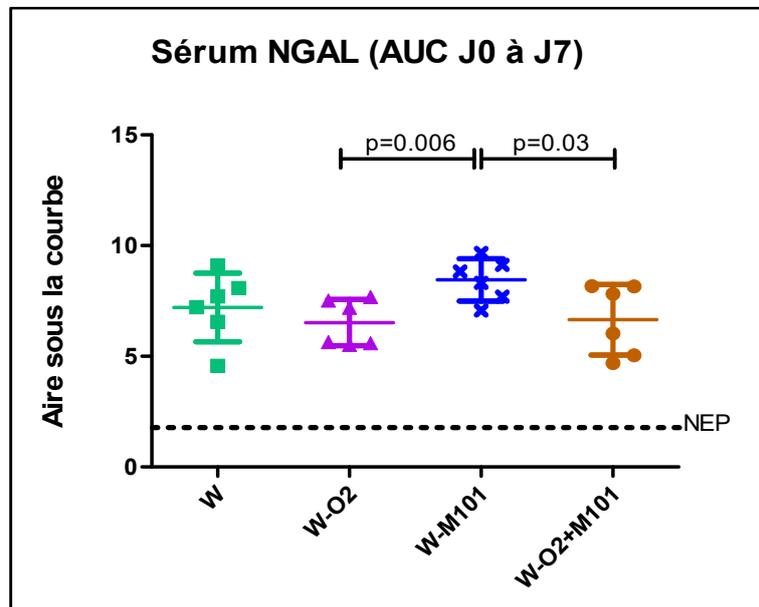


Figure 35: Évolution des taux de NGAL représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux

Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) est une protéine transmembranaire d'origine tubulaire, indétectable chez le sujet sain. KIM-1 est une protéine transmembranaire de type 1

avec un domaine immunoglobuline et un domaine mucine, dont l'expression tissulaire (notamment au niveau du tubule proximal) semble fortement augmentée après agression ischémique de rein. KIM-1 peut être clivée, notamment par des agressions de type espèces radicalaires oxygénées, permettant la libération dans le milieu extracellulaire de la partie ectodomaine de KIM-1. Le dosage de ce fragment circulant représente le biomarqueur lié aux lésions tissulaires. Les quatre groupes transplantés ont exprimés des différents niveaux de KIM-1 circulant à partir de J3 et ils atteignent le pic à J7 post-transplantation. Le groupe présentant les pics les plus bas de KIM-1 sérique à J3 et J7 est le groupe W-M101 comparé aux autres groupes (Figure 36). L'aire sous la courbe a montré une différence significative entre les groupes W-M101 vs W-O2 ( $p=0,01$ ) et W-M101 vs W-O2+M101 ( $p=0,04$ ) (Figure 37).

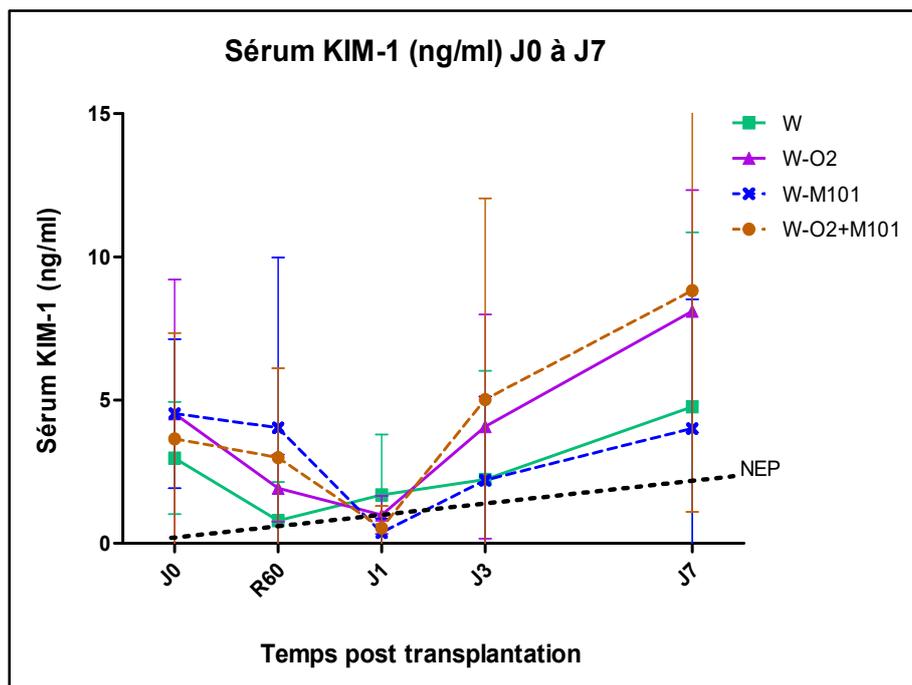
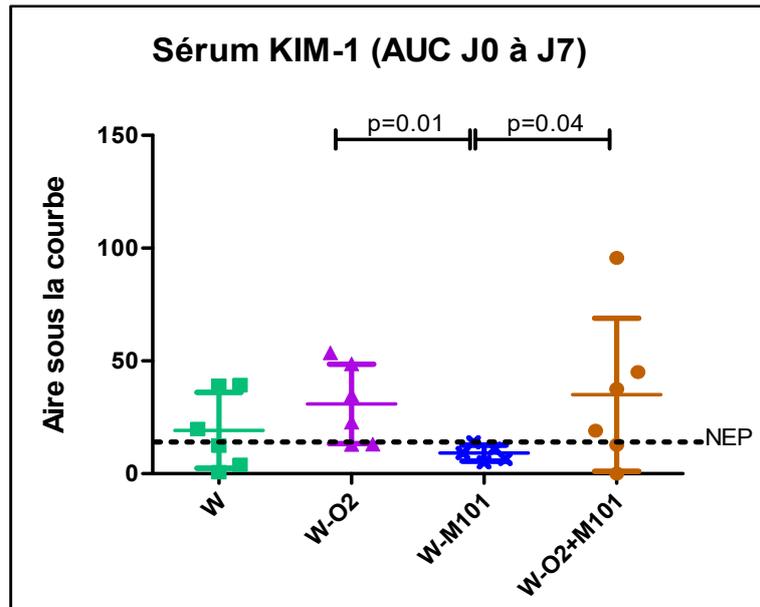


Figure 36: Évolution des taux de KIM-1 pendant la première semaine post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux



**Figure 37: Évolution des taux de KIM-1 représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux**

L'interleukine 18 (IL-18) est une cytokine pro-inflammatoire, détectable chez les sujets ayant subis une agression tissulaire (notamment une ischémie rénale). Les groupes sans supplémentation d'HbAm ont révélé un taux plus élevé d'IL-18 sérique à J1 ( $191,2 \pm 83,9$  pg/ml) pour le groupe II (W) et ( $88,7 \pm 37,9$  pg/ml) pour le groupe III (W-O2) comparé aux groupes de supplémentation d'HbAm ( $18,6 \pm 9,6$  pg/ml) pour le groupe IV (W-M101) et ( $50,3 \pm 9,4$  pg/ml) pour le groupe V (W-O2+M101) (Figure 38). L'analyse de l'aire sous la courbe a prouvé la différence significative entre le groupe W vs le groupe W-M101 ( $p=0,008$ ) (Figure 39).

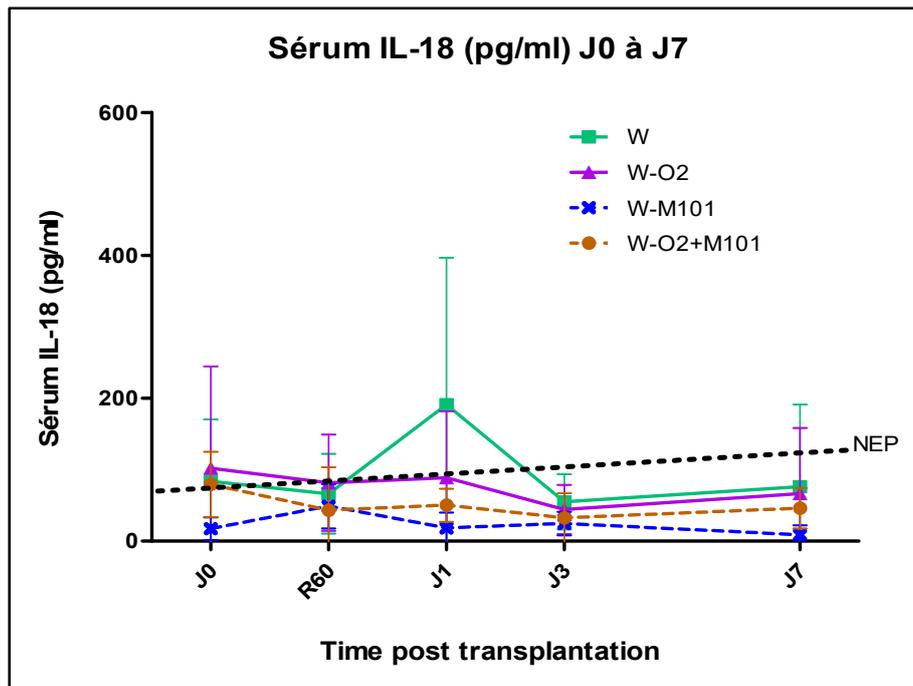


Figure 38: Évolution des taux d'IL-18 pendant la première semaine post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux

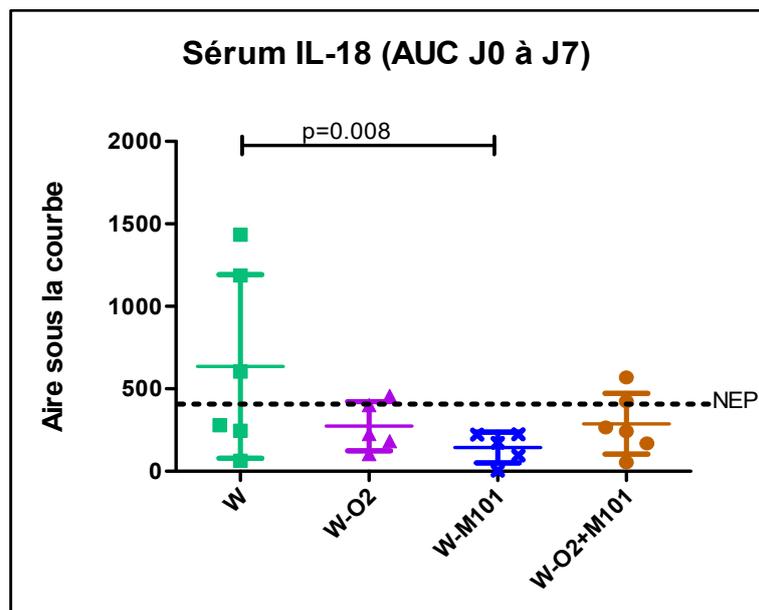


Figure 39: Évolution des taux d'IL-18 représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux

Les transaminases sont des enzymes localisées à l'intérieur des cellules. Un taux élevé de transaminases est le reflet d'une lésion cellulaire généralement au niveau du foie, du

cœur, des reins ou des muscles. L'Aspartate aminotransférase (ASAT ou AST) est défini comme un biomarqueur de lésions rénales, notamment suite à une séquence d'ischémie.<sup>126</sup> L'analyse de l'ASAT sérique a montré que les groupes de non-oxygénation active (W, W-M101) ont révélé un taux élevé d'ASAT (environ 200-300 IU/L) comparé aux groupes d'oxygénation active (W-O2, W-O2+M101) (environ 80-90 IU/L) (Figure 40). La figure 50 représente cette différence entre les groupes d'oxygénation active *versus* les groupes de non-oxygénation active : W *vs* W-O2 (p=0,0001), W *vs* W-O2+M101 (p=0,0005), W-M101 *vs* W-O2 (p=0,01) and W-M101 *vs* W-O2+M101 (p=0,03) (Figure 41).

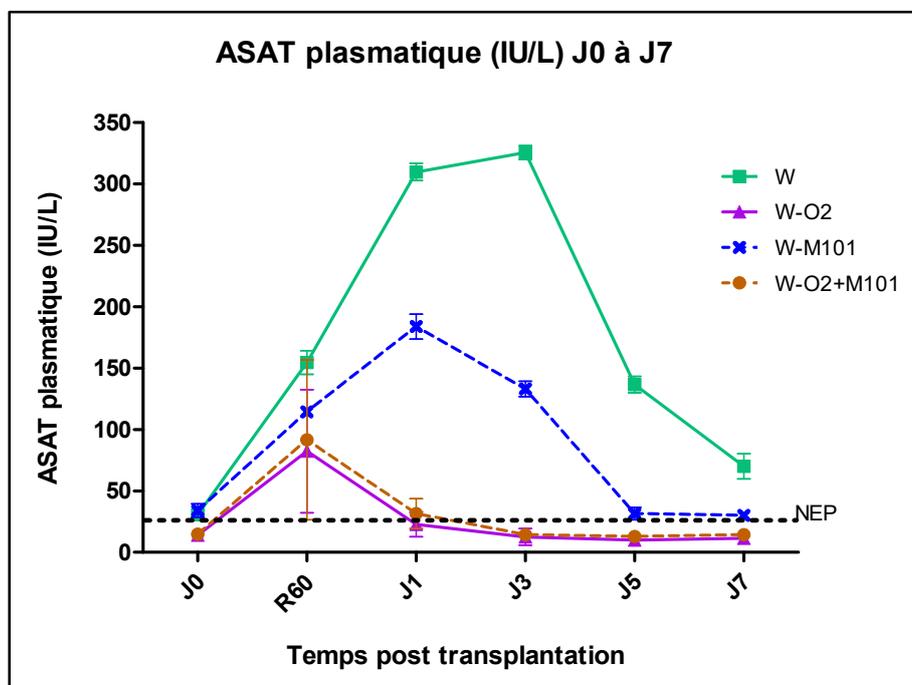


Figure 40: Évolution des taux d'ASAT pendant la première semaine post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux

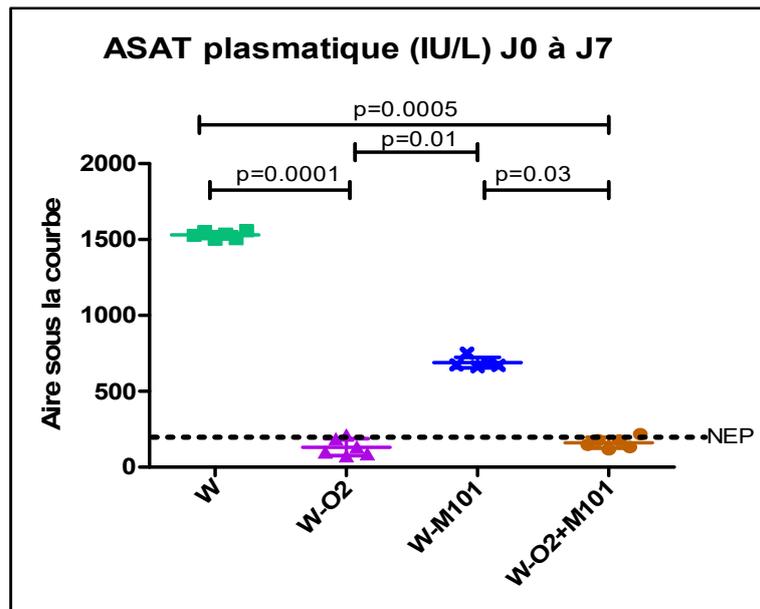


Figure 41: Évolution des taux d'ASAT représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux

Il est intéressant de noter que, l'ensemble des résultats obtenus pour le dosage des marqueurs circulants de lésions rénale, montrent que les faibles expressions de ASAT, NGAL et LDH sont en faveur des groupes supplémentés avec de l'O<sub>2</sub> 100%, alors que les faibles expressions de KIM-1 et IL-18 sont en faveur des groupes supplémentés avec de l'hémoglobine de ver marin.

#### 4.4. Évaluation des biomarqueurs de fonction rénale post-transplantation

Il est clairement établi que les lésions d'ischémie impactent la qualité du greffon et participent aux lésions de reperfusion caractérisées par une mauvaise fonction rénale à court et long terme après transplantation.

Par rapport au groupe control NEP, pendant le période précoce (J0-J7 post-transplantation), la créatininémie a atteint un pic dans tous les groupes transplantés, mais avait tendance à être plus faible dans les groupes III (W-O2) et IV (W-M101) (~ 700  $\mu\text{mol/L}$ ) comparé aux groupes II (W) et V (W-O2+M101) (~ 1000  $\mu\text{mol/L}$ ). De plus, les niveaux de la créatinine plasmatique des groupes III (W-O2) et IV (W-M101) baissent plus rapidement et plus bas que les autres groupes (Figure 42). L'évolution de la créatininémie pendant les trois mois post-transplantation, chez les différents groupes expérimentaux, a été présentée sous forme d'aires sous la courbe. Une différence significativement a été mise en évidence entre le groupe II (W) vs le groupe IV (W-M101) ( $P=0,03$ ) et le groupe IV (W-M101) vs le groupe V (W-O2+M101) ( $P=0,02$ ) (Figure 43).

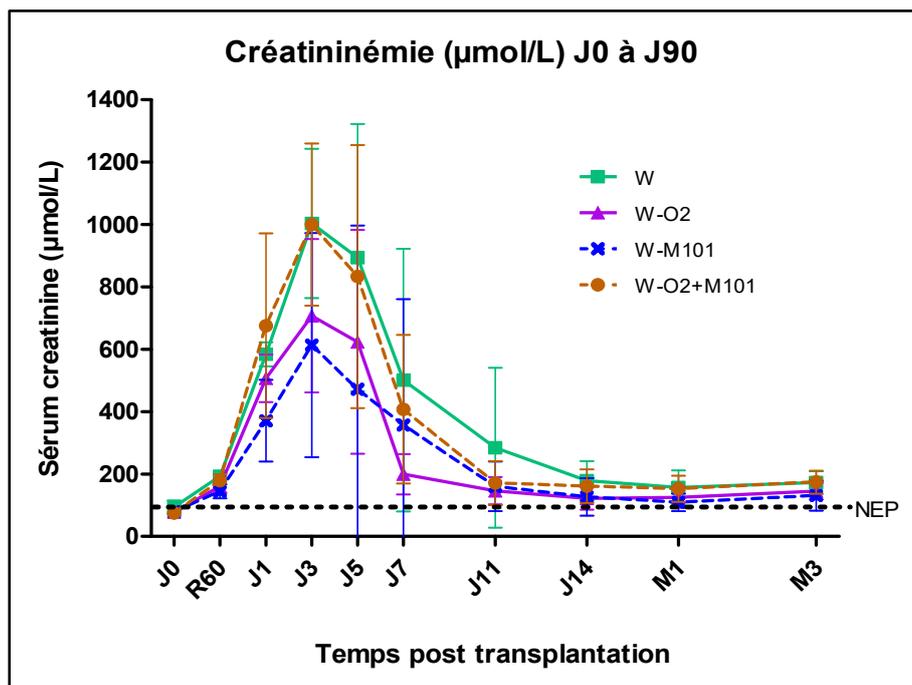


Figure 42: Évolution du taux de la créatininémie pendant trois mois post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux

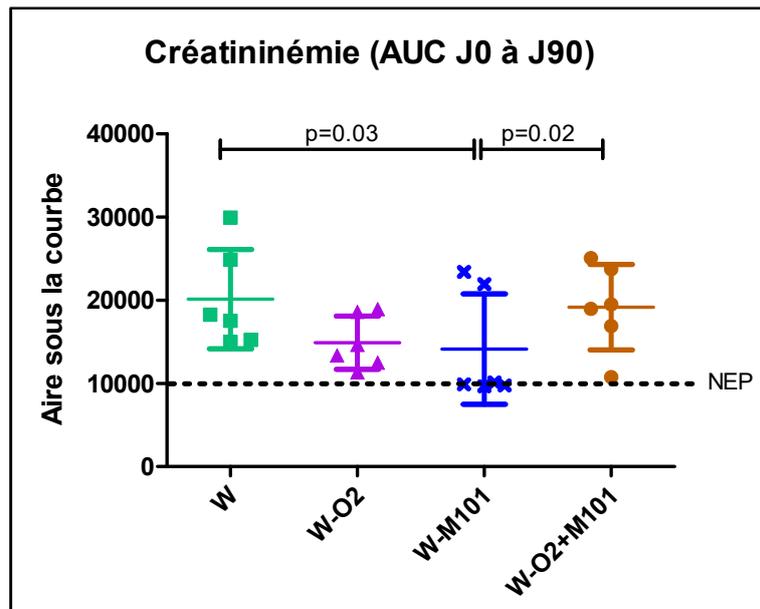


Figure 43: Évolution de la créatininémie représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux

La fraction excrétée de sodium (FeNa) mesure la quantité de sodium éliminée et excrétée dans les urines par rapport à la quantité de sodium filtrée par les reins et réabsorbée dans le corps. Elle sert à déterminer la qualité de fonctionnement des reins et notamment de la réabsorption au niveau tubulaire. Dans notre expérimentation, à J3, le pic de FeNa dans le groupe III (W-O<sub>2</sub>) est plus élevé ( $49,6 \pm 24,9\%$ ) comparé aux autres groupes. En revanche, le pic de FeNa du groupe IV (W-M101) était le plus bas à J3 comparé aux autres groupes transplantés ( $14,1 \pm 3,6\%$ ) (Figure 44). L'évolution de FeNa est illustrée par une aire sous la courbe ne montre aucune différence significative entre les groupes expérimentaux entre J0 et J90 après transplantation (Figure 45).

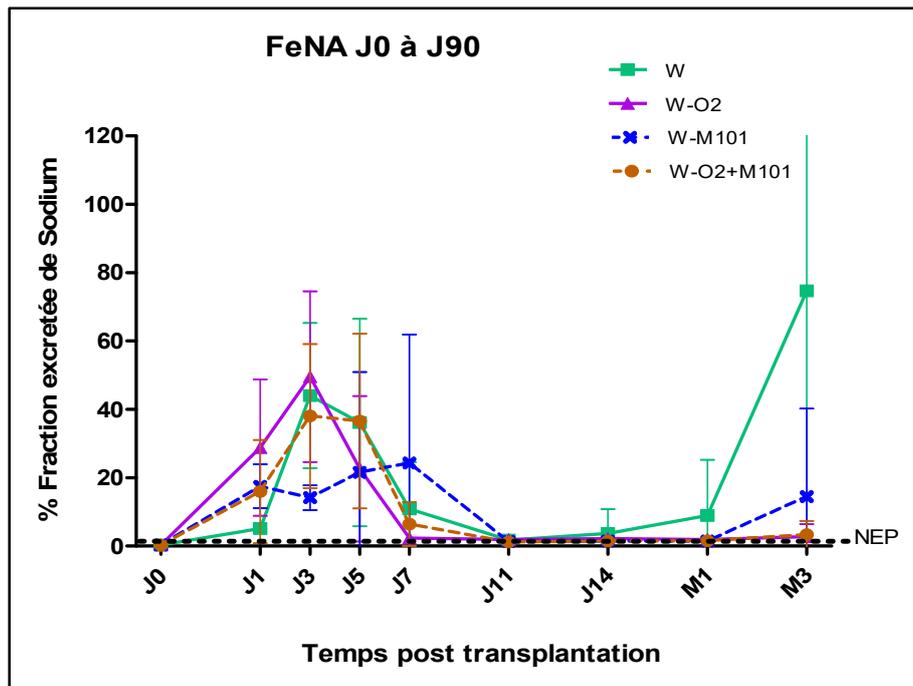


Figure 44: Évolution des taux de FeNa pendant trois mois post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux

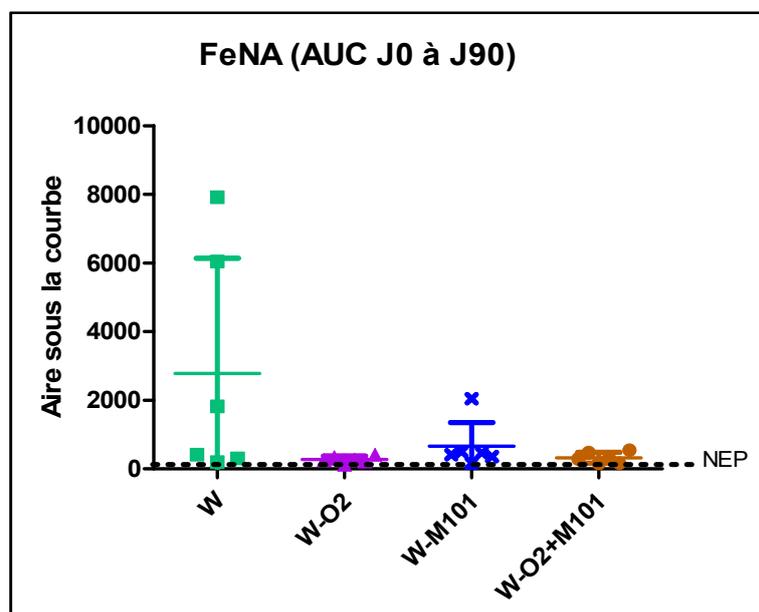


Figure 45: Évolution des taux de FeNa représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux

Le débit de filtration glomérulaire (GFR) (en anglais glomerular filtration rate) est le débit de liquide filtré à travers le rein par unité de temps. C'est une valeur qui permet de quantifier la fonction rénale. Nous avons calculé le GFR selon la formule suivante :

$$\text{Débit Urinaire} \times \frac{\text{Creatinine Urinaire}}{\text{Creatinine Plasmatique}}$$

Le GFR a été augmenté progressivement de J3 jusqu'à la fin de vie de l'animal (le jour de sacrifice). Cependant, cette progression varie entre les groupes transplantés (Figure 46). Le GFR du groupe II (W) a été le plus bas  $11,9 \pm 9,2$  ml/min à J5 pour atteindre à  $32,9 \pm 32,4$  ml/min à M3 vs le groupe III (W-O<sub>2</sub>) où le GFR a été le plus élevé ( $18,8 \pm 17,1$  vs  $80,5 \pm 45,1$  ml/min) à J5 et M3 post-transplantation respectivement. L'analyse statistique de ces données par le test de Kruskal-Wallis montre une différence significative entre le groupe II (W) vs le groupe III (W-O<sub>2</sub>) ( $p=0,01$ ) (Figure 47).

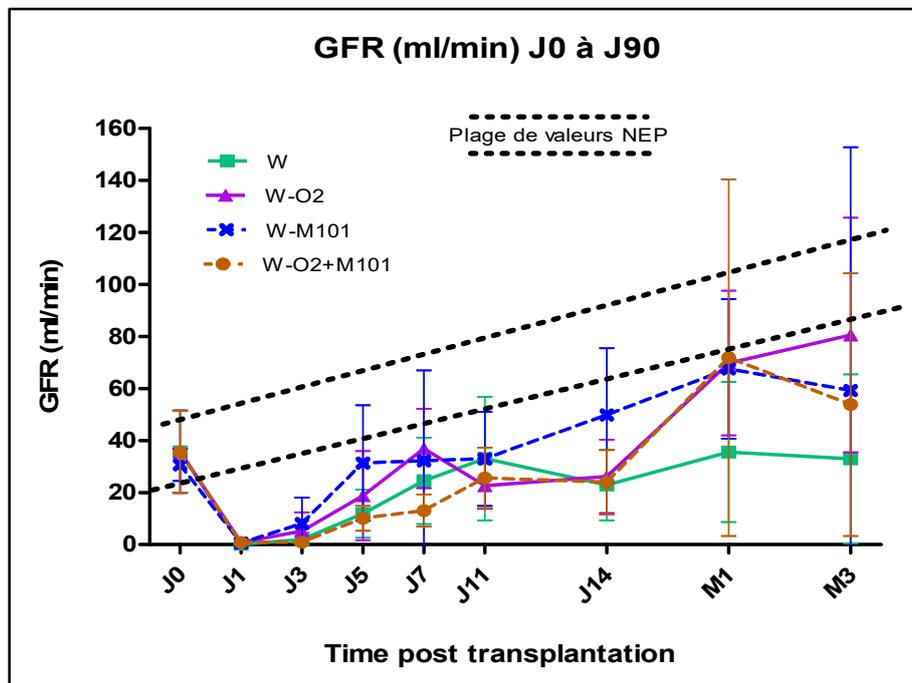


Figure 46: Évolution des taux de GFR pendant trois mois post-transplantation dans les différents groupes expérimentaux

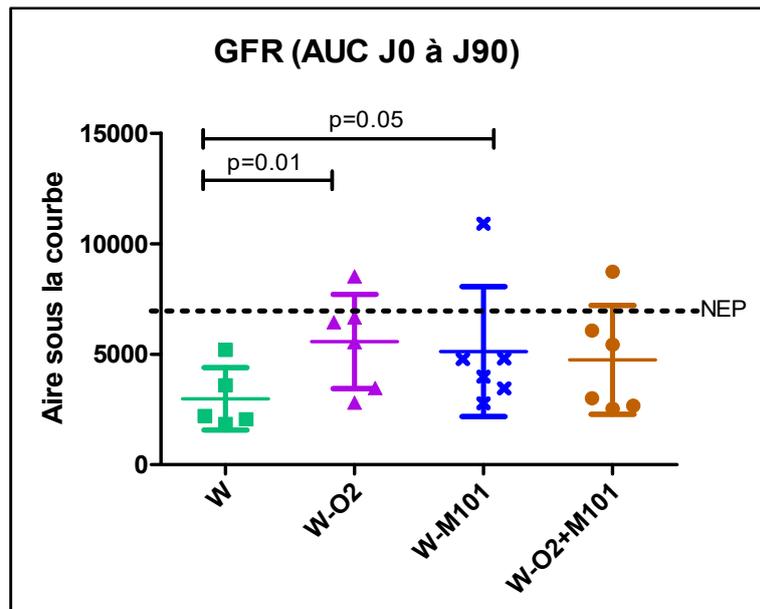


Figure 47: Évolution des taux de GFR représentant l'aire sous la courbe de différents groupes expérimentaux

L'ensemble de ces paramètres de fonction rénale indique que le groupe W sans supplémentation présente la moins bonne fonction après transplantation, notamment par rapport au groupe W-M101 qui présente la créatininémie la plus faible. Ces données sont en association avec les paramètres de perfusion (résistance et débit de perfusion) ainsi qu'avec les expressions de KIM-1 et IL-18 circulants.

#### 4.5. Évaluation des lésions 3 mois post-transplantation

Il est clairement établi que les lésions d'I/R impactent la qualité du greffon et participent au développement de dysfonctions tardives du transplant, telles que la survenue de l'inflammation et de la fibrose interstitielle. Ces lésions rénales peuvent induire une perte de fonction du greffon à long terme.

### 4.5.1. Lésions d'inflammation 3 mois post-transplantation

L'analyse histologique, sur des coupes de tissu rénal 3 mois après transplantation (coloration HES), montre que l'infiltration leucocytaire est plus marquée dans les groupes W et W-O2+M101 comparé au groupe W-M101 avec une différence significative entre les groupes W vs W-M101 ( $p=0,02$ ) et W-M101 vs W-O2+M101 ( $p=0,05$ ) (Figure 48).

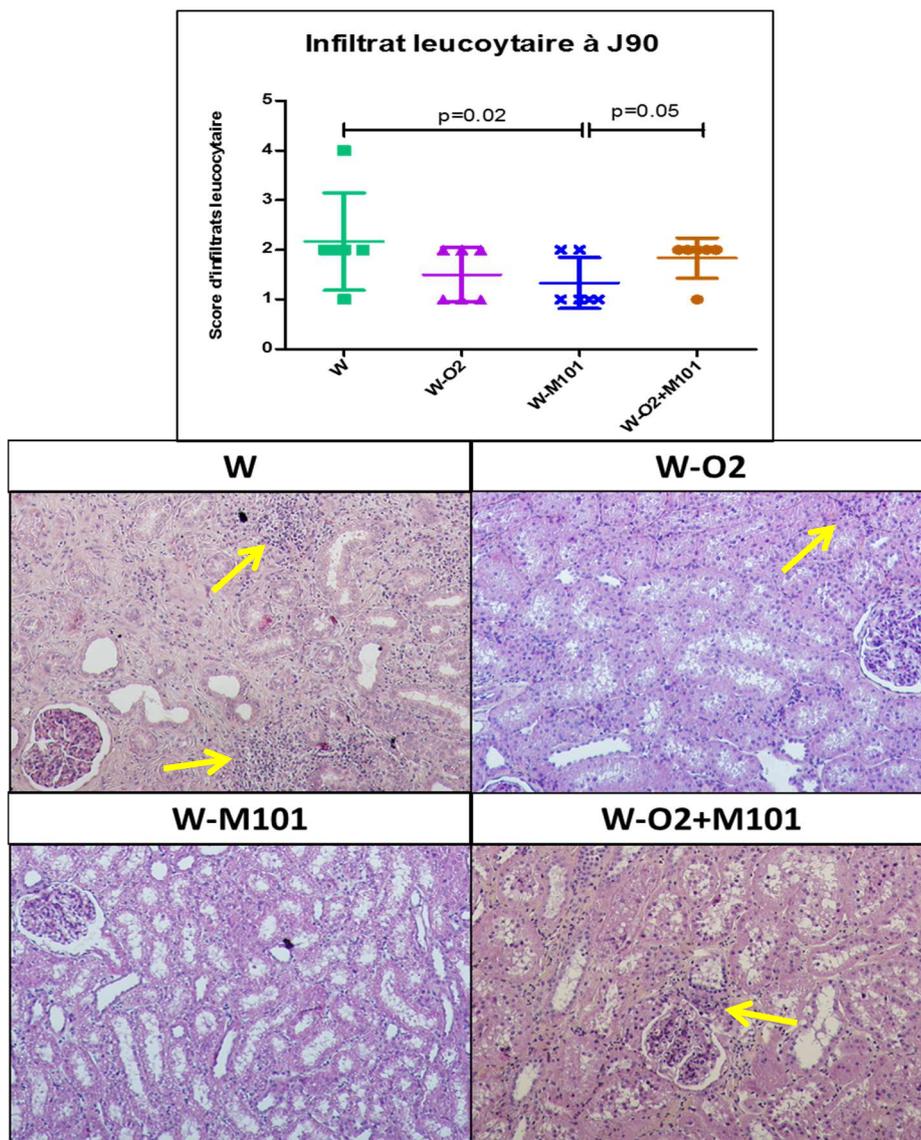


Figure 48: Quantification de l'infiltration leucocytaire rénale dans les différents groupes expérimentaux. les images représentent la coloration de HES sur des coupes de cortex rénal des différents groupes expérimentaux (magnification x100). Les flèches jaunes représentent des zones d'infiltration leucocytaire

Il est établi que certains types de leucocytes, comme les mastocytes, participent aux lésions chroniques du greffon et au développement de l'inflammation et de la fibrose. Nous avons évalué le niveau d'infiltration des mastocytes CD117+ dans le rein 3 mois après transplantation. Les résultats montrent que l'infiltration des mastocytes CD117+ est significativement plus élevée dans le groupe II (W) comparé aux autres groupes transplantés : le groupe II (W) *vs* le groupe III (W-O2) ( $p=0,005$ ), le groupe II (W) *vs* le groupe IV (W-M101) ( $p=0,005$ ) et le groupe II (W) *vs* le groupe V (W-O2+M101) ( $p=0,005$ ) (Figure 49).

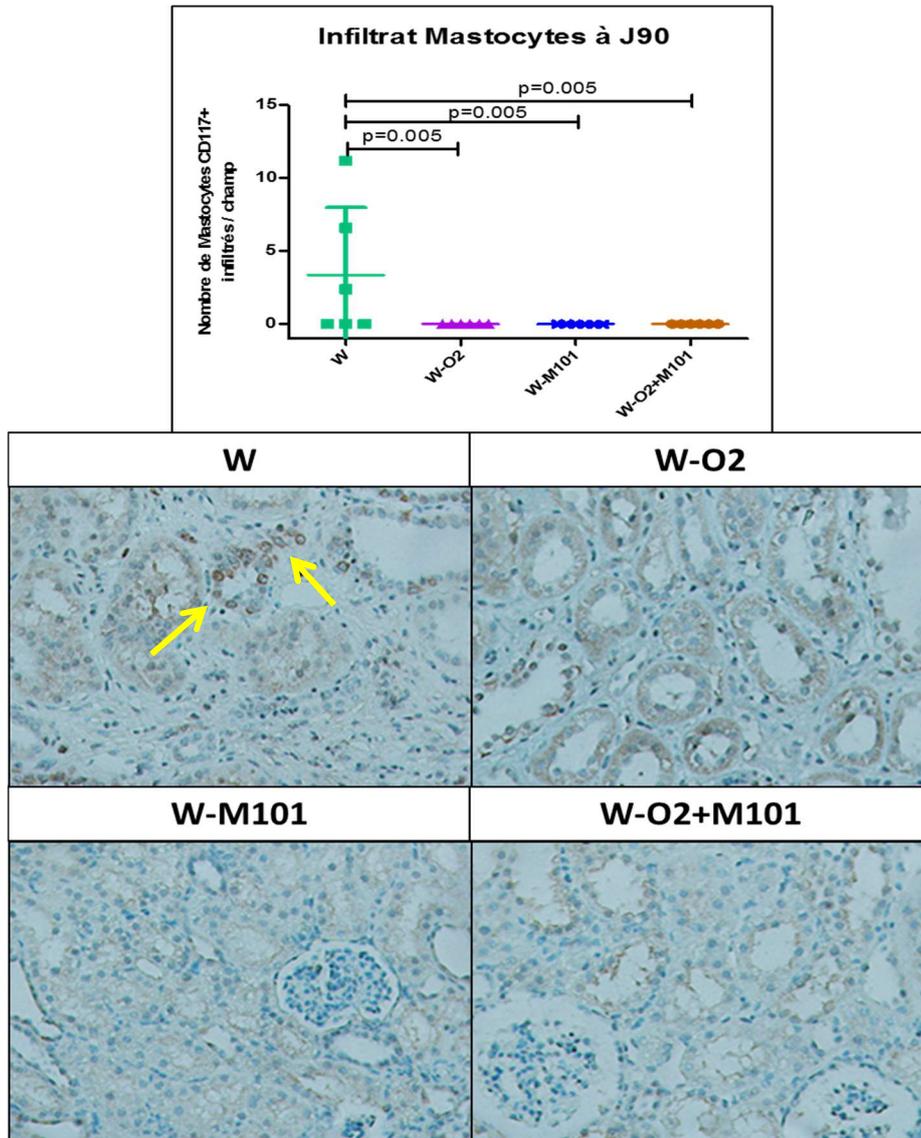
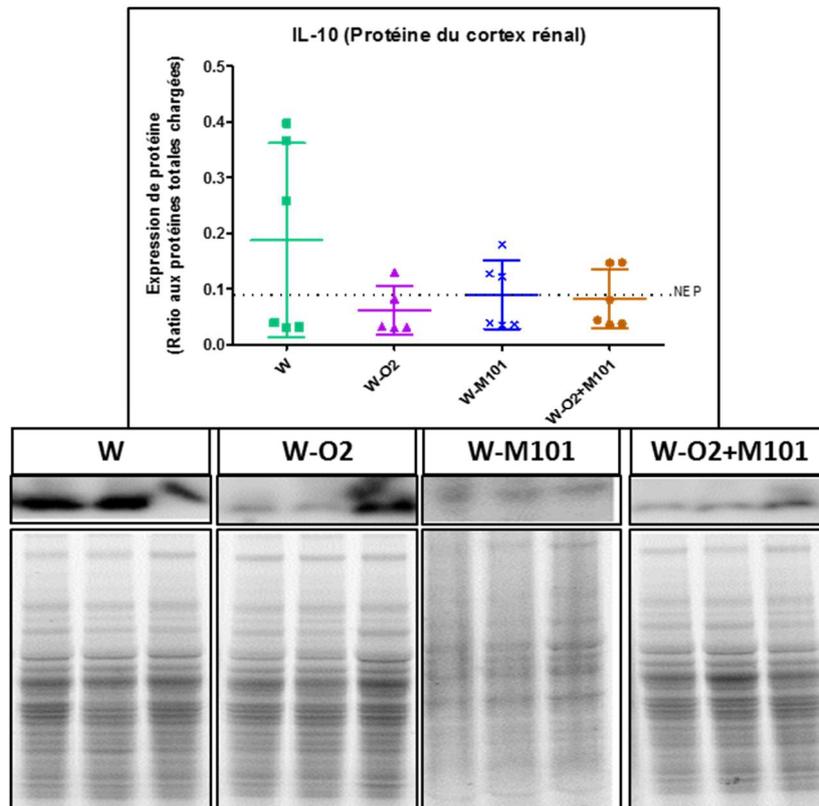


Figure 49: Evaluation de l'infiltration des mastocytes (CD117+) dans les reins de différents groupes expérimentaux. les images représentent le marquage des mastocytes infiltrés dans le cortex rénal de différents groupes expérimentaux (magnification X100). Les flèches jaunes représentent des mastocytes (CD117+)

En parallèle, à partir des tissus du cortex rénal, nous avons étudié l'expression de différentes protéines (par western blot) qui sont impliqués dans le processus de l'inflammation et de l'immunité. Nous avons évalué l'expression de protéines impliquées dans le processus d'immunité pouvant réguler le « rejet » du greffon. Les cellules immunorégulatrices, caractérisées notamment par l'expression du facteur de transcription

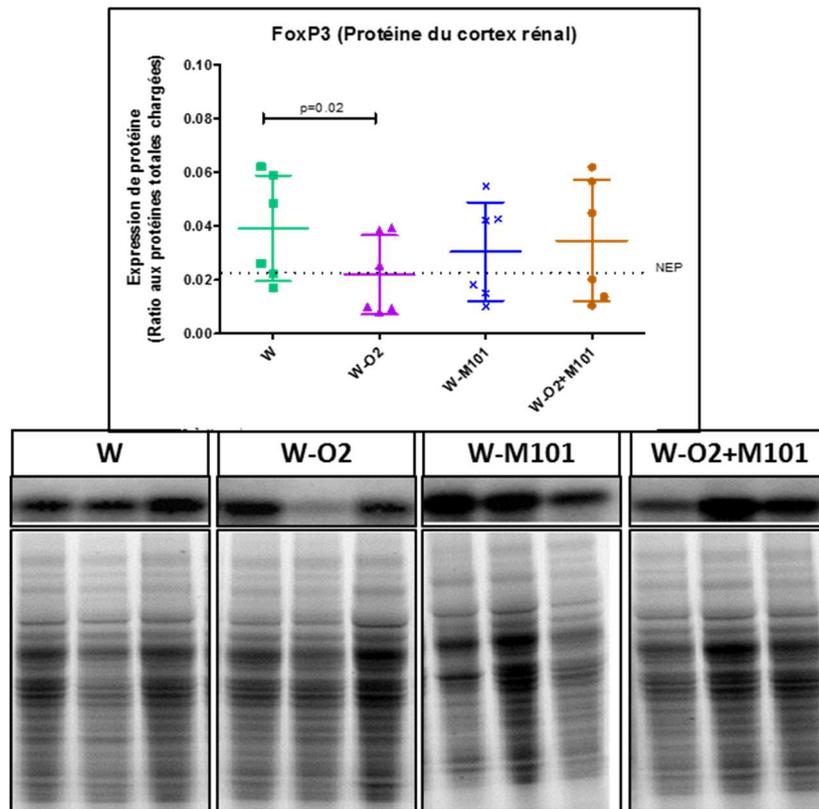
FoxP3 et la sécrétion de la cytokine immunosuppressive IL-10, jouent un rôle important afin de réguler les cellules effectrices susceptibles de détruire le greffon.

Nos résultats montrent que le groupe II (W) présente une plus importante expression d'IL-10 ( $0,187\pm 0,071$ ), par rapport aux autres groupes. Cependant, aucune différence statistique n'apparaît entre les groupes (Figure 50).



**Figure 50: Expression d'IL-10 analysée par WB à J90 post-transplantation (la partie inférieure montre les blots IL-10 et le stain free représentant l'ensemble des protéines chargées sur le gel)**

Nos résultats montrent que le groupe II (W) présente une plus importante expression de la protéine FoxP3 ( $0,039\pm 0,008$ ) par rapport au groupe III (W-O<sub>2</sub>) ( $0,022\pm 0,006$ ) ( $p=0,02$ ) (Figure 66).



**Figure 51: Expression de FoxP3 analysée par WB à J90 post-transplantation (la partie inférieure montre les blots FoxP3 et le stain free représentant l'ensemble des protéines chargées sur le gel)**

La NADPH oxydase 2 (NOX2, GP91<sup>phox</sup>) est un complexe enzymatique membranaire appartenant à la classe des oxydo-réductases (enzymes de classe I). Cette enzyme catalyse la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène (O<sub>2</sub>), ce qui produit du NADP<sup>+</sup>, du H<sup>+</sup> et de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Ces deux derniers réagiront pour former du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réagira avec un H<sup>+</sup> (proton) et un Cl<sup>-</sup> (chlorure) pour donner du HOCl (acide hypochloreux) et une molécule d'eau (H<sub>2</sub>O). Ce complexe enzymatique permet donc la synthèse de ROS. NOX2 intervient dans le phénomène de la phagocytose.

Nos résultats montrent que le groupe II (W) présente une plus importante expression de la protéine GP91<sup>phox</sup> (0,017±0,004) par rapport au groupe III (W-O2) (0,009±0,003) (p=0,02) (Figure 52).

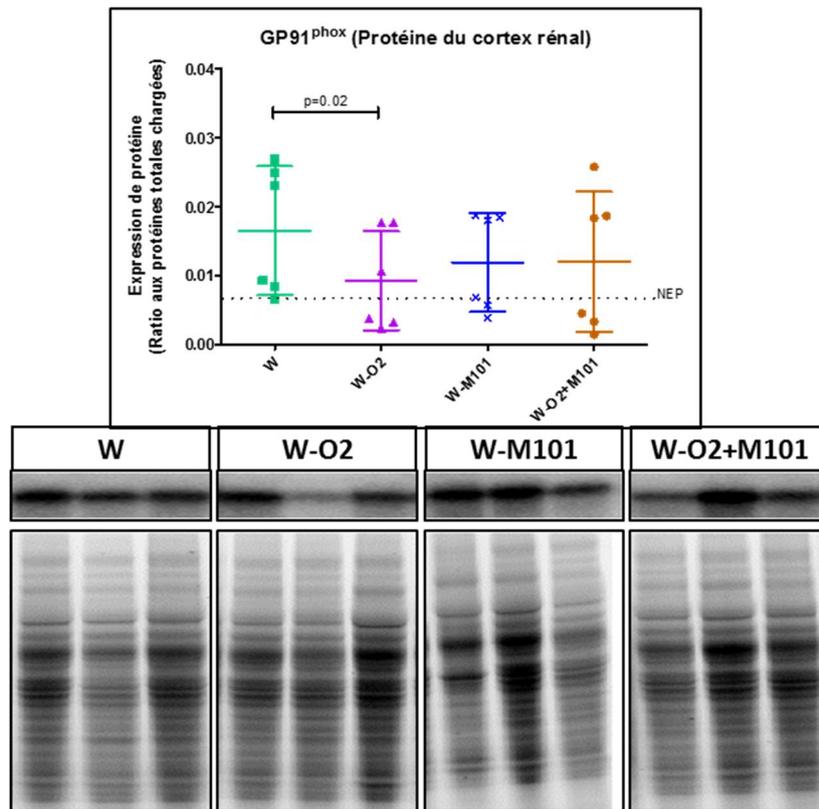
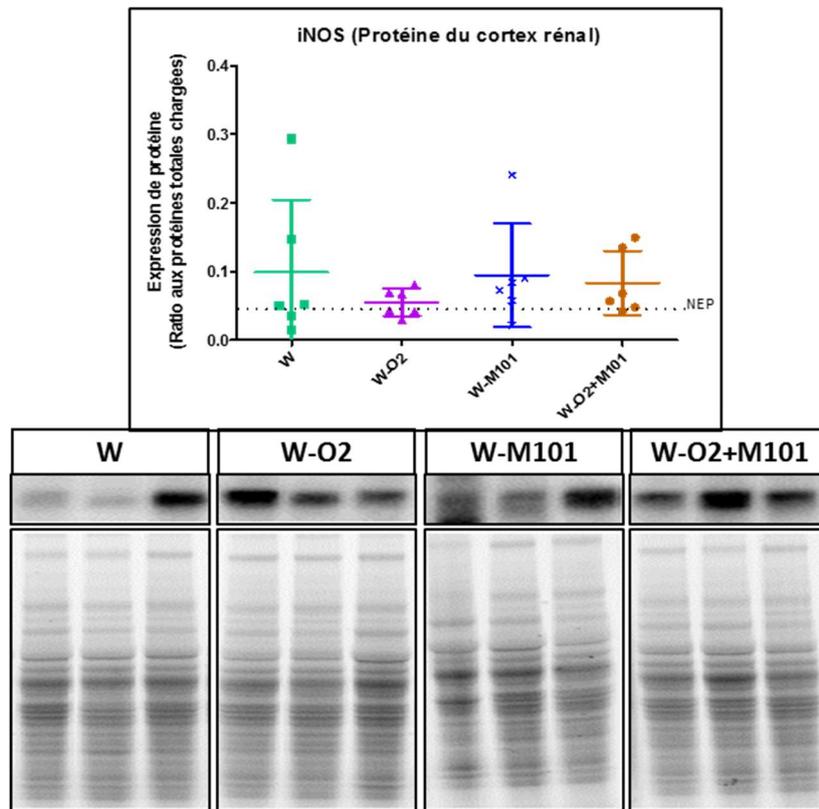


Figure 52: Expression de GP91<sup>phox</sup> analysée par WB (la partie inférieure montre les blots GP91<sup>phox</sup> et le stain free représentant l'ensemble des protéines chargées sur le gel)

L'oxyde nitrique synthase (NOS) est une oxydo-réductase qui produit du monoxyde d'azote, ou oxyde nitrique, un radical libre de formule chimique  $\bullet\text{N}=\text{O}$  présent dans la circulation sanguine.

Nos résultats ne montrent aucune différence statistique d'expression de iNOS entre les différents groupes, malgré le fait que le groupe III (W-O2) semble présenter le plus faible taux d'iNOS ( $0,055 \pm 0,008$ ) (Figure 53).



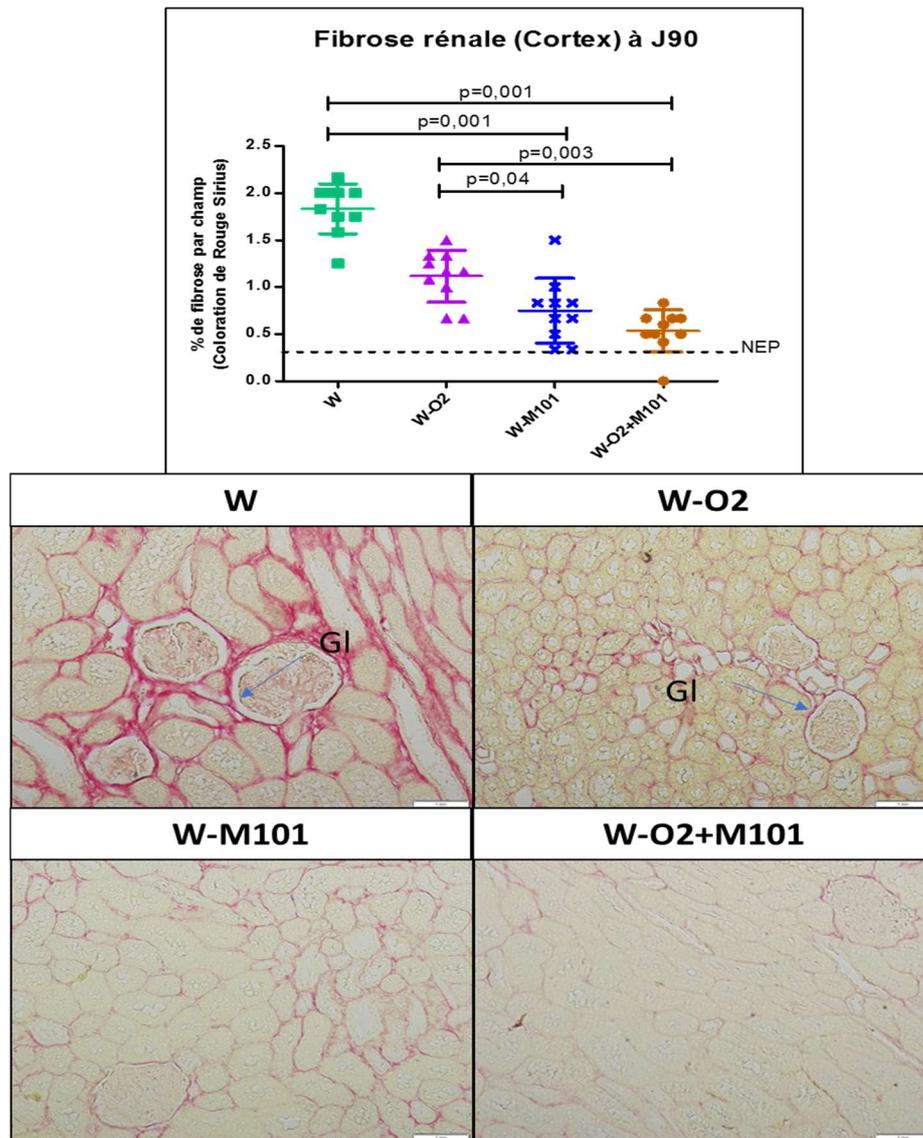
**Figure 53: Expression de iNOS analysée par WB à J90 post-transplantation (la partie inférieure montre les blots iNOS et le stain free représentant l'ensemble des protéines chargées sur le gel)**

L'ensemble des résultats d'expression de l'inflammation tissulaire à 3 mois après transplantation montrent que le groupe W est le plus atteint comparé notamment au groupes W-O2 et W-M101.

#### 4.5.2. Lésions de fibrose à 3 mois post-transplantation

La fibrose interstitielle est une lésion emblématique de la perte de fonction tardive du greffon rénale. La fibrose rénale est la conséquence d'une accumulation excessive de matrice extracellulaire dans le parenchyme rénal. Elle survient à la suite d'une lésion rénale, aiguë ou chronique, qui déstabilise un équilibre complexe entre cellules et protéines pro-fibrosantes et anti-fibrosantes. Il est établi que la fibrose est souvent liée à une inflammation.

Nous avons évalué la présence de fibrose dans le tissu rénal avec une coloration au rouge Sirius (colorant acide hydrophile qui teinte en rouge les fibres de collagène I et III, en microscopie optique). Nos résultats montrent des différences de niveau d'atteinte entre les groupes. En effet, la fibrose interstitielle est moins marquée dans les groupes avec supplémentation d'HbAm (W-M101 et W-O2+M101) comparé aux groupes sans supplémentation d'HbAm (W et W-O2). Cette différence était significative entre les deux types de conservation (avec *vs* sans supplémentation d'HbAm) ( $p < 0,05$ ) (Figure 54).

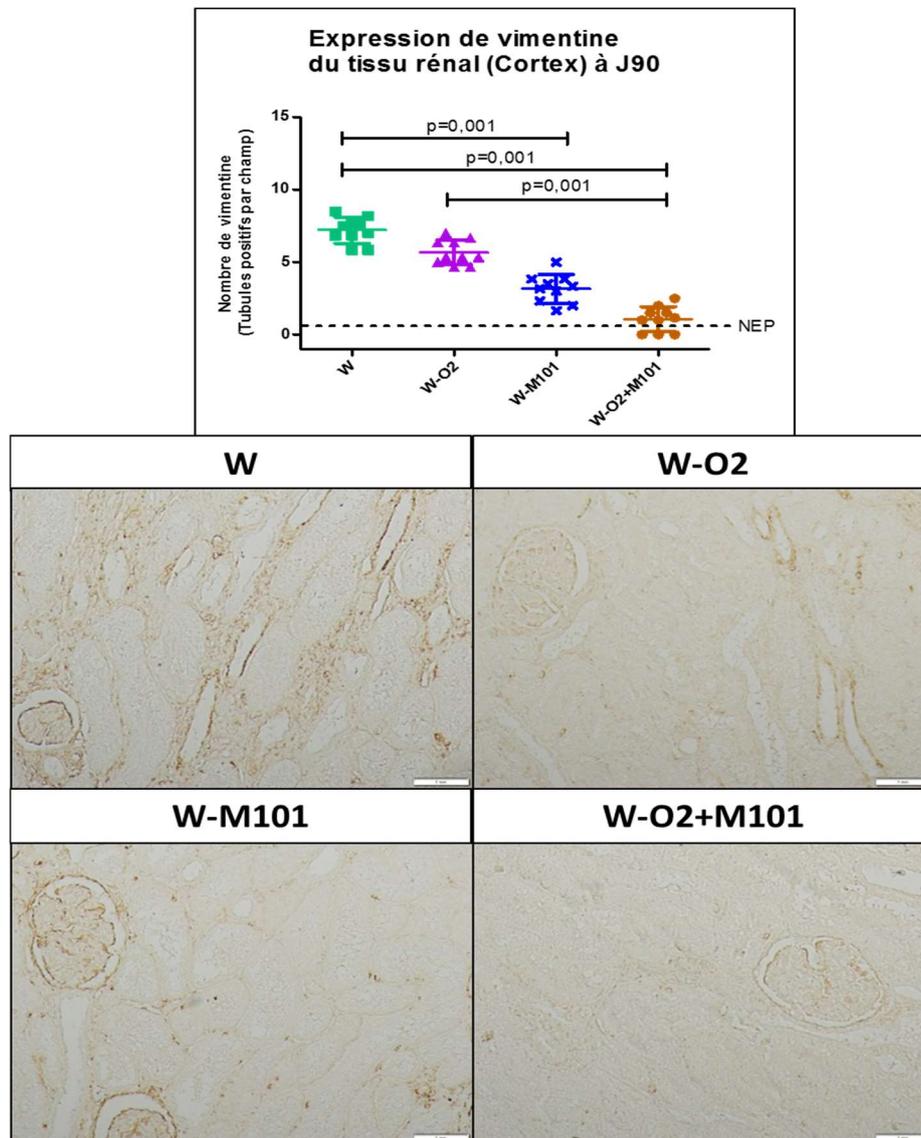


**Figure 54: Quantification de la fibrose rénale de différents groupes expérimentaux. Les images représentent la coloration de rouge Sirius du cortex rénal des différents groupes expérimentaux (magnification X100)**

La vimentine est un membre de la famille des filaments intermédiaires. Bien que la plupart des filaments intermédiaires soient des structures stables, dans les fibroblastes, la vimentine est une structure dynamique en importante quantité.

L'expression de vimentine est plus importante dans les groupes sans supplémentation d'HbAm (W et W-O2) comparé aux groupes avec supplémentation d'HbAm

(W-M101 et W-O2+M101). Cette différence était significative entre les quatre groupes transplantés ( $p < 0,005$ ) (Figure 55).



**Figure 55: Quantification de l'expression de la vimentine dans les reins des différents groupes expérimentaux. les images représentent le marquage anti-vimentine dans le cortex rénal des différents groupes expérimentaux (magnification x100)**

En parallèle, nous avons étudié l'expression de différentes protéines qu'ils sont impliqués dans le processus de développement de la fibrose interstitielle à trois mois après transplantation à partir des tissus du cortex rénal.

La métalloprotéase matricielle-2 (MMP-2) peut dégrader les composants de la matrice extracellulaire et permettre ainsi la réduction à développer la fibrose.

Nos résultats ne montrent aucune différence statistique d'expression de MMP2 entre les différents groupes (Figure 56).

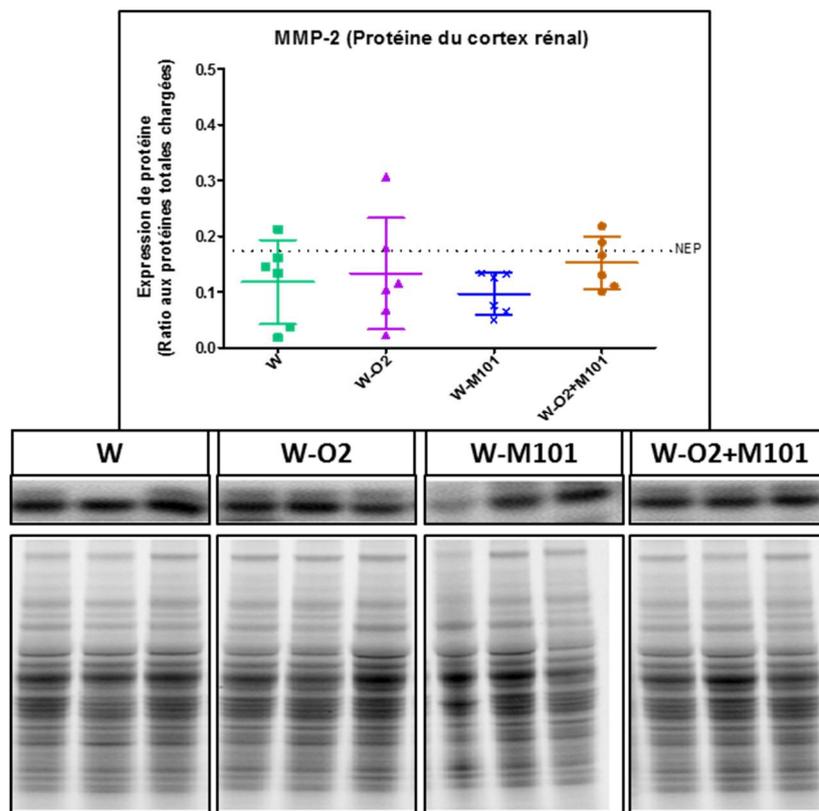


Figure 56: Expression de MMP-2 analysée par WB à J90 post-transplantation (la partie inférieure montre les blots MMP2 et le stain free représentant l'ensemble des protéines chargées sur le gel)

L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 aussi appelé PAI-1 pour plasminogen activator inhibitor-1 est le principal inhibiteur du tPA, activateur tissulaire du plasminogène, et par conséquent un inhibiteur de la fibrinolyse. En cas d'inflammation, lorsque de la fibrine est déposée dans le tissu, PAI-1 semble jouer un rôle important dans la progression vers une fibrose. Nos résultats ne montrent aucune différence d'expression de TPA entre les groupes expérimentaux (Figure 57). Cependant, nous constatons une plus

importante expression de la protéine PAI-1 dans le groupe II (W) ( $0,245 \pm 0,044$ ), par rapport au groupe III (W-O2) ( $0,131 \pm 0,038$ ) ( $p=0,03$ ) (Figure 58). L'aire sous la courbe pour le ratio tPA/PAI-1 ne montre aucune différence significative entre les groupes expérimentaux (Figure 59).

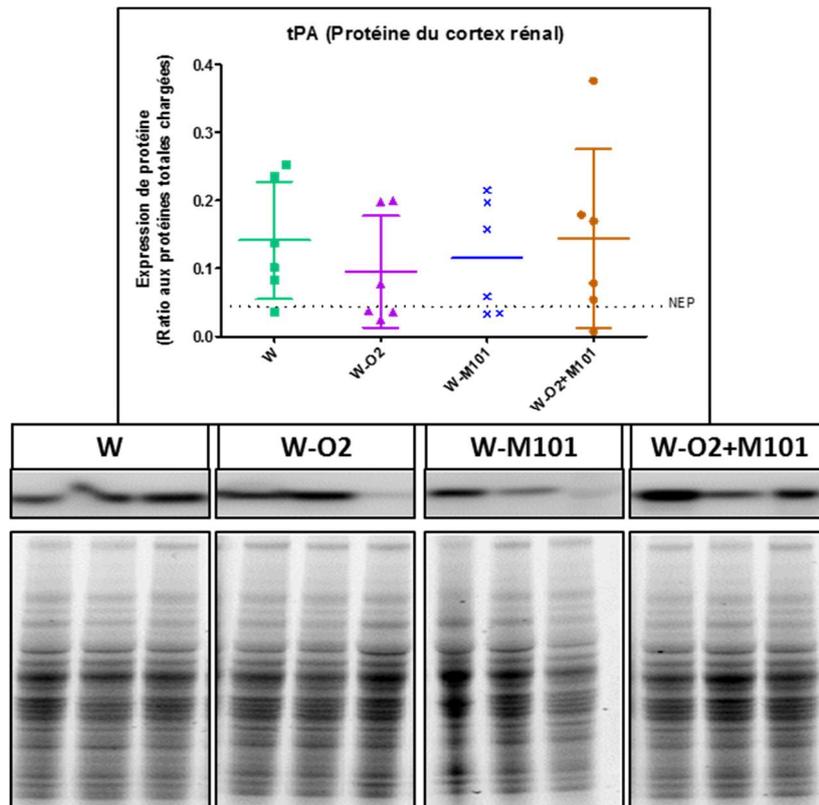


Figure 57: Expression de tPA analysée par WB à J90 post-transplantation (la partie inférieure montre les blots TPA et le stain free représentant l'ensemble des protéines chargées sur le gel)

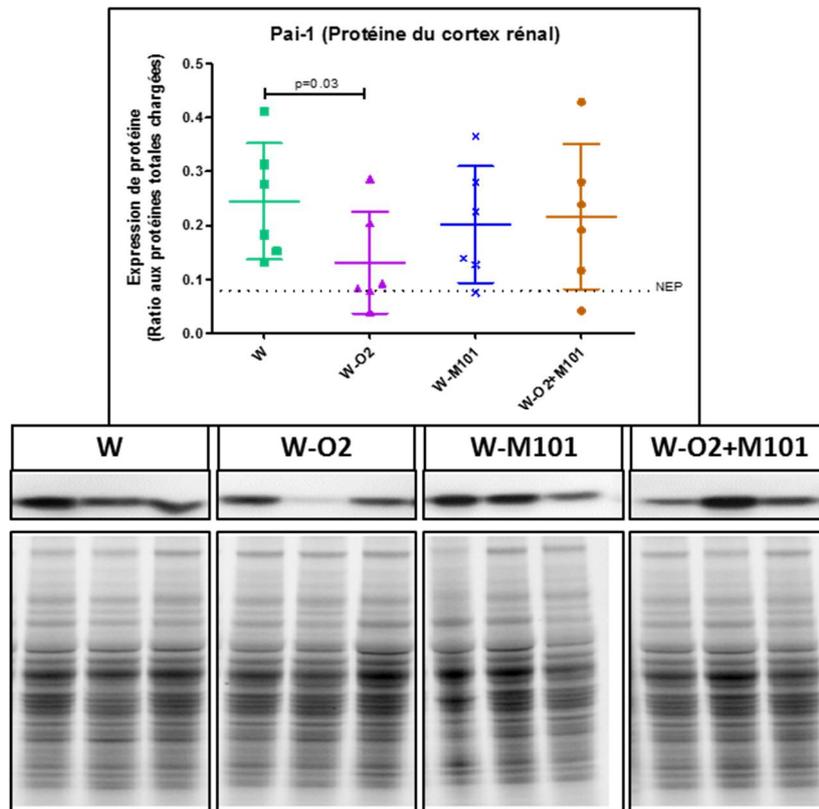


Figure 58: Expression de PAI-1 analysée par WB à J90 post-transplantation (la partie inférieure montre les blots PAI-1 et le stain free représentant l'ensemble des protéines chargées sur le gel)

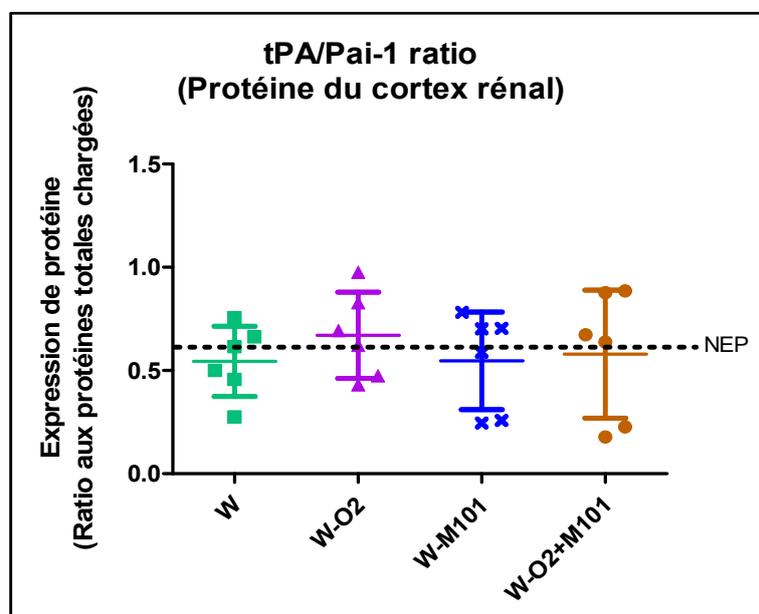


Figure 59: Le ratio tPA/PAI-1 de différents groupes expérimentaux

La voie de signalisation des Smad concerne les facteurs de croissance de la famille du Transforming growth factor (TGF- $\beta$ ). Elle permet la transduction du signal

lorsque ce facteur de croissance se lie aux récepteurs membranaires de type I et II. Le TGF- $\beta$  est un facteur de croissance qui intervient dans le développement de la fibrose. Dans ce processus CTGF (connective tissue growth factor) est un activateur de l'expression de TGF $\beta$ .

Nos résultats ne montrent aucune différence statistique d'expression de SMAD2/3 ni de Phospho SMAD2/3 entre les groupes (Figure 60) (Figure 61). Ce résultat est en lien avec le fait que nous n'observons pas également de différence statistique d'expression de CTGF entre les groupes (Figure 62).

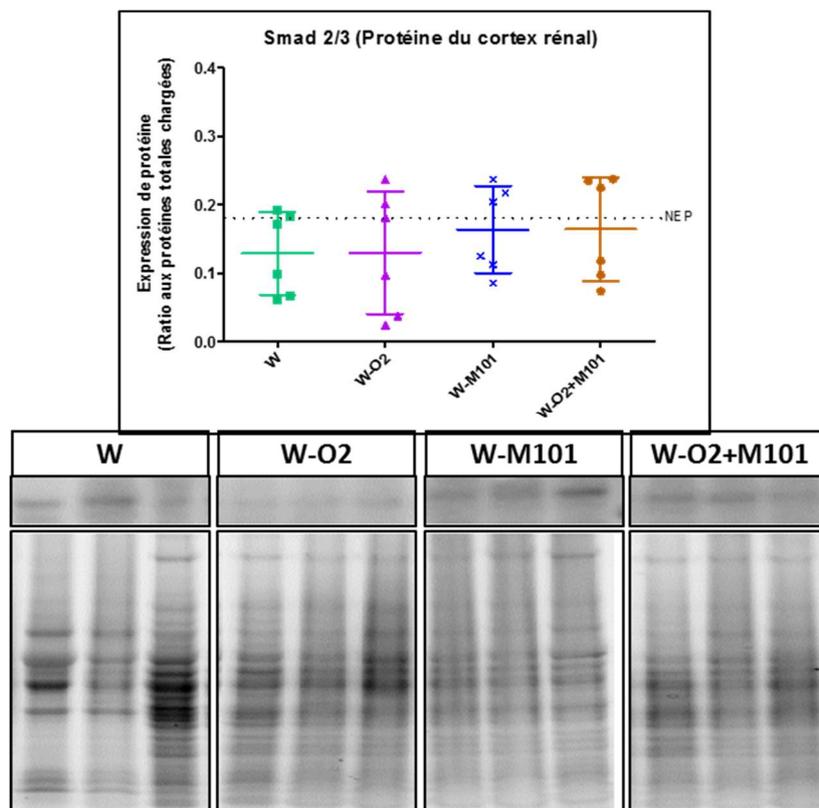


Figure 60: Expression de SMAD 2/3 analysée par WB à J90 post-transplantation (la partie inférieure montre les blots SMAD 2/3 et le stain free représentant l'ensemble des protéines chargées sur le gel)

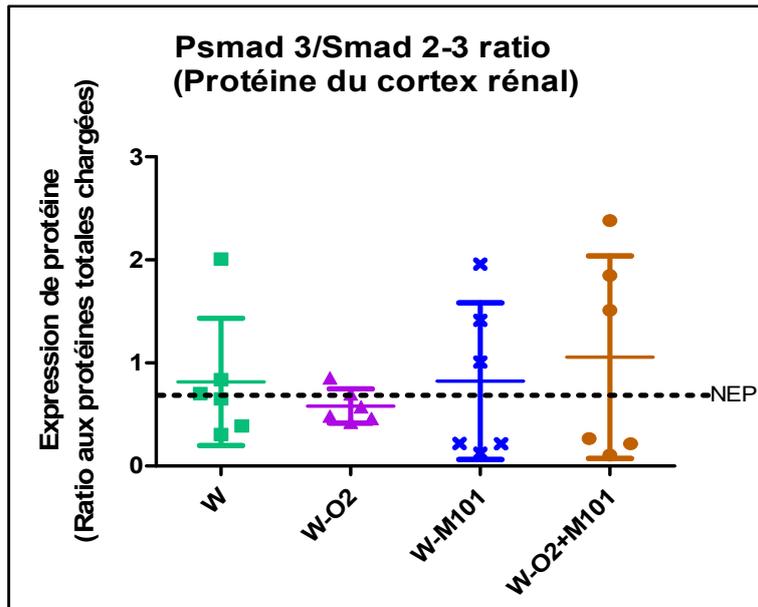


Figure 61: Le ratio PSMAD3/SMAD2/3 de différents groupes expérimentaux (la partie inférieure montre les blots phospho SMAD 2/3 et le stain free représentant l'ensemble des protéines chargées sur le gel)

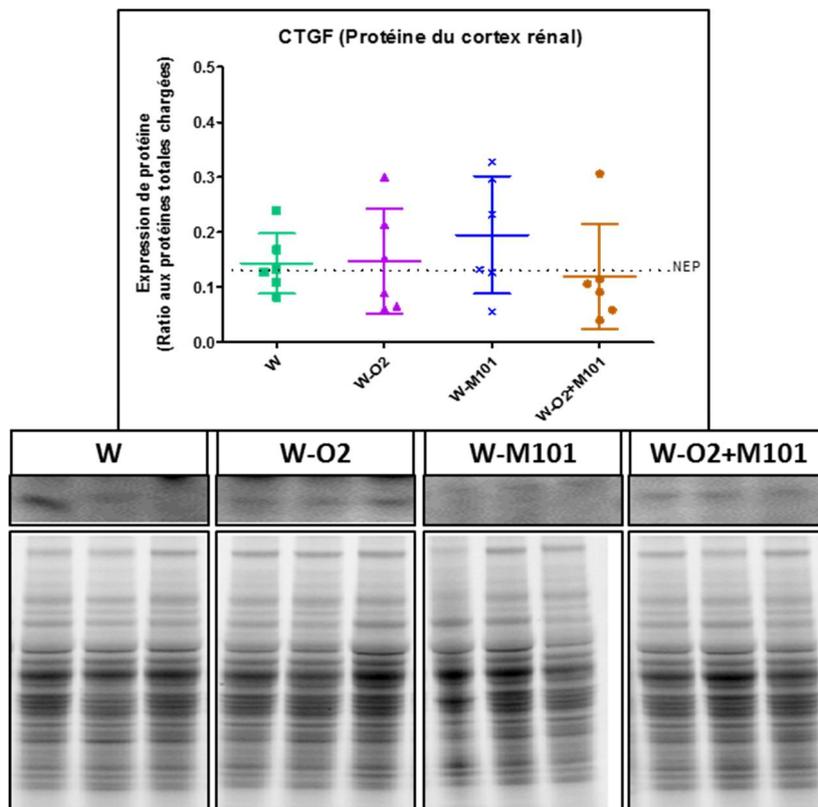


Figure 62: Expression de CTGF analysée par WB à J90 post-transplantation (la partie inférieure montre les blots CTGF et le stain free représentant l'ensemble des protéines chargées sur le gel)

Nos résultats montrent que le groupe W présente le plus de fibrose comparée aux autres groupes. Néanmoins il semble, au vu de l'analyse des protéines, que le processus de développement de la fibrose soit « terminé » car nous n'observons pas de modification d'expression des protéines impliquées dans ce développement (excepté pour l'expression importante de PAI-1 dans le groupe W).

#### 4.6. Marqueur de fonction rénale à 3 mois post-transplantation

Il est établi que les lésions de fibrose rénale et d'inflammation au sein du greffon plusieurs mois après transplantation, impactent sur la fonction rénale.

En effet, en association avec la fibrose et l'infiltrat leucocytaire, le groupe W présente une moins bonne fonction rénale à 3 mois après transplantation par rapport aux autres groupes. En effet, le groupe W-M101 présente la créatinine plasmatique la plus faible par rapport aux groupes W et W-O2+M101 ( $130,7 \pm 48,2 \mu\text{mol/L}$ ) ( $p=0,03$  et  $p=0,02$ ) (Figure 63). Le groupe W présente un taux de FeNA ( $74,7 \pm 113,5$ ) et de ratio protéinurie/créatininurie ( $8,9 \pm 14,7 \text{ g/mmol}$ ) significativement plus élevé que dans les autres groupes ( $p=0,03$ ) (Figures 64 et 65). En termes de GFR, le groupe W présente la valeur la plus faible ( $27,5 \pm 31,9 \text{ ml/min}$ ) et donc le niveau le moins physiologique, notamment par rapport au groupe W-O2 ( $80,5 \pm 45,1 \text{ ml/min}$ ) ( $p=0,01$ ) (Figure 66).

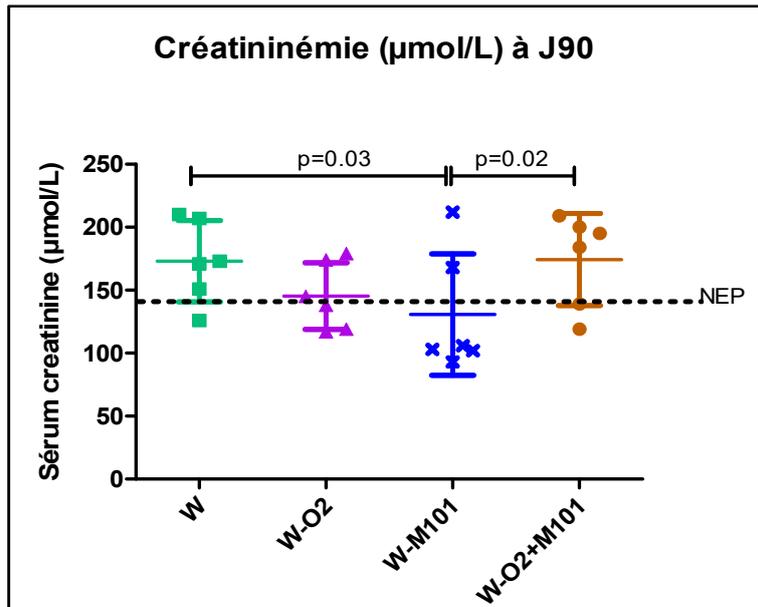


Figure 63: Évolution de la créatininémie à J90 post-transplantation de différents groupes expérimentaux

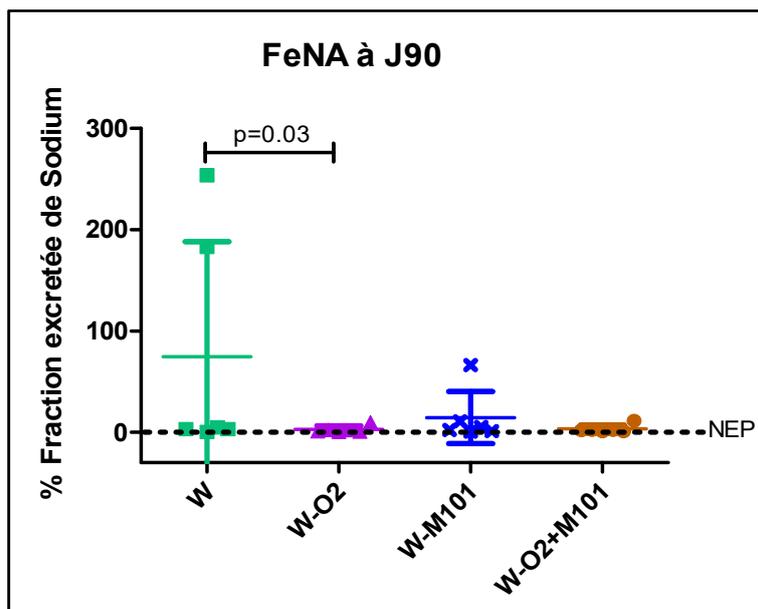


Figure 64: Évolution de FeNa à J90 post-transplantation de différents groupes expérimentaux

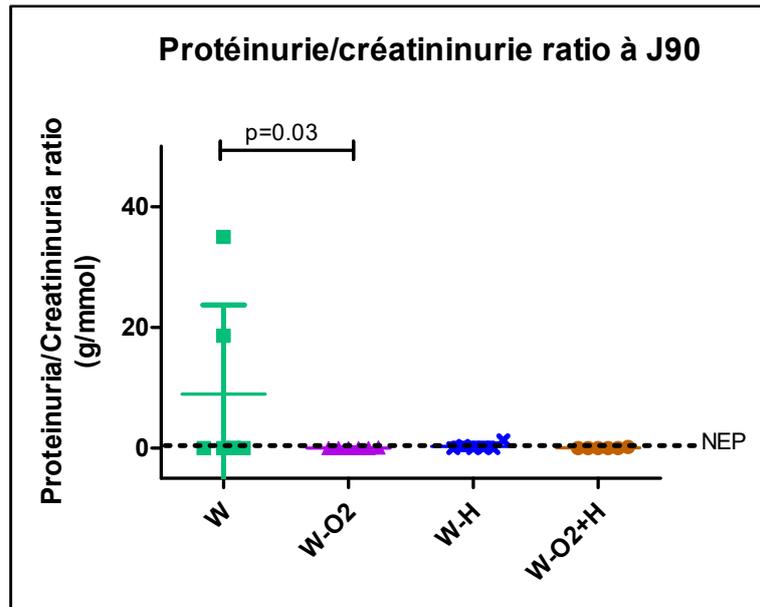


Figure 65: Évolution de protéinurie/créatininurie ratio à J90 post-transplantation de différents groupes expérimentaux

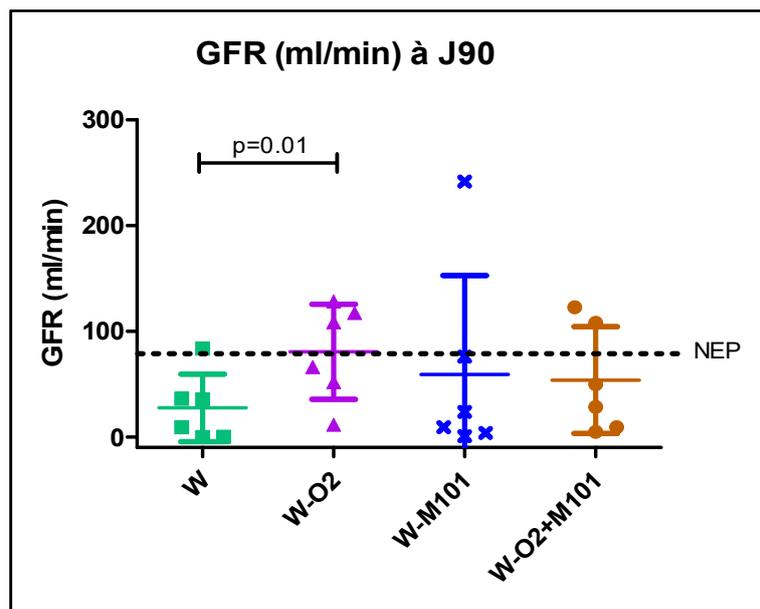


Figure 66: Évolution de GFR à J90 post-transplantation de différents groupes expérimentaux

L'ensemble de nos résultats montrent que la supplémentation en Hb (M101) améliore la qualité de la perfusion des greffons rénaux et permettent ainsi une meilleure reprise de fonction rénale et une diminution des lésions de reperfusion à court et long terme après transplantation.

# **DISCUSSION**

## 5. Discussion

Lors du processus qui conduit à la transplantation rénale (du prélèvement de l'organe à la transplantation), le greffon rénal subit une séquence d'ischémie-reperfusion (I/R) responsable de lésions du greffon. Ces lésions plus ou moins réversibles impactent sur la reprise de fonction du greffon (RRF), sur les dysfonctions et la survie du greffon à plus ou moins long terme. Ces lésions de l'I/R se traduisent, notamment, par la génération de ROS cytotoxiques. Actuellement, la pénurie de greffons, a conduit à une augmentation de prélèvement d'organes provenant de donneurs décédés après arrêt circulatoire (DCD) ou de donneurs de critères étendus (ECD) qui sont plus sensibles aux lésions d'I/R. Il est donc nécessaire d'optimiser les conditions de préservation du greffon afin de limiter les lésions d'I/R.<sup>11,26</sup>

Depuis la mise au point de liquide de conservation hypothermique dans les années 70 utilisés afin de préserver la qualité du greffon avant la transplantation, de nombreux changements ont été réalisés pour améliorer les solutions, ces modifications structurelles des solutions de conservations concernent des intrants et de leur composition ionique.<sup>36</sup> Par ailleurs depuis quelques années, la préservation dynamique sur machine de perfusion (MP) est devenue une alternative à la conservation statique pour des greffons fragiles, notamment issues des DCD et de donneurs marginaux. Un des problèmes principaux lors de la préservation hypothermique est le manque d'oxygène, élément essentiel au métabolisme cellulaire. C'est la raison pour laquelle, nous avons étudié deux moyens d'apporter l'oxygène au greffon lors de la conservation en MP hypothermique ; l'oxygénation active et l'utilisation d'un transporteur d'oxygène.

Dans cette étude nous avons évalué l'impact de l'oxygénation active et non-active (100% *versus* 21%) et l'ajout d'un transporteur d'oxygène (HbAm) sur le greffon rénal lors de la conservation en MP, en utilisant un modèle porcin de rein issus de DCD. Nous avons utilisé

un modèle d'auto-transplantation afin d'exclure le biais des effets des immunosuppresseurs chez le receveur. Pour ce faire, nous avons étudié 4 conditions durant la conservation MP hypothermique :

(II) non-oxygénation active (21% O<sub>2</sub>) = W

(III) oxygénation active (100% O<sub>2</sub>) = W-O2

(IV) non-oxygénation active (21%) + HbAm (2g/L) = W-M101

(V) oxygénation active (100%) + HbAm (2g/L) = W-O2+M101

Concernant les paramètres de perfusion *ex vivo*, le groupe sans oxygénation active ni supplémentation d'HbAm (W), a présenté les moins bons résultats en termes de débit de perfusion et de résistance rénale. Nous avons observé que les reins qui ont été conservés en MP avec supplémentation d'HbAm présentaient moins de résistance rénale et par conséquent un meilleur débit de perfusion. Nous avons également observé une amélioration (mais non significative) des paramètres de perfusion dans le groupe oxygénation active (W-O2) par rapport au groupe non-oxygénation active (W).

Nous avons évalué la cinétique d'expression des biomarqueurs sanguins de lésions rénale après transplantation : ASAT, NGAL, KIM-1 et IL-18, décrits comme prédictifs des lésions rénales aiguës et chroniques.<sup>127,128</sup> L'ASAT est une enzyme présente dans le compartiment intracellulaire de différents tissus dont l'épithélium rénale. La présence de cette molécule dans l'espace extracellulaire est corrélée à la sévérité de la lésion rénale.<sup>126</sup> Nous avons observé que les groupes oxygénation active (W-O2) ou avec supplémentation d'HbAm présentent moins d'ASAT circulant, ce qui pourrait révéler un effet protecteur de l'oxygénation et du transporteur d'oxygène. Ce résultat a été observé également par Hart *et al.*, qui ont montré que les niveaux d'ASAT étaient significativement plus élevés dans le groupe de conservation hépatique hypothermique sans oxygénation (0% O<sub>2</sub>) chez le rat par rapport au groupe avec

oxygénation active (95% O<sub>2</sub>).<sup>129</sup> Ce résultat est à associer au taux de LDH circulant dans notre étude. L'évaluation de la cinétique d'expression du LDH plasmatique nous renseigne sur l'état d'intégrité des membranes cellulaires et donc sur la nécrose cellulaire. Nous avons observé un faible taux de LDH circulant dans le groupe d'oxygénation active seule (W-O2) comparé aux autres conditions de conservation.

NGAL est relargué par des cellules épithéliales tubulaire endommagées et les neutrophiles activés dans le compartiment extracellulaire. Il existe en très faible concentration plasmatique (environ 0,02 µg/ml) dans les conditions normales. C'est un des premier biomarqueur qui est détecté dans le sang après la lésion rénale (2-6 h), il est défini comme prédictif des lésions du greffon après transplantation.<sup>127,128,130</sup> Nous avons observé que le taux NGAL circulant est significativement inférieur dans le groupe d'oxygénation active seule (W-O2) par rapport aux autres groupes. Ce résultat suggère que l'oxygène 100% pourrait être bénéfique au cours de la conservation, et permettrait de limiter les lésions tubulaires lors de la perfusion extracorporelle à froid. Concernant le biomarqueur membranaire KIM-1, il est fortement exprimé par l'épithélium tubulaire proximal après la lésion rénale.<sup>131</sup> Il est connu que les lésions ischémiques (stress oxydant) ou toxiques au niveau rénal induisent un clivage de KIM-1 à la surface cellulaire, relarguant dans le milieu extracellulaire l'ectodomaine de la molécule KIM-1, qui peut être quantifié en tant que biomarqueur circulant des lésions rénales aiguës.<sup>131</sup> Concernant le taux sanguin de KIM-1, Il est significativement augmenté après une lésion rénale.<sup>131</sup> Cette expression circulante augmente entre 12h et 24h après la lésion rénale.<sup>132,133</sup> Le taux de KIM-1urinaire et sanguin est prédictif des lésions rénales aiguës et chroniques.<sup>127</sup> KIM-1 pourrait jouer un rôle de régulateur dans la récupération des lésions rénales car c'est un récepteur de la phosphatidylsérine qui intervient dans l'efférocytose (phagocytose des particules apoptotiques)<sup>134,135</sup> Néanmoins, Gandhi *et al.*, ont confirmé que les ROS peuvent augmenter le clivage de l'ectodomaine de KIM-1 à la surface cellulaire

(augmentation de KIM-1 circulant).<sup>134</sup> Il est établi que l'expression prolongée de KIM-1 circulant est un facteur de fibrose.<sup>136</sup> En corrélation avec ces données, nos résultats montrent que un niveau élevé précoce de KIM-1 circulant dans le groupe d'oxygénation active seule (W-O2) est associé à un niveau plus élevé de fibrose. Il est intéressant de noter que nos résultats montrent que l'HbAm seule semble agir comme une condition protectrice limitant le taux de KIM-1 circulant (probablement via une inhibition du clivage de KIM-1) et induisant à long terme une diminution du niveau de fibrose. Cependant, l'addition d'HbAm et de l'oxygénation active (W-O2 + M101) semble diminuer le niveau de fibrose malgré un taux élevé de KIM-1 circulant comparé au groupe de supplémentation d'HbAm seule (W-M101). Cela pourrait être expliqué par le niveau important d'oxygène dans la condition d'oxygénation active (100% O<sub>2</sub>) qui induit une production plus importante de ROS<sup>129</sup> et donc induit le clivage de KIM-1. Tandis que l'activité anti-ROS de l'HbAm<sup>123</sup> pourrait limiter le clivage de KIM-1 (comme expliqué par Gandhi)<sup>134</sup>. Ce résultat a suggéré que la balance entre ROS/ anti-ROS (pro oxydant / antioxydant) est un équilibre clé dans le clivage de KIM-1, régulant ainsi le niveau de lésions générées par KIM-1 circulant. L'IL-18 est une cytokine pro-inflammatoire, produite par les cellules tubulaires proximales endommagées, qui augmente précocement dans le milieu extracellulaire après la lésion rénale.<sup>128,133,137</sup> L'IL-18 sérique est utilisé comme un marqueur de progression de maladie puisqu'il est considéré que l'IL-18 contribue au processus de détérioration de l'organe et joue un rôle important dans l'inflammation et la pathogenèse de la fibrose.<sup>137,138</sup> Dans notre étude, nous avons noté que l'augmentation du taux sérique d'IL-18 dans le groupe sans oxygénation active (W) était associé à une importante diminution de la GFR et à une augmentation du ratio protéinurie/créatininurie et la créatininémie, ainsi que de la fibrose et l'infiltration leucocytaire à 3 mois après transplantation. Nos résultats confirment ainsi les résultats de Serwin *et al.*<sup>137</sup> L'IL-18 est un médiateur important dans les lésions rénales ischémiques qui

induit l'infiltration leucocytaire dans parenchyme rénal et est corrélé avec la sévérité de la protéinurie.<sup>133,139-141</sup> Dans notre modèle, l'IL-18 semble être le biomarqueur le plus pertinent car son profil de sécrétion entre les groupes est associé aux complications tardives observées (ratio de protéinurie/créatininurie, fibrose et infiltration leucocytaire/mastocytaire). Dans nos résultats, la corrélation entre la faible résistance rénale durant la perfusion MP, le faible taux d'IL-18 sérique (entre J0 et J7 post-transplantation), la meilleure reprise de fonction, ainsi que la diminution de la fibrose, un faible taux de créatininémie à J90 post-transplantation, dans le groupe W-M101, suggère que l'IL-18 sérique précoce et la résistance rénale pourraient être des indicateurs prédictifs pour la fonction/survie du greffon rénal. Ceci est en accord les travaux de Patel *et al.*, qui ont établi que l'augmentation de la résistance rénale au cours de la conservation en MP est associée à une forte incidence de la RRF et une moins bonne survie du greffon.<sup>142</sup>

Il est intéressant de noter que nos résultats révèlent que pendant la première semaine post-transplantation, les faibles taux de KIM-1 et d'IL-18 circulants sont à mettre sur le compte des bénéfices de l'HbAm alors que les niveaux de NGAL et d'ASAT semblent imputables aux bénéfices de l'oxygénation active (100% O<sub>2</sub>).

Nous avons également montré un bénéfice de l'ajout d'HbAm ou de l'oxygénation active sur la reprise de fonction du greffon rénal au temps précoce après transplantation (pendant les quatre premiers jours post-transplantation). Cet effet est également visible sur le pic de la créatininémie à J3 et J7 post-transplantation. Le groupe oxygénation active (W-O2) a montré une plus grande stabilité de la GFR que le groupe de supplémentation d'HbAm (W-M101). Ces résultats sont corrélés à ceux d'une étude préclinique antérieure.<sup>108</sup> Différentes MP ont été utilisées dans cette étude, démontrant que la supplémentation en oxygène pourrait être efficace indépendamment du type de MP. Les bénéfices d'oxygénation avec 100% O<sub>2</sub> ont également été confirmés dans l'étude d'Hoyer *et al.*,<sup>143</sup> bien que le temps d'ischémie chaude

dans leur étude était plus court (30 min) que dans le nôtre (60 min). Quelques mois après transplantation, il est admis, que le taux d'expression de fibrose interstitielle, d'expression de la vimentine et d'infiltration leucocytaire soient associées à un dysfonctionnement chronique du greffon et à une perte du greffon.<sup>144-146</sup> Nos résultats mettent en évidence l'impact bénéfique de l'oxygénation active ou de la supplémentation d'HbAm sur la diminution de l'infiltration inflammatoire leucocytaire 3 mois après transplantation. La fibrose interstitielle est une lésion pathognomonique dans la perte de fonction rénale. La fibrose peut se développer soit de manière directe, via le TGF- $\beta$  et le CTGF, soit via l'EMT (Transition épithélio-mésenchymateuse). L'expression de la vimentine dans les tissus rénaux est l'un des marqueurs d'EMT. L'EMT est caractérisée par la perte de polarité des cellules épithéliales tubulaires, modifiant leur phénotype pour devenir des cellules mésenchymateuses proliférantes favorisant le développement de la fibrose.<sup>147,148</sup> Dans notre étude, nous avons observé que l'expression de la vimentine et des fibres de collagènes I et III (rouge Sirius) était plus élevée dans les groupes sans supplémentation d'HbAm (W et W-O2) comparés aux groupes avec supplémentation d'HbAm (W-M101 et W-O2+M101). Cela suggère que l'utilisation d'HbAm durant la préservation hypothermique induit 3 mois après transplantation une diminution de la fibrose, comme précédemment observé dans l'étude préclinique de Thuillier *et al.*<sup>107</sup> La fibrose est un processus compliqué impliquant différentes voies et ciblant différentes cellules, cependant une corrélation a été suggérée entre l'infiltration mastocytaire et la fibrose rénale.<sup>149-151</sup> En effet, il est connu que l'infiltration mastocytaire augmente dans le parenchyme rénal endommagé et cette infiltration est corrélée au niveau de la fibrose, via la sécrétion de tryptase qui induit la prolifération fibroblastique notamment via le CTGF.<sup>149,151-153</sup> Dans notre étude, nous avons observé une infiltration mastocytaire plus élevée dans le groupe sans oxygénation active ni de supplémentation d'HbAm (W), alors qu'elle était

quasiment nulle dans les groupes soit avec oxygénation active (W-O2) ou supplémentation d'HbAm (W-M101), soit l'addition des deux (W-O2+M101).

En parallèle de l'étude histologique, 3 mois après transplantation nous avons évalué l'expression des protéines impliquées dans le phénomène de développement de la fibrose, telle que MMP-2, tPA, Pai-1, Smad 2/3 et CTGF et de l'inflammation, telles qu'IL-10, iNOS GP91<sup>phox</sup> et FoxP3.

La protéine MMP-2 est considérée comme une protéine anti-fibrosante capable de dégrader les fibres de collagènes, ce qui protège l'organe de la fibrose.<sup>154</sup> L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une protéine sécrétée par l'endothélium vasculaire plusieurs jours après la lésion d'ischémie. tPA active la conversion de plasminogène en plasmine qui joue un rôle important dans le processus fibrinolytique, tPA est considérée comme un facteur anti-fibrosant.<sup>155</sup> L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (Pai-1) est l'inhibiteur essentiel de tPA. Le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) est également un facteur lié à la fibrose. L'expression de la protéine CTGF est stimulée par de nombreux stimuli y compris l'hypoxie.<sup>156</sup> CTGF est nécessaire pour l'expression de TGF- $\beta$  et de la fibrose.<sup>156</sup> La voie de Smad 2/3 est l'un des signaux principaux d'activation de TGF- $\beta$  qui joue un rôle important en développement de la fibrose rénale.<sup>157</sup> La surexpression de la phosphorylation des Smad 2/3 a été mise en évidence dans le processus du développement de la fibrose.<sup>158</sup>

Nous avons observé une augmentation d'expression (non significative) de MMP-2 dans les reins conservés en MP avec oxygénation active comparé aux groupes de non-oxygénation active. Nous avons observé que l'expression des protéines pro-fibrosantes était plus élevée dans les groupes de non-oxygénation active par rapport les groupes d'oxygénation active. Nous avons observé que l'expression de la protéine pro-fibrosante CTGF était plus basse dans

le groupe d'oxygénation active (W-O2), expliquant ainsi le niveau faible de fibrose interstitielle par rapport au groupe sans oxygénation active (W).

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire et immunosuppressive sécrétée par les cellules T régulatrices (Treg), dont le facteur de transcription caractéristique est la protéine FoxP3. Ainsi les cellules Treg diminuent la réponse immunitaire<sup>159</sup> et jouent un rôle important dans la diminution de la fibrose via l'IL-10 et l'expression de la protéine anti-fibrose FoxP3.<sup>160-162</sup> iNOS est une enzyme indépendante de  $Ca^{+2}$  qui catalyse NO. Une expression importante de iNOS s'observe dans des conditions de stress oxydante entraînant une production de NO réagi alors avec des ROS et conduit à plus de lésions cellulaires.<sup>163</sup> GP91<sup>phox</sup> est exprimée par endothélium tubulaire et leucocytes. Il est la source importante de production de ROS. Une surexpression de GP91<sup>phox</sup> s'observe notamment dans les processus inflammatoires.<sup>163</sup> Nous avons observé une plus importante expression de GP91<sup>phox</sup> et d'iNOS dans le groupe W, le groupe présentant le plus d'infiltration leucocytaire et mastocytaire et le plus de fibrose interstitielle également. Alors que, leurs expressions étaient plus faibles dans les groupes supplémentés d'oxygénation active ou d'HbAm. Nos résultats laissent suggérer que l'activité anti-ROS d'HbAm pourrait jouer un rôle protecteur induisant une diminution de production de ROS et par conséquent une diminution de l'infiltration inflammatoire et de la fibrose.

Enfin, les études de comparaison entre oxygénation active et non sont limitées et quelquefois controversées. Cependant, l'apport d'oxygène lors de la conservation MP hypothermique semble être important pour les greffons et en particulier pour ceux ayant subi une période d'ischémie chaude et/ou froide prolongée et pour les greffons de qualité médiocre (greffons issus de DCD et ECD).

## 6. Limites de l'étude

Bien que notre modèle porcin utilisé soit proche des conditions cliniques observées chez le DCD, il ne reproduit pas totalement les conditions cliniques des donneurs d'organes DCD, et il est difficile notamment d'intégrer dans le modèle animal les facteurs de comorbidités qui peuvent être multiples. De plus en clinique humaine la séquence d'ischémie chaude observée chez les DCD est induite par un arrêt circulatoire mettant en ischémie la totalité du corps, alors que dans notre modèle la séquence d'ischémie chaude concerne uniquement les reins. De plus afin de rendre notre modèle particulièrement compétitif et donc solide, nous avons dû augmenter la durée d'ischémie chaude à 1h, alors qu'en clinique cette durée d'ischémie chaude acceptée par l'agence de la biomédecine devait être inférieure à 30 min avant que 20 minutes deviennent la limite à ne pas dépasser il y a quelques mois. De plus, nous sommes affranchis dans le modèle d'auto-transplantation des médicaments immunosuppresseurs qui ont un rôle important dans le développement des lésions rénales post-transplantation et dans la néphrotoxicité. En effet, les immunosuppresseurs sont néphrotoxiques et jouent un rôle important dans la dégradation de fonction du greffon au long cours.<sup>164-166</sup>

Un des limites de ce travail, est le manque de données durant la conservation sur MP, telles que la mesure de la pression d'oxygène durant la perfusion rénale (pPO<sub>2</sub> artérielle, veineuse et corticale), la mesure du pH, et le niveau d'ATP tissulaire à la fin de la perfusion ainsi que l'activité de la protéine eNOS (endothelial nitric oxide synthase). En effet, l'activité de eNOS semble un facteur primordiale durant de la perfusion hypothermique extracorporelle, qui impacte sur la reperfusion et donc sur la reprise de fonction du greffon rénal.<sup>63</sup> Si nous avions pu disposer de ces données nous aurions pu discriminer l'impact de l'oxygénation active *versus* non-oxygénation active en présence ou non d'HbAm sur la pO<sub>2</sub> et la qualité de la préservation rénale avant la transplantation. Nous n'avons pas pu réaliser ces mesures sur les reins transplantés car cela nécessitait de perforer la cassette de perfusion, et donc de

rompre la stérilité pour introduire les sondes afin de mesurer les différentes variables (telles que pH et O<sub>2</sub>). De plus, nous ne disposions que d'une seule machine WAVES<sup>®</sup>, donc nous n'avons pas pu utiliser les reins controlatéraux pour ces expériences *ex vivo*. Ces expériences étaient prévues dans un second temps : durant les mois de suivi post-transplantation, afin d'optimiser les temps d'analyses des résultats. Cependant, du fait de problèmes de logistique et financement, nous n'avons pas encore pu réaliser ces expériences *ex vivo*, qui sont planifiées dans les mois à venir.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## 7. Conclusion et Perspectives

Notre travail de thèse a évalué les bénéfices d'utilisation de l'oxygénation active et du transporteur d'oxygène (M101) pendant de la conservation MP hypothermique des greffons rénaux prélevés dans des conditions mimant celles de donneurs décédés par arrêt circulatoire.

Dans notre modèle expérimental, il semble que la perfusion hypothermique avec une oxygénation active (100% O<sub>2</sub>) est plus délétère pour la reprise de fonction et le devenir du greffon, probablement du fait de la production de ROS, comparé aux groupes sans oxygénation active (21% O<sub>2</sub>), conformément aux observation d'Hart *et al.*<sup>129</sup>, invitant à ne pas oxygéner à 100% d'O des tissus déjà exposés à des effets de l'ischémie chaude. Nous avons montré que la supplémentation par de l'HbAm lors de la perfusion à 21% O<sub>2</sub> était la meilleure stratégie utilisable pour permettre une meilleur reprise de fonction et une diminution des lésions tardives du greffon, ceci probablement en raison des bénéfices cumulées de l'oxygène (21%) et de l'activité anti-ROS de l'HbAm, par l'activité intrinsèque de superoxyde dismutase (SOD) liée au Cu/Zn.<sup>121,122</sup> La combinaison de l'oxygénation active avec l'ajout d'HbAm lors de la conservation en MP montre peu d'effets additionnels et ne semble donc pas utile.

La supplémentation en oxygène et en HbAm au cours de la conservation en MP hypothermique, est une approche majeure dans l'amélioration de la qualité des greffons rénaux. Toutefois, un niveau adapté et contrôlé d'oxygénation est nécessaire pour limiter les lésions rénales et améliorer la fonction du greffon. De plus, la supplémentation en oxygène et en HbAm pourrait être évaluée en perfusion sub et normo-thermique, car la consommation élevée d'oxygène dans des conditions de température plus physiologiques présente plusieurs avantages par rapport à la MP hypothermique, comme suggérée par Morito *et al.*<sup>168</sup>

# **BIBLIOGRAPHIES**

## 8. Bibliographies

1. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *The Lancet*. 2013;382(9888):260–272.
2. Gigante M, Neuzillet Y, Patard J-J, et al. Renal cell carcinoma (RCC) arising in native kidneys of dialyzed and transplant patients: are they different entities?: *RCC IN DIALYSED AND TRANSPLANT PATIENTS*. *BJU Int*. 2012;110(11b):E570-E573. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11273.x
3. Woldu SL, Weinberg AC, RoyChoudhury A, et al. Renal insufficiency is associated with an increased risk of papillary renal cell carcinoma histology. *Int Urol Nephrol*. 2014;46(11):2127-2132. doi:10.1007/s11255-014-0780-4
4. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*. 1999;341(23):1725–1730.
5. RABBAT CG, THORPE KE, RUSSELL JD, CHURCHILL DN. Comparison of mortality risk for dialysis patients and cadaveric first renal transplant recipients in Ontario, Canada. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(5):917–922.
6. Garfield SS, Poret AW, Evans RW. The Cost-Effectiveness of Organ Preservation Methods in Renal Transplantation: US Projections Based on the Machine Preservation Trial. *Transplant Proc*. 2009;41(9):3531-3536. doi:10.1016/j.transproceed.2009.10.004
7. Gómez V, Galeano C, Diez V, Bueno C, Díaz F, Burgos FJ. Economic Impact of the Introduction of Machine Perfusion Preservation in a Kidney Transplantation Program in the Expanded Donor Era: Cost-Effectiveness Assessment. *Transplant Proc*. 2012;44(9):2521-2524. doi:10.1016/j.transproceed.2012.09.065
8. Agence de la biomédecine - Le rapport annuel médical et scientifique 2016. <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2016/accueil.htm>. Accessed October 25, 2017.
9. Sanchez-Fructuoso AI, Prats D, Torrente J, et al. Renal transplantation from non-heart beating donors a promising alternative to enlarge the donor pool. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(2):350–358.
10. Weber M, Dindo D, Demartines N, Ambühl PM, Clavien P-A. Kidney transplantation from donors without a heartbeat. *N Engl J Med*. 2002;347(4):248–255.
11. Akoh JA, Denton MD, Bradshaw SB, Rana TA, Walker MB. Early results of a controlled non-heart-beating kidney donor programme. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(6):1992-1996. doi:10.1093/ndt/gfp070
12. Humar A, Johnson EM, Payne WD, et al. Effect of initial slow graft function on renal allograft rejection and survival. *Clin Transplant*. 1997;11(6):623-627.

13. Boom H, Mallat MJ, de Fijter JW, Zwinderman AH, Paul LC. Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney Int.* 2000;58(2):859-866. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00235.x
14. Arias M. Impact of the delayed graft function in hypersensitized kidney transplant patients. *Transplant Proc.* 2003;35(5):1655-1657.
15. Rodrigo E, Fernández-Fresnedo G, Ruiz JC, et al. Similar impact of slow and delayed graft function on renal allograft outcome and function. *Transplant Proc.* 2005;37(3):1431-1432. doi:10.1016/j.transproceed.2005.02.052
16. Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med.* 1995;333(6):333-336.
17. Roozbeh J, Mehdizadeh AR, Izadfar MA, Razmkon A, Salahi H, Malek-Hosseini S-A. Comparison of Spousal With Other Donor Groups: Study of a Single Center. *Transplant Proc.* 2006;38(2):562-563. doi:10.1016/j.transproceed.2005.12.058
18. Karakayali F, Moray G, Colak T, Boyvat F, Haberal M. Results of Kidney Transplantation Between Spouses: A Single-Center Experience. *Transplant Proc.* 2007;39(4):898-900. doi:10.1016/j.transproceed.2007.02.051
19. Ishikawa N, Yagisawa T, Kimura T, et al. Kidney Transplantation of Living Unrelated and ABO-Incompatible Donor-Recipient Combinations. *Transplant Proc.* 2013;45(3):1242-1244. doi:10.1016/j.transproceed.2013.02.028
20. plan\_2017-2021\_pour\_la\_greffe\_d\_organes\_et\_de\_tissus.pdf.
21. Floerchinger B, Oberhuber R, Tullius SG. Effects of brain death on organ quality and transplant outcome. *Transplant Rev.* 2012;26(2):54-59. doi:10.1016/j.trre.2011.10.001
22. van der Hoeven JA, Ter Horst GJ, Molema G, et al. Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat. *Ann Surg.* 2000;232(6):804-813.
23. Bouma HR, Ploeg RJ, Schuur TA. Signal Transduction Pathways Involved in Brain Death-Induced Renal Injury. *Am J Transplant.* 2009;9(5):989-997. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02587.x
24. Mertes P-M, Longrois D, Audibert G, Charpentier C. Réanimation et mort encéphalique. In: Bruder N, Ravussin P, Bissonnette B, eds. *La réanimation neurochirurgicale*. Paris: Springer Paris; 2007:461-487. [http://link.springer.com/10.1007/978-2-287-68199-8\\_25](http://link.springer.com/10.1007/978-2-287-68199-8_25). Accessed May 13, 2016.
25. Pinsard M, Kerforne T, Mimos O. Consequences\_de\_la\_mort\_encephalique\_et\_reanimation\_du\_donneur\_d\_organes.pdf. [http://sofia.medicalistes.org/spip/IMG/pdf/Consequences\\_de\\_la\\_mort\\_encephalique\\_et\\_reanimation\\_du\\_donneur\\_d\\_organes.pdf](http://sofia.medicalistes.org/spip/IMG/pdf/Consequences_de_la_mort_encephalique_et_reanimation_du_donneur_d_organes.pdf). Published 2013. Accessed May 13, 2016.
26. Palomo-López N, Martín-Villén L, Roldán-Reina AJ, et al. Results of Controlled Donation After Circulatory Death in a Third-Level Hospital. *Transplant Proc.* 2018;50(2):536-538. doi:10.1016/j.transproceed.2017.11.051

27. Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Am J Transplant*. 3(s4):114-125. doi:10.1034/j.1600-6143.3.s4.11.x
28. Rao PS, Ojo A. The Alphabet Soup of Kidney Transplantation: SCD, DCD, ECD—Fundamentals for the Practicing Nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(11):1827-1831. doi:10.2215/CJN.02270409
29. Cecka JM. Donors without a heartbeat. <http://www.nejm.org.gate2.inist.fr/doi/pdf/10.1056/NEJMe020069>. Published July 25, 2002. Accessed July 16, 2014.
30. Dahmane D, Audard V, Hiesse C, et al. Retrospective follow-up of transplantation of kidneys from 'marginal' donors. *Kidney Int*. 2006;69(3):546–552.
31. Pascual J, Zamora J, Pirsch JD. A Systematic Review of Kidney Transplantation From Expanded Criteria Donors. *Am J Kidney Dis*. 2008;52(3):553-586. doi:10.1053/j.ajkd.2008.06.005
32. Lanchon C, Long J-A, Boudry G, et al. Transplantation rénale à partir d'un donneur décédé par arrêt circulatoire Maastricht III : première expérience française et revue de la littérature. *Prog En Urol*. 2015;25(10):576-582. doi:10.1016/j.purol.2015.06.005
33. Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annu Rev Med*. 1995;46:235-247. doi:10.1146/annurev.med.46.1.235
34. McLaren AJ, Friend PJ. Trends in organ preservation. *Transpl Int*. 2003;16(10):701–708.
35. 'tHart NA, Leuvenink HGD, Ploeg RJ. New solutions in organ preservation. *Transplant Rev*. 2002;16(3):131-141. doi:10.1053/trre.2002.124340
36. Badet L, Eugène M, Hauet T, Barrou B. L'utilisation des liquides de conservation en transplantation rénale. *Prog Urol*. 2006;16(1):25–31.
37. Maathuis M-HJ, Leuvenink HGD, Ploeg RJ. Perspectives in Organ Preservation: *Transplantation*. 2007;83(10):1289-1298. doi:10.1097/01.tp.0000265586.66475.cc
38. Rauen U, Groot H de. New Insights into the Cellular and Molecular Mechanisms of Cold Storage Injury. *J Investig Med*. 2004;52(5):299-309. doi:10.1136/jim-52-05-29
39. Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *AJP Ren Physiol*. 2004;287(2):F181-F187. doi:10.1152/ajprenal.00098.2004
40. Jamieson RW, Friend PJ. Organ reperfusion and preservation. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2008;13:221-235.
41. Opelz G, Döhler B. Multicenter analysis of kidney preservation. *Transplantation*. 2007;83(3):247-253. doi:10.1097/01.tp.0000251781.36117.27
42. Carrel A, Lindbergh CA. The Culture of Whole Organs. *Science*. 1935;81(2112):621-623. doi:10.1126/science.81.2112.621
43. LINDBERGH CA. AN APPARATUS FOR THE CULTURE OF WHOLE ORGANS. :24.

44. Opelz G, Terasaki PI. Advantage of cold storage over machine perfusion for preservation of cadaver kidneys. *Transplantation*. 1982;33(1):64-68.
45. Jochmans I, Pirenne J. Chapter 16 - Machine Perfusion of Kidneys Donated After Circulatory Death: The Carrel and Lindbergh Legacy A2 - Orlando, Giuseppe. In: Lerut J, Soker S, Stratta RJ, eds. *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*. Boston: Academic Press; 2014:211-226. doi:10.1016/B978-0-12-398523-1.00016-1
46. Rudich SM, Kaplan B, Magee JC, et al. Renal transplantations performed using non-heart-beating organ donors: going back to the future? *Transplantation*. 2002;74(12):1715-1720. doi:10.1097/01.TP.0000039165.58547.87
47. Asher J, Wilson C, Gok M, et al. Factors predicting duration of delayed graft function in non-heart-beating donor kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2005;37(1):348-349. doi:10.1016/j.transproceed.2004.11.036
48. Keizer KM, de Fijter JW, Haase-Kromwijk BJJM, Weimar W. Non-heart-beating donor kidneys in the Netherlands: allocation and outcome of transplantation. *Transplantation*. 2005;79(9):1195-1199.
49. Tennankore KK, Kim SJ, Alwayn IP, Kiberd BA. Prolonged warm ischemia time is associated with graft failure and mortality after kidney transplantation. *Kidney Int*. 2015. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085253815000642>. Accessed March 25, 2016.
50. Maathuis M-HJ, Manekeller S, van der Plaats A, et al. Improved kidney graft function after preservation using a novel hypothermic machine perfusion device. *Ann Surg*. 2007;246(6):982-988; discussion 989-991. doi:10.1097/SLA.0b013e31815c4019
51. Moers C, Smits JM, Maathuis M-HJ, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2009;360(1):7-19. doi:10.1056/NEJMoa0802289
52. Sellers MT, Gallichio MH, Hudson SL, et al. Improved outcomes in cadaveric renal allografts with pulsatile preservation. *Clin Transplant*. 2000;14(6):543-549.
53. Gallinat A, Moers C, Treckmann J, et al. Machine perfusion versus cold storage for the preservation of kidneys from donors ≥65 years allocated in the Eurotransplant Senior Programme. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(12):4458-4463. doi:10.1093/ndt/gfs321
54. De Deken J, Kocabayoglu P, Moers C. Hypothermic machine perfusion in kidney transplantation: *Curr Opin Organ Transplant*. 2016;21(3):294-300. doi:10.1097/MOT.0000000000000306
55. Lodhi SA, Lamb KE, Uddin I, Meier-Kriesche HU. Pulsatile Pump Decreases Risk of Delayed Graft Function in Kidneys Donated After Cardiac Death: Pulsatile Pump Perfusion Reduces DGF in DCD Kidneys. *Am J Transplant*. 2012;12(10):2774-2780. doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04179.x
56. McAnulty JF, Vreugdenhil PK, Lindell S, Southard JH, Belzer FO. Successful 7-day perfusion preservation of the canine kidney. *Transplant Proc*. 1993;25(1 Pt 2):1642-1644.
57. Schilling M, Saunder A, Southard JH, Belzer FO. Five-to-seven-day kidney preservation with aspirin and furegrelate. *Transplantation*. 1993;55(4):955-958.

58. Balupuri S, Mantle D, Mohamed M, et al. Machine perfusion and viability assessment of non-heart-beating donor kidneys—a single-centre result. *Transplant Proc.* 2001;33(1–2):1119-1120. doi:10.1016/S0041-1345(00)02455-6
59. Brook NR, Knight AJ, Nicholson ML. Intra-renal resistance reflects warm ischaemic damage, and is further increased by static cold storage: a model of non-heart-beating donor kidneys. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2003;9(7):BR271-275.
60. Mozes MF, Skolek RB, Korf BC. Use of perfusion parameters in predicting outcomes of machine-preserved kidneys. *Transplant Proc.* 2005;37(1):350-351. doi:10.1016/j.transproceed.2005.01.058
61. Matsuno N, Konno O, Mejit A, et al. Application of Machine Perfusion Preservation as a Viability Test for Marginal Kidney Graft: *Transplantation.* 2006;82(11):1425-1428. doi:10.1097/01.tp.0000243733.77706.99
62. Reznik ON, Bagnenko SF, Loginov IV, et al. Machine Perfusion as a Tool to Select Kidneys Recovered From Uncontrolled Donors After Cardiac Death. *Transplant Proc.* 2008;40(4):1023-1026. doi:10.1016/j.transproceed.2008.03.052
63. Chatauret N, Coudroy R, Delpesch PO, et al. Mechanistic Analysis of Nonoxygenated Hypothermic Machine Perfusion's Protection on Warm Ischemic Kidney Uncovers Greater eNOS Phosphorylation and Vasodilation. *Am J Transplant.* 2014;14(11):2500-2514. doi:10.1111/ajt.12904
64. San Miguel L, Roberfroid D, Stordeur S, Swartenbroekx N. MACHINE PERFUSION IN KIDNEYS FROM DECEASED DONORS – A RAPID ASSESSMENT. [https://kce.fgov.be/sites/default/files/page\\_documents/KCE\\_217\\_Machine\\_perfusion.pdf](https://kce.fgov.be/sites/default/files/page_documents/KCE_217_Machine_perfusion.pdf). Published February 10, 2014. Accessed February 12, 2016.
65. Southard JH, Rice MJ, Ametani MS, Belzer FO. Effects of short-term hypothermic perfusion and cold storage on function of the isolated-perfused dog kidney. *Cryobiology.* 1985;22(2):147-155. doi:10.1016/0011-2240(85)90168-3
66. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet Lond Engl.* 2004;364(9447):1814-1827. doi:10.1016/S0140-6736(04)17406-0
67. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant.* 2015;5(2):52.
68. Brezis M, Epstein FH. Cellular mechanisms of acute ischemic injury in the kidney. *Annu Rev Med.* 1993;44:27-37. doi:10.1146/annurev.me.44.020193.000331
69. Lang F, Busch GL, Gulbins E. Physiology of cell survival and cell death: implications for organ conservation. *Nephrol Dial Transplant.* 1995;10(9):1551-1555.
70. Sugiyama S, Hanaki Y, Ogawa T, Hieda N, Taki K, Ozawa T. The effects of SUN 1165, a novel sodium channel blocker, on ischemia-induced mitochondrial dysfunction and leakage of lysosomal enzymes in canine hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;157(2):433–439.

71. Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Mechanisms and Prevention. *Transplant Proc.* 2008;40(10):3279-3288. doi:10.1016/j.transproceed.2008.10.004
72. Thuillier R, Hauet T. Role of translocator protein in renal ischemia reperfusion, renal preservation and acute kidney injury. *Curr Mol Med.* 2012;12(4):413-425.
73. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation.* 1992;53(5):957-978.
74. Pratschke J, Tullius SG, Neuhaus P. Brain death associated ischemia/reperfusion injury. *Ann Transplant Q Pol Transplant Soc.* 2004;9(1):78-80.
75. Bon D, Delpech P-O, Chatauret N, Hauet T, Badet L, Barrou B. Does machine perfusion decrease ischemia reperfusion injury? *Prog En Urol.* 2014;24:S44–S50.
76. Savill J. Regulation of glomerular cell number by apoptosis. *Kidney Int.* 1999;56(4):1216-1222. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00707.x
77. Jarasch ED, Bruder G, Heid HW. Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1986;548:39-46.
78. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *AJP Cell Physiol.* 2002;282(2):C227-C241. doi:10.1152/ajpcell.00112.2001
79. Saikumar P, Dong Z, Patel Y, et al. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene.* 1998;17(26):3401–3416.
80. Semenza GL. *Cellular and Molecular Dissection of Reperfusion Injury.* Am Heart Assoc; 2000. <http://circres.ahajournals.org/content/86/2/117.short>. Accessed May 2, 2017.
81. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation.* 1983;35(3):198-204.
82. Hosgood SA, Shah K, Patel M, Nicholson ML. The effect of prolonged of warm ischaemic injury on renal function in an experimental ex vivo normothermic perfusion system. *J Transl Med.* 2015;13. doi:10.1186/s12967-015-0571-4
83. Hellegering J, Visser J, Kloke HJ, et al. Deleterious Influence of Prolonged Warm Ischemia in Living Donor Kidney Transplantation. *Transplant Proc.* 2012;44(5):1222-1226. doi:10.1016/j.transproceed.2012.01.118
84. Land WG, others. Injury to allografts: innate immune pathways to acute and chronic rejection. *Saudi J Kidney Dis Transplant.* 2005;16(4):520.
85. Land WG. The Role of Postischemic Reperfusion Injury and Other Nonantigen-Dependent Inflammatory Pathways in Transplantation: *Transplantation.* 2005;79(5):505-514. doi:10.1097/01.TP.0000153160.82975.86
86. Ascon DB, Lopez-Briones S, Liu M, et al. Phenotypic and Functional Characterization of Kidney-Infiltrating Lymphocytes in Renal Ischemia Reperfusion Injury. *J Immunol.* 2006;177(5):3380-3387. doi:10.4049/jimmunol.177.5.3380

87. Savransky V, Molls RR, Burne-Taney M, Chien C-C, Racusen L, Rabb H. Role of the T-cell receptor in kidney ischemia–reperfusion injury. *Kidney Int.* 2006;69(2):233-238. doi:10.1038/sj.ki.5000038
88. Huang Y, Rabb H, Womer KL. Ischemia–reperfusion and immediate T cell responses. *Cell Immunol.* 2007;248(1):4-11. doi:10.1016/j.cellimm.2007.03.009
89. Ysebaert DK, De Greef KE, Vercauteren SR, et al. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2000;15(10):1562-1574.
90. Brasile L, Stubenitsky BM, Booster MH, et al. Overcoming severe renal ischemia: the role of ex vivo warm perfusion. *Transplantation.* 2002;73(6):897-901.
91. Stubenitsky BM, Booster MH, Nederstigt AP, Kievit JK, Jacobs RWA, Kootstra G. Kidney preservation in the next millenium. *Transpl Int.* 1999;12(2):83–91.
92. Ahlenstiel T, Burkhardt G, Köhler H, Kuhlmann MK. Bioflavonoids attenuate renal proximal tubular cell injury during cold preservation in Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. *Kidney Int.* 2003;63(2):554-563. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00774.x
93. van der Vliet JA, Warlé MC. The need to reduce cold ischemia time in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2013;18(2):174-178. doi:10.1097/MOT.0b013e32835e2a08
94. Maessen JG, van der Vusse GJ, Vork M, Kootstra G. The beneficial effect of intermediate normothermic perfusion during cold storage of ischemically injured kidneys. A study of renal nucleotide homeostasis during hypothermia in the dog. *Transplantation.* 1989;47(3):409-414.
95. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 1986;250(6):G749-G753. doi:10.1152/ajpgi.1986.250.6.G749
96. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357(11):1121–1135.
97. Land W. Postischemic reperfusion injury and allograft dysfunction: is allograft rejection the result of a fateful confusion by the immune system of danger and benefit? In: *Transplantation Proceedings.* Vol 31. Elsevier; 1999:332–336.
98. Arroyo CM, Kramer JH, Dickens BF, Weglicki WB. Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO. *FEBS Lett.* 1987;221(1):101–104.
99. Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ, Slater TF. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res.* 1987;61(5):757–760.
100. Varadarajan R, Golden-Mason L, Young L, et al. Nitric oxide in early ischaemia reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. *Transplantation.* 2004;78(2):250-256.
101. Hare JM, Stamler JS. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest.* 2005;115(3):509-517. doi:10.1172/JCI200524459

102. Donzelli S, Switzer CH, Thomas DD, et al. The activation of metabolites of nitric oxide synthase by metals is both redox and oxygen dependent: a new feature of nitrogen oxide signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(7-8):1363–1371.
103. Terada LS, Guidot DM, Leff JA, et al. Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89(8):3362–3366.
104. Hernandez A, Light JA, Barhyte DY, Mabudian M, Gage F. Ablating the ischemia-reperfusion injury in non-heart-beating donor kidneys. *Transplantation*. 1999;67(2):200–206.
105. Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolese M, Paradies G. Ca<sup>2+</sup>-induced Reactive Oxygen Species Production Promotes Cytochrome c Release from Rat Liver Mitochondria via Mitochondrial Permeability Transition (MPT)-dependent and MPT-independent Mechanisms: ROLE OF CARDIOLIPIN. *J Biol Chem*. 2004;279(51):53103-53108. doi:10.1074/jbc.M407500200
106. Burns AT, Davies DR, McLaren AJ, Cerundolo L, Morris PJ, Fuggle SV. Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation*. 1998;66(7):872-876.
107. Doorschodt BM, Schreinemachers M-CJM, Florquin S, et al. Evaluation of a novel system for hypothermic oxygenated pulsatile perfusion preservation. *Int J Artif Organs*. 2009;32(10):728-738.
108. Thuillier R, Allain G, Celhay O, et al. Benefits of active oxygenation during hypothermic machine perfusion of kidneys in a preclinical model of deceased after cardiac death donors. *J Surg Res*. 2013;184(2):1174-1181. doi:10.1016/j.jss.2013.04.071
109. O’Callaghan J, Pall K, Pengel L. Supplemental oxygen during hypothermic kidney preservation: A systematic review. *Transplant Rev*. February 2017. doi:10.1016/j.trre.2017.02.001
110. Winslow RM. Current status of oxygen carriers ('blood substitutes'): 2006. *Vox Sang*. 2006;91(2):102-110. doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00789.x
111. Kawamura T, Kuroda Y, Saitoh Y. Long-term preservation of canine pancreas by a new simple cold storage method using perfluorochemical--the two-layer cold storage method (Euro-Collins' solution/perfluorochemical). *Kobe J Med Sci*. 1992;38(2):135-145.
112. Noguchi H, Ueda M, Nakai Y, et al. Modified two-layer preservation method (M-Kyoto/PFC) improves islet yields in islet isolation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2006;6(3):496-504. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01223.x
113. Kuroda Y, Kawamura T, Tanioka Y, et al. Heart preservation using a cavitory two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation*. 1995;59(5):699-701.
114. Kamoda Y, Fujino Y, Tanioka Y, Sakai T, Kuroda Y. Ischemically damaged heart after preservation by the cavitory two-layer method as a possible donor in rat heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26(12):1320–1325.
115. Tsujimura T, Suzuki Y, Takahashi T, et al. Successful 24-h preservation of canine small bowel using the cavitory two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2002;2(5):420-424.

116. Marada T, Zacharovova K, Saudek F. Perfluorocarbon Improves Post-Transplant Survival and Early Kidney Function following Prolonged Cold Ischemia. *Eur Surg Res.* 2010;44(3-4):170-178. doi:10.1159/000280438
117. Kim HW, Greenburg AG. Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a selected review and current status. *Artif Organs.* 2004;28(9):813–828.
118. Mozzarelli A, Ronda L, Faggiano S, Bettati S, Bruno S. Haemoglobin-based oxygen carriers: research and reality towards an alternative to blood transfusions. *Blood Transfus.* 2010;8(Suppl 3):s59.
119. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood.* 2013;121(8):1276-1284. doi:10.1182/blood-2012-11-451229
120. Buehler PW, Alayash AI. Toxicities of hemoglobin solutions: in search of in-vitro and in-vivo model systems. *Transfusion (Paris).* 2004;44(10):1516–1530.
121. Hess JR, MacDonald VW, Brinkley WW. Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *J Appl Physiol.* 1993;74(4):1769-1778.
122. Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, et al. Arenicola marina extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnol J.* 2006;1(3):333–345. doi:10.1002/biot.200500049
123. Thuillier R, Dutheil D, Trieu MTN, et al. Supplementation With a New Therapeutic Oxygen Carrier Reduces Chronic Fibrosis and Organ Dysfunction in Kidney Static Preservation: A New O<sub>2</sub> Therapeutic Molecule Improves Static Kidney Preservation. *Am J Transplant.* 2011;11(9):1845-1860. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03614.x
124. Yang P-C, Mahmood T. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North Am J Med Sci.* 2012;4(9):429. doi:10.4103/1947-2714.100998
125. Dent CL, Ma Q, Dastrala S, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts acute kidney injury, morbidity and mortality after pediatric cardiac surgery: a prospective uncontrolled cohort study. *Crit Care Lond Engl.* 2007;11(6):R127. doi:10.1186/cc6192
126. Jochmans I, Lerut E, van Pelt J, Monbaliu D, Pirenne J. Circulating AST, H-FABP, and NGAL are early and accurate biomarkers of graft injury and dysfunction in a preclinical model of kidney transplantation. *Ann Surg.* 2011;254(5):784-791; discussion 791-792. doi:10.1097/SLA.0b013e3182368fa7
127. Sabbiseti VS, Waikar SS, Antoine DJ, et al. Blood Kidney Injury Molecule-1 Is a Biomarker of Acute and Chronic Kidney Injury and Predicts Progression to ESRD in Type I Diabetes. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2014;25(10):2177. doi:10.1681/ASN.2013070758
128. Sung W-C, Yu H-P, Tsai Y-F, Chung PC-H, Lin C-C, Lee W-C. The ratio of plasma interleukin-18 is a sensitive biomarker for acute kidney injury after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2014;46(3):816-817. doi:10.1016/j.transproceed.2013.09.055
129. Hart NA 't, Plaats A van der, Faber A, et al. Oxygenation during hypothermic rat liver preservation: An in vitro slice study to demonstrate beneficial or toxic oxygenation effects. *Liver Transpl.* 2005;11(11):1403-1411. doi:10.1002/lt.20510

130. Charlton JR, Portilla D, Okusa MD. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(7):1301-1311. doi:10.1093/ndt/gft510
131. Zhao X, Zhang Y, Li L, et al. Glomerular expression of kidney injury molecule-1 and podocytopenia in diabetic glomerulopathy. *Am J Nephrol*. 2011;34(3):268-280. doi:10.1159/000330187
132. Urbschat A, Obermüller N, Haferkamp A. Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers*. 2011;16(sup1):S22-S30. doi:10.3109/1354750X.2011.587129
133. Lombi F, Muryan A, Canzonieri R, Trimarchi H. Biomarkers in acute kidney injury: Evidence or paradigm? *Nephrol Engl Ed*. 2016;36(4):339-346. doi:10.1016/j.nefro.2016.10.006
134. Gandhi R, Yi J, Ha J, et al. Accelerated receptor shedding inhibits kidney injury molecule-1 (KIM-1)-mediated efferocytosis. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2014;307(2):F205. doi:10.1152/ajprenal.00638.2013
135. Yang L, Brooks CR, Xiao S, et al. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. *J Clin Invest*. 2015;125(4):1620-1636. doi:10.1172/JCI75417
136. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1: a translational journey. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2014;125:293-299; discussion 299.
137. Serwin NM, Wiśniewska M, Jesionowska A, Skwirczyńska E, Marcinowska Z, Dołęgowska B. Serum levels of 12 renal function and injury markers in patients with glomerulonephritis. *Pol Arch Med Wewn*. 2016;126(7-8):483-493. doi:10.20452/pamw.3477
138. Liang D, Liu H-F, Yao C-W, et al. Effects of interleukin 18 on injury and activation of human proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Carlton Vic*. 2007;12(1):53-61. doi:10.1111/j.1440-1797.2006.00737.x
139. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:463-493. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094615
140. McIlroy DR, Wagener G, Lee HT. Biomarkers of acute kidney injury: an evolving domain. *Anesthesiology*. 2010;112(4):998-1004. doi:10.1097/ALN.0b013e3181cded3f
141. Fang L, Xie D, Wu X, Cao H, Su W, Yang J. Involvement of endoplasmic reticulum stress in albuminuria induced inflammasome activation in renal proximal tubular cells. *PLoS One*. 2013;8(8):e72344. doi:10.1371/journal.pone.0072344
142. Patel SK, Pankewycz OG, Nader ND, Zachariah M, Kohli R, Laftavi MR. Prognostic Utility of Hypothermic Machine Perfusion in Deceased Donor Renal Transplantation. *Transplant Proc*. 2012;44(7):2207-2212. doi:10.1016/j.transproceed.2012.07.129
143. Hoyer DP, Gallinat A, Swoboda S, et al. Influence of oxygen concentration during hypothermic machine perfusion on porcine kidneys from donation after circulatory death. *Transplantation*. 2014;98(9):944-950. doi:10.1097/TP.0000000000000379
144. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation*. 2004;78(2):242-249.

145. Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ. Chronic Renal Allograft Dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(10):3015-3026. doi:10.1681/ASN.2005050463
146. Rush DN, Cockfield SM, Nickerson PW, et al. Factors associated with progression of interstitial fibrosis in renal transplant patients receiving tacrolimus and mycophenolate mofetil. *Transplantation*. 2009;88(7):897-903. doi:10.1097/TP.0b013e3181b723f4
147. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420. doi:10.1172/JCI39104
148. Li M, Luan F, Zhao Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition: An emerging target in tissue fibrosis. *Exp Biol Med*. 2016;241(1):1. doi:10.1177/1535370215597194
149. Roberts I, Brenchley P. Mast cells: the forgotten cells of renal fibrosis. *J Clin Pathol*. 2000;53(11):858. doi:10.1136/jcp.53.11.858
150. Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol-Ren Physiol*. 2002;283(5):F861-F875. doi:10.1152/ajprenal.00362.2001
151. Veerappan A, Reid AC, O'Connor N, et al. Mast cells are required for the development of renal fibrosis in the rodent unilateral ureteral obstruction model. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2012;302(1):F192. doi:10.1152/ajprenal.00562.2010
152. Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma : Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(23):15072-15077. doi:10.1073/pnas.232422999
153. Summers SA, Gan P-Y, Dewage L, et al. Mast cell activation and degranulation promotes renal fibrosis in experimental unilateral ureteric obstruction. *Kidney Int*. 2012;82(6):676-685. doi:10.1038/ki.2012.211
154. Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis Model Mech*. 2014;7(2):193-203. doi:10.1242/dmm.012062
155. Hsiao Y, Zou T, Ling C-C, Hu H, Tao X-M, Song H-Y. Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice aggravated liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23(7pt2):e258-e264. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.05100.x
156. Ramazani Y, Knops N, Elmonem MA, et al. Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2018;68-69:44-66. doi:10.1016/j.matbio.2018.03.007
157. Hu H-H, Chen D-Q, Wang Y-N, et al. New insights into TGF- $\beta$ /Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem Biol Interact*. 2018;292:76-83. doi:10.1016/j.cbi.2018.07.008
158. Varga J. Scleroderma and Smads: Dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(7):1703-1713. doi:10.1002/art.10413
159. Maganto-García E, Bu D, Tarrio ML, et al. Foxp3+ Inducible Regulatory T cells Suppress Endothelial Activation and Leukocyte Recruitment. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;187(7):3521-3529. doi:10.4049/jimmunol.1003947

160. Cao Q, Wang Y, Zheng D, et al. IL-10/TGF- $\beta$ -Modified Macrophages Induce Regulatory T Cells and Protect against Adriamycin Nephrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(6):933-942. doi:10.1681/ASN.2009060592
161. Chen G, Dong Z, Liu H, et al. mTOR Signaling Regulates Protective Activity of Transferred CD4+Foxp3+ T Cells in Repair of Acute Kidney Injury. *J Immunol*. 2016;197(10):3917-3926. doi:10.4049/jimmunol.1601251
162. Xie J, Li X, Meng D, et al. Transduction of interleukin-10 through renal artery attenuates vascular neointimal proliferation and infiltration of immune cells in rat renal allograft. *Immunol Lett*. 2016;176:105-113. doi:10.1016/j.imlet.2016.06.004
163. Lind M, Hayes A, Caprnda M, et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomed Pharmacother*. 2017;93:370-375. doi:10.1016/j.biopha.2017.06.036
164. Kreis HA, Ponticelli C. Causes of late renal allograft loss: chronic allograft dysfunction, death, and other factors. *Transplantation*. 2001;71(11 Suppl):SS5-9.
165. Pratschke J, Weiss S, Neuhaus P, Pascher A. Review of nonimmunological causes for deteriorated graft function and graft loss after transplantation. *Transpl Int*. 2008;21(6):512-522. doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00643.x
166. Kihm LP, Blume C, Seckinger J, et al. Acute effects of calcineurin inhibitors on kidney allograft microperfusion visualized by contrast-enhanced sonography. *Transplantation*. 2012;93(11):1125-1129. doi:10.1097/TP.0b013e31824f3dae
167. Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, et al. Arenicola marina extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnol J*. 2006;1(3):333-345. doi:10.1002/biot.200500049
168. Morito N, Obara H, Matsuno N, Enosawa S, Furukawa H. Oxygen consumption during hypothermic and subnormothermic machine perfusions of porcine liver grafts after cardiac death. *J Artif Organs*. July 2018:1-8. doi:10.1007/s10047-018-1063-0

Article soumis dans  
British Journal of  
Surgery

(Impact factor 5,4)

(Sigaps: Rang A)

## 9. Publication

### **Individual and combined impact of an oxygen transporter supplementation during kidney machine preservation in a porcine preclinical kidney transplantation model**

**Abdelsalam Kasil** <sup>1,2,3</sup>, **Sebastien Giraud** <sup>1,4</sup>, **Pierre Couturier** <sup>1,4,5</sup>, **Akbar Amiri** <sup>1,3</sup>,  
**Jean-Michel Goujon** <sup>1,2,6</sup>, **Raphael Thuillier** <sup>1,2,4</sup>, **Xavier Matillon** <sup>1,3,8,9</sup>, **Thierry Hauet** <sup>1,2,4,5,7</sup>, **Lionel Badet** <sup>1,3,8</sup>

---

#### **Authors' affiliations**

<sup>1</sup> INSERM U1082 (IRTOMIT), Poitiers, F-86000, France.

<sup>2</sup> Université de Poitiers, Faculté de Médecine et Pharmacie, Poitiers, F-86000, France.

<sup>3</sup> Hôpital Edouard Herriot, Service d'urologie et de Chirurgie de la Transplantation, Lyon, F-69003, France.

<sup>4</sup> CHU Poitiers, Service de Biochimie, Poitiers, F-86000, France.

<sup>5</sup> IBiSA 'plate-forme MODélisation Préclinique - Innovations Chirurgicale et Technologique (MOPICT), Domaine Expérimental du Magneraud, Surgères, F-17700, France.

<sup>6</sup> CHU de Poitiers, Service d'Anatomopathologie, Poitiers, F-86000, France.

<sup>7</sup> FHU SUPORT 'SUrvival oPtimization in ORgan Transplantation', Poitiers, F-86000, France

<sup>8</sup> Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, F-69003, France.

<sup>9</sup> CarMeN Laboratory, INSERM U1060, Villeurbanne, F-69100, France.

#### **Corresponding author**

Thierry HAUET

INSERM U1082, CHU de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, BP 577, 86021 Poitiers Cedex France

Phone : +33 5 49 44 48 29, Fax : +33 5 49 44 38 34

Email : [thierry.hauet@gmail.com](mailto:thierry.hauet@gmail.com)

## **Abbreviations**

AST: Aspartate transaminase

AUC: Area Under the Curve

DCD: Deceased after Circulatory Death

DGF: Delayed Graft Function

ECD: Expanded Criteria Donors

FeNa: Fractional Excretion of Sodium

GFR: Glomerular Filtration Rate

IL-18: Interleukine-18

IR: Ischemia-Reperfusion

IRI: Ischemia-Reperfusion Injuries

KIM-1: Kidney Injury Molecule-1

MP: Machine Perfusion

NGAL: Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin

pmh: Per million habitants

PNF: Primary graft Non-Function

SOD: SuperOxide Dismutase

## Abstract

Marginal kidney graft preservation in machine perfusion (MP) is well-established. However, this method requires improvement and clarification in order to mitigate the oxidative stress during ischemia-reperfusion (IR), by using an O<sub>2</sub> carrier HEMO<sub>2</sub>life<sup>®</sup> (M101: hemoglobin of marine worm). With a porcine *in vivo* model, kidneys were submitted to 1h-warm ischemia, followed by Waves<sup>®</sup> MP hypothermic preservation for 23h before auto-transplantation. Four groups were studied: W (MP-21% O<sub>2</sub>), W-O<sub>2</sub> (MP-100% O<sub>2</sub>), W-M101 (MP-21% O<sub>2</sub>+M101 2g/L), W-O<sub>2</sub>+M101 (100% O<sub>2</sub>+M101 2g/L), (n=6 per group). Kidneys preserved in W-M101 group showed higher perfusion flow and lower resistance, compared to other groups. During the first week post-transplantation, W-O<sub>2</sub> or W-M101 groups showed lower blood creatinine and better glomerular filtration rate. Blood levels of KIM-1 and IL-18 were lower in the W-M101 group, while blood levels of AST and NGAL were lower in groups with 100% O<sub>2</sub>. Three months after transplantation, the fractional excretion of sodium and the proteinuria/creatininuria ratio remained higher in the W group. Interstitial fibrosis evaluated at 3 months was lower in groups W-M101 and W-O<sub>2</sub>+M101. We concluded that supplementation with M101 in the 21%-O<sub>2</sub> condition improves kidney graft outcome and that M101 may limit the potentially toxic effects of hyperoxia.

## Introduction

According to current standard of practice, kidney transplantation is the best treatment for patients with end-stage kidney disease. It offers patients a better quality of life and is also beneficial for the health care system.<sup>1,2</sup> In all parts of the world, the number of patients registered on waiting lists for kidney transplantations is rising, and unfortunately, the current organ shortage is a major challenge.<sup>3</sup> This organ shortage leads to increased acceptance of high risk donors called marginal donors, such as DCD (Deceased after Circulatory Death) donors and expanded criteria cadaveric donors (ECD). Kidneys procured from such donors are more sensitive to ischemia-reperfusion (IR) syndrome and subsequently more susceptible to delayed graft function (DGF) and primary graft non-function (PNF).<sup>4,5</sup> On the other hand, organs procured from DCD can increase the pool of transplant by up to 30%.<sup>6-8</sup> To decrease these marginal donor-related complications, storage conditions need to be optimized. Despite the demonstrated benefits of machine perfusion (MP) in preserving kidneys, especially those procured from DCD, such as decreased DGF and PNF, complications arising from DCD graft transplantation remain elevated.<sup>9-12</sup> Hence, this method of organ preservation still requires improvement to minimize ischemia-related injuries.

The main purpose of cold storage is to reduce cellular metabolism and the oxygen requirement. However, even at low temperatures, the organ needs oxygen, making organ storage hypoxia one of the causes of ischemia-induced lesions. Static preservation solutions currently used neither allow optimal preservation of the graft nor respond to the lack of oxygen. Previous studies have reported the interest of oxygenation during MP, but the right level for oxygen supply and delivery modalities during cold preservation remains to be specified.<sup>13,14</sup> Otherwise, the medical device HEMO<sub>2</sub>life<sup>®</sup> (HEMARINA, Morlaix, France) contains a natural extracellular hemoglobin (M101) isolated from marine lugworm (*Arenicola marina*). This biopolymer of high molecular weight (3600 kDa) composed of 156 globin and

44 non-globin linker chains has a large O<sub>2</sub> binding capacity, carrying up to 156 O<sub>2</sub> molecules when saturated (in comparison to 4 for human). It releases O<sub>2</sub> according to a simple gradient without requiring any allosteric effector.<sup>15</sup> This medical device has recently been developed for organ protection during conservation in transplantation.<sup>16-19</sup> Thuillier *et al.*, in 2011 demonstrated that M101 at 1g/L added to kidney preservation solution (UW) considerably reduced the DGF in an *in vivo* pig model of autotransplantation.<sup>16</sup> These results were recently confirmed during a human clinical trial (OxyOp) done on 60 kidneys.<sup>20</sup>

Although there is consensus on the benefits of the MP for marginal donor kidneys, there is not yet any consensus for using active oxygenation.<sup>13,14</sup> The potential for oxygenated hypothermic machine perfusion provided by the Waves<sup>®</sup> device (Water medical systems, Rochester, MN, USA) could be an interesting way of supplying oxygen to the organ, but oxygen is a toxic component and can provoke oxidative damage if not physiologically delivered; this is a crucial issue. In addition, an oxygen carrier could further optimize preservation quality and regulate toxic hyperoxia.

In this study, we have sought to assess: (i) The benefits of oxygenation on ischemia reperfusion lesion using or not using the active oxygenation provided by the Waves<sup>®</sup> machine and, (ii) addition of M101. Separately or combined, these methods were tested in a preclinical pig kidney autotransplantation model with a 3-month follow up to assess both short and long-term outcomes.

## Materials and methods

### Experimental model and design of experiments

Animal experiments were conducted at the MOPICT platform in Surgères, France, in accordance with the ARRIVE guidelines, the French government and the Institutional Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Poitou-Charentes (France) (Accreditation number of the comity C2EA-84, Approval number of the protocol: CE2012-4). For this study, we used 3-month-old male Large White pigs weighing 35-40 kg. We designed an auto-transplant porcine model mimicking DCD <sup>21</sup> in which the kidney undergoes one hour of warm ischemia (WI) in situ by ligation of renal vessels before procurement and flush with the cold PERF-GEN<sup>®</sup> preservation solution (Institut Georges Lopez, Lissieu, France). According to the manufactural instructions of MP WAVES<sup>®</sup> (Institut Georges Lopez, Lissieu, France), at the normal condition the machine WAVES<sup>®</sup> has air pump used to blow room air through the oxygenator chamber at the level of 21% O<sub>2</sub> (called “Non-active oxygenation”). When the MP WAVES<sup>®</sup> connects to the active oxygen source, the level will be 100% O<sub>2</sub> (called “Active oxygenation”). The organ is then preserved in the Waves<sup>®</sup> for 23 hours at 4°C. Finally, the kidney is re-implanted in the same animal after nephrectomy of the contralateral kidney to mimic the reduced nephron mass situation observed in kidney-transplanted patients.

5 groups were studied (n=6 per group) (Figure 1):

Group I (**NEP**) (control group): the animal undergoes only right nephrectomy, to mimic reduced nephron mass.

Group II (**W**): the kidney is preserved by Waves<sup>®</sup> with non-active oxygenation.

Group III (**W-O2**): the kidney is preserved by Waves<sup>®</sup> with active oxygenation (100% O<sub>2</sub> input at 1L/min).

Group IV (**W-M101**): the kidney is preserved by Waves<sup>®</sup> with non-active oxygenation + 2 g M101 are added to the solution.

Group V (**W-O2+M101**): the kidney is preserved by Waves<sup>®</sup> with active oxygenation O<sub>2</sub> 100%) + 2 g M101 are added to the solution.

### **Ex vivo perfusion parameters**

Organ resistance (mmHg/mL/min/g) and flow rate (mL/min) were measured in real time by the WAVES perfusion machine software.

### **Glomerular and tubular functions evaluation**

After the transplantation, the animal was put in an individual cage for one week. Urine and blood samples were collected at specific intervals for creatinine in urine ( $U_{Cr}$ ) and plasma ( $P_{Cr}$ ), Na<sup>+</sup> in urine ( $U_{Na}$ ) and plasma ( $P_{Na}$ ) and proteins in urine determination using Cobas 8000 Modular Analyzer; Roche Diagnostic, Meylan, France). Fractional excretion of sodium was calculated as  $Fe_{Na} (U_{Na} \times P_{Cr} / U_{Cr} \times P_{Na}) \times 100$ , Glomerular filtration rate (GFR) was calculated as  $GFR = \text{Urine flow (ml/min)} \times U_{Cr} / P_{Cr}$ . Urine Proteins to creatinine ratio in urine was also calculated as Urinary Proteins (mg/L) to Urinary Creatinine (mmol/L) ratio.

### **Graft injury assessment by biomarkers**

Soluble Interleukine-18 (IL-18; Invitrogen, BMS672), Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL; Eurobio, 044) and Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1 ectodomain; Eurobio, EP0102) were assessed in serum using ELISA kits according to the manufacturer's instructions. Plasma Aspartate transaminase (AST) was also determined using Cobas 8000 Modular Analyzer; Roche Diagnostic, Meylan, France).

### **Renal histochemical and immunohistochemical evaluation at 3 months post-transplantation**

Quantification of mast cell infiltration in renal tissue was performed by immunohistochemistry using CD117 antibody (Abcam, Cambridge, United-Kingdom). Quantification of vimentin positive cells was performed by immunohistochemistry using vimentin antibody (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Histological evaluation of interstitial fibrosis by Sirius red staining was quantified with ImageJ software.

### **Statistical analysis**

All the results are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD). All statistical analyses were performed with R 3.4.2 (The R Foundation for Statistical Computing) using Kruskal-Wallis and Dunn's test multiple comparison post-test. Results with p value  $\leq 0.05$  were considered significant.

## Results

### Machine perfusion parameter evaluation

We perfused all the kidneys for 23h at 40 mmHg following manufacturer recommendations. There was a slight increase in the perfusion flow [over the whole perfusion period with area under the curve (AUC) analysis] in the groups with M101 supplementation (W-M101 and W-O2+M101) compared to the groups without M101 (W and W-O2), with significant differences between group W vs group W-M101 ( $p= 0.01$ ) (Figure 2A). Both groups supplemented with M101 showed less renal resistance with a significant difference between W-M101 vs W groups and W-O2+M101 vs W ( $p= 0.01$  and  $p= 0.05$  respectively; Figure 2B). This was confirmed by measuring end perfusion resistance, with a significant difference between W-M101 vs W ( $p= 0.04$ ) (Figure 2C).

### Early kidney function recovery evaluation from day 0 to day 7 post-transplantation

In terms of urine production recovery, at day 1 after transplantation, significant urine production was observed in 50% of the animals in W-M101 group compared to other groups. We evaluated early graft function, from day 0 to day 7 post-transplantation, *via* plasma creatinine, GFR and FeNa measurements. Plasma creatinine peaked at day 3 in all groups but tended to be lower in the W-M101 and W-O2 groups ( $\sim 700 \mu\text{mol/L}$ ) compared to the other experimental groups ( $\sim 1000 \mu\text{mol/L}$ ) (Figure 3A). As regards benefits induced by M101 and O2, plasma creatinine AUC analysis confirmed significant differences between W-M101 vs W and W-O2 vs W ( $p=0.04$  respectively; Figure 3B). GFR analysis showed that W-M101 and W-O2 groups had significantly better function compared to the W-O2+M101 group ( $p=0.02$  for both) (Figures 3C, 3D). However, no difference was observed in analysis of FeNa (Figures 3E, 3F).

### **Kidney injury biomarker evaluation from day 0 to day 7 post-transplantation**

Because urine production was inconstant after transplantation, serum levels of injury biomarkers KIM-1, IL-18, NGAL and plasma AST were analyzed over the first week. The groups with non-active oxygenation (W and W-M101) showed lower KIM-1 peak level ( $\sim$  4-5 ng/ml) than the groups with active oxygenation ( $\sim$  8-9 ng/ml) (Figure 4A). AUC analysis showed a significant difference between the W-M101 group vs W-O2 group and W-M101 group vs W-O2+M101 group (( $p=0.01$  and  $p=0.04$  respectively; Figure 4B). The groups without M101 supplementation revealed higher levels of serum IL-18 at day 1 ( $191.2\pm 83.9$  pg/ml) for W group and ( $88.7\pm 37.9$  pg/ml) for W-O2 group in comparison to the groups with M101 supplementation ( $18.6\pm 9.6$  pg/ml) for W-M101 group and ( $50.3\pm 9.4$  pg/ml) for W-O2+M101 group (figure 4C). AUC analysis showed significant IL-18 reduction with M101 supplementation in the groups with non-active oxygenation (W-M101 vs W) ( $p=0.008$ ) (Figures 4C, 4D). The groups with non-active oxygenation (W and W-M101) showed high plasma AST ( $\sim$  200-300 IU/L) compared to the groups with active oxygenation (W-O2 and W-O2+M101) ( $\sim$  80-90 IU/L). This difference was statistically significant in the groups with non-active vs. active oxygenation groups: W vs W-O2 ( $p=0.0001$ ), W vs W-O2+M101 ( $p=0.0005$ ), W-M101 vs W-O2 ( $p=0.01$ ) and W-M101 vs W-O2+M101 ( $p=0.03$ ) (Figures 4E, 4F). The group with non-active oxygenation (W-M101) showed high serum NGAL ( $\sim$  0.8 $\mu$ g/mL) compared to the groups with active oxygenation (W-O2 and W-O2+M101) ( $\sim$  0.6 $\mu$ g/mL). This difference was statistically significant in the group with non-active oxygenation versus the groups with active oxygenation: W-M101 vs W-O2 ( $p=0.007$ ), W-M101 vs W-O2+M101 ( $p=0.03$ ) (Figures 4G, 4H).

### **Kidney function and injury biomarker evaluation at day 14 post-transplantation**

At day 14 post-transplantation, plasma creatinine tended to be lower in groups W-O2 ( $122.2 \pm 14.8 \mu\text{mol/L}$ ) and W-M101 ( $129.3 \pm 26.9 \mu\text{mol/L}$ ) in comparison to the groups W ( $179.0 \pm 25.7 \mu\text{mol/L}$ ) and W-O2+M101 ( $161.1 \pm 21.9 \mu\text{mol/L}$ ), but without any statistically significant difference between the experimental groups (Figure 5A). Proteinuria/creatininuria ratio (sign of inflammation and renal damage, associated with renal disease in transplanted patients<sup>22</sup>) was higher in group W-O2 with significant difference vs the groups with non-active oxygenation (W and W-M101) ( $p=0.04$  and  $p=0.05$  respectively, Figure 5B). M101 was efficient to reduce this ratio. The group W-M101 tended to have better GFR than the other groups with significant differences; W-M101 vs W ( $p=0.01$ ), W-M101 vs W-O2 ( $p=0.03$ ) and W-M101 vs W-O2+M101 ( $p=0.01$ ) (Figure 5C).

### **Kidney function evaluation at day 90 post-transplantation**

After 90 days of follow-up, we observed that plasma creatinine of W-M101 group animals was lower compared to W ( $p=0.03$ ) and W-O2+M101 ( $p=0.02$ ) (Figure 6A). The group W tended to have more FeNa ( $\sim 20\%$ ) than other groups (W vs W-O2,  $p=0.03$ ) (Figure 6B). The group W-O2 had significantly better GFR compared to the W group ( $p=0.02$ ) (Figure 6C). Proteinuria/creatininuria ratio was significantly higher in the group W vs W-O2 ( $p=0.03$ ), vs W-M101 ( $p=0.05$ ) and vs W-O2+M101 ( $p=0.05$ ) (Figure 6D). M101 addition showed a beneficial effect even with active-oxygenation. At day 90 after transplantation, levels of serum KIM-1 and IL-18 were not significantly different between groups, highlighting the exclusively early interest of these biomarkers after renal injury (Figures 6E and 6F).

### **Histological evaluation at day 90 post-transplantation**

Interstitial fibrosis evaluated by Sirius red staining in transplanted kidneys was markedly higher in the groups without M101 supplementation compared to the groups with M101 supplementation and this difference was significant between the two groups ( $p < 0.05$ ) (Figure 7A). Similarly, evaluation of tissue kidney vimentin revealed significantly higher expression in the groups without M101 supplementation (W and W-O2) compared to the groups with M101 supplementation (W-M101 and W-O2+M101) ( $p = 0.001$ ) (Figure 7B). The tissue kidney infiltration of mast cell CD117<sup>+</sup> was also significantly higher in W group compared to all the other groups: W vs W-O2 ( $p = 0.005$ ), W vs W-M101 ( $p = 0.005$ ) and W vs W-O2+M101 ( $p = 0.005$ ) (Figure 7C).

## Discussion

Oxygenation of the preservation solution requires substantial attention as it is necessary for energy synthesis, but contrarily, its presence can also result in an increase of toxic reactive oxygen species. The level for oxygen supply and delivery modalities during cold preservation remains to be clarified to optimize clinical application.<sup>13,14</sup> In this study, we evaluated the impact of active oxygenation and of addition of an oxygen carrier (M101) on kidney DCD grafts in a porcine model of transplantation. Using an autotransplantation model to exclude the effects of the immunosuppressive drugs on the renal transplant and to focus on IR effects, we tested the respective effects of active (100%) or non-active (21%) oxygenation with or without M101 supplementation during MP preservation.

During *ex vivo* hypothermic MP preservation, the group W with neither active oxygenation nor M101 supplementation showed the worst results concerning perfusion flow and renal resistance. However, the fact that supplementation with active oxygenation alone (W-O2) did not significantly improve these parameters could be due to a vasoconstriction reaction counteracting the high oxygen supply and ROS generation, as explained by the Winslow theory.<sup>23,24</sup> On the contrary, we observed that the M101 supplementation groups had lower renal resistance, which could be due to the M101 anti-ROS and pO<sub>2</sub> regulation capacities. In fact, M101 has a high affinity to oxygen with low P<sub>50</sub>, resulting in its being an excellent oxygen carrier, which could regulate the oxygen delivery profile and physiologically controlled oxygen exchange in human microcirculation.<sup>15</sup>

In terms of early renal recovery, we observed the benefits of M101 supplementation or active oxygenation alone on the plasma creatinine peak, which was lower between day 3 and day 7 than in the other groups. These findings support previous studies showing that oxygen supplementation would be effective regardless of type of MP.<sup>13,18</sup>

Moreover, evaluation of biomarkers for early diagnosis of AKI was performed. We evaluated the biomarkers KIM-1, IL-18, NGAL and AST after transplantation as indicators of renal injury at the blood level instead of the urine level, because urine production after transplantation was not constant.<sup>28, 29</sup> Plasma AST is an enzyme found in most nucleated cells and previously reported as a good biomarker of renal injury in a preclinical pig model of kidney transplantation.<sup>27</sup> We observed that the kidneys preserved with active oxygenation or with M101 or both expressed less AST excretion, supporting as previously reported the hypothesis of a protective effect of oxygenation and oxygen carrier. Blood NGAL, which is produced by damaged kidney tubular cells and active neutrophils, is a biomarker increasing early after kidney injury, predictive of transplant lesions.<sup>25,26,28</sup> In our study, serum NGAL levels were significantly lower in active oxygenated groups, suggesting that O<sub>2</sub> could be beneficial to limit tubular cell injury during extracorporeal perfusion. In addition, M101 and active oxygenation condition reduced NGAL levels when compared to M101 alone.

KIM-1 is markedly upregulated in the proximal tubular epithelium after injury.<sup>29</sup> It is known that ischemic or toxic insults to the kidney cleave the cell surface KIM-1 ectodomain, which is quantified 12-24h after kidney injury.<sup>30,31</sup> It has been proposed that KIM-1 exposed on the apical surface of surviving proximal tubule epithelial cells plays an important role in kidney recovery because it has been shown that it acts as a phosphatidylserine receptor mediating efferocytosis to prevent tubular obstruction by apoptotic cells.<sup>32,33</sup> Otherwise, as Gandhi *et al.* confirmed in an *ex vivo* model, ROS enhances the cell surface KIM-1 shedding, and they speculated that excess KIM-1 proteolysis might occur during severe AKI and limit renal recovery.<sup>32,34</sup>

In our pre-clinical study, an early high level of circulating KIM-1 was observed in the group of active oxygenation alone, and M101 alone seems to act as a protective condition to inhibit KIM-1 cleavage. However, addition of M101 and active oxygenation showed a high

circulating KIM-1 level compared to the group M101 alone. This could be explained by a substantial O<sub>2</sub> level in active oxygenation condition; which may have induced more ROS production.<sup>14</sup> However, no difference was observed regarding KIM-1 excretion in the different experimental groups at day 90. In addition, as regards M101 anti-ROS activity our data suggest that ROS / anti-ROS balance could be a major key to limitation of injury level and that M101 could have a cardinal role.<sup>16,32</sup> Acute KIM-1 expression is adaptive and plays an important role in modulation of the innate immune response in AKI.<sup>35</sup> These data reinforce the hypothesis from the Bonventre group that KIM-1 protects the kidney early after injury *via* processes facilitated by apoptotic cell uptake. With respect to chronic kidney disease, the situation is clearly different and KIM-1 expression could be an indicator of a maladaptive situation leading to chronic kidney disease, as previously suggested.<sup>34</sup>

Concerning inflammation and IRI role in these processes, we have studied IL-18, which is a pro-inflammatory cytokine, produced by damaged proximal tubule cells, and found that it increased early after kidney injury.<sup>26,30,36</sup> Soluble IL-18 is also used as a marker of disease progression because it is believed that IL-18 contributes to the process of damaging the organ and has an important role in inflammation and the pathogenesis of fibrosis.<sup>36,37</sup> In our study, we noted that the increased level of serum IL-18 in the W group is associated with a decrease in GFR and an increase in proteinuria/creatininuria ratio and plasma creatinine level, as well as fibrosis and leucocyte infiltration, corroborating previous reports.<sup>36</sup> IL-18 is an important mediator in ischemic kidney injury promoting leucocyte infiltration to kidney parenchyma, and it is correlated with severity of proteinuria.<sup>30,38-40</sup> In our model, IL-18 seems to be a valuable biomarker because its secretion profile between the groups is correlated with late complications (GFR, proteinuria/creatininuria ratio, EMT, fibrosis and Leukocyte/Mast cell infiltration). Interestingly, the correlation between lower renal resistance, better diuresis recovery, lower blood IL-18 (from day 0 to day 7) and reduced late fibrosis and lower

creatinine level at day 90, in the W-M101 group, suggests that early increase in blood IL-18 level, associated with renal resistance could be a predictive indicator of kidney outcome. Our data are supported by a previous report showing that increased renal resistance during MP is associated with high incidence of DGF and survival graft.<sup>41</sup> Interestingly, from day 0 to day 7, blood KIM-1 and IL-18 were associated with benefits of M101 supplementation, whereas NGAL and AST seemed to be associated with benefits of oxygenation. These results suggest that the biomarkers could constitute a valuable algorithm to predict organ recovery.

Three-month post-transplantation follow-up enabled us to estimate the extent of interstitial fibrosis and tubular atrophy associated with chronic graft dysfunction and graft loss.<sup>42-44</sup> Kidneys preserved in MP with M101 supplementation showed significant less fibrosis than the other two groups (without M101) ( $p < 0.05$ ). Vimentin expression in renal tissues is an established marker of EMT (endothelial to mesenchymal transition) in which tubular epithelial cells lose their polarity and alter phenotypes to become proliferating mesenchymal cells promoting the differentiation of fibroblasts, which then boost fibrosis.<sup>45,46</sup> We observed that vimentin expression was lower in the groups supplemented with M101. Also, using active oxygenation alone (i.e. without M101) in MP seems to be damageable to the kidney with a tardive vimentin expression and increased Red Sirius staining. These data are consistent with previous reports focusing on the risks of high-flow oxygen during preservation.<sup>14</sup> In addition, M101 could reduce this side effect and limit high level oxygen toxicity and potential long term effects. In addition, it is well-known that mast cell leucocyte infiltration increases in a damaged kidney parenchyma and that this infiltration is correlated to the fibrosis level, *via* their tryptase secretion, which enhances the fibroblastic proliferation.<sup>47-50</sup> In our model, mast cell leucocyte infiltration was high in the W group while it was nearly absent in the groups of active oxygenation and/or with M101 supplementation.

In conclusion, in our model, it seems that cold perfusion with high oxygenation (100%) could have more side effects, likely *via* ROS production, than normal pressure oxygenation (21%).<sup>14</sup> We showed that M101 supplementation during perfusion at 21% O<sub>2</sub> was the best condition, probably due to the cumulative benefits of normal levels of ambient O<sub>2</sub> and M101. In addition, M101 anti-ROS activity, *via* intrinsic superoxide dismutase (SOD)-like activity linked to Cu/Zn metals, may alleviate side effects of hyperoxia.<sup>15,16</sup> Although the adequate level of oxygenation remains to be defined, perfusion supplementation with M101 and O<sub>2</sub> could be evaluated in other conditions such as sub-normothermic situation, which has been reported as being better than hypothermic perfusion in terms of organ preservation quality, as suggested by Morito et al.<sup>51</sup>

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank William Hebrard, Joris Ramalingom and Irene Launay (Plateforme MOPICT, INRA, Surgères, France) and Virginie Ameteau and Sandrine Joffrion (INSERM U1082, Université de Poitiers, CHU de Poitiers Service de Biochimie, France) for their technical support. The authors thank Jeffrey Arsham (CHU de Poitiers, France) for this excellent help in editing our English-language manuscript.

## **Disclosure**

This work was supported by grants from La Fondation CENTAURE (contract R17025GG / Allocation RAK 17007GGA), INSERM, Université de Poitiers, CHU Poitiers and Conseil Régional Poitou-Charentes (15/RPC-R-017 and 16/RPC-R-017).

## **Disclosure**

The authors declare no competing financial interests.

## Figure Legends

### **Figure 1: Experimental design of the study.**

### **Figure 2: *Ex vivo* perfusion parameters.**

Evolution of perfusion flow (A), renal resistance during 23h of cold preservation in MP Waves<sup>®</sup> (B) and renal resistance at end of preservation time (C). Results are expressed in mean  $\pm$  SD , statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis Multiple comparison Dunn's test. n=6/group.

### **Figure 3: Evaluation of early kidney function recovery from day 0 to day 7 post-transplantation.**

Evolution of plasma creatinine level (A-B), glomerular filtration rate (GFR) (C-D) and fractional excretion of sodium (FeNA) (E-F) in the different experimental groups during the first week of post-transplantation (Day 0 to Day 7). Results are expressed in kinetic curve (A, C, E) and area under the curve (B, D, F) from Day 0 to Day 7, in mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis Multiple comparison Dunn's test. n=6/group.

### **Figure 4: Evaluation of kidney injury biomarkers from day 0 to day 7 post-transplantation.**

Evolution of serum KIM-1 level (A-B), Il-18 (C-D), plasma AST (E-F) and NGAL (G-H) in the different experimental groups during the first week of post-transplantation (Day 0 to Day 7). Results are expressed in kinetic curve (A, C, E, G) and area under the curve (B, D, F, H) from Day 0 to Day 7, in mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis Multiple comparison Dunn's test. n=5-6/group.

**Figure 5: Evaluation of kidney function and injury biomarkers at day 14 post-transplantation.**

Evolution of plasma creatinine level (A), proteinuria/creatininuria ratio (B) and glomerular filtration rate (GFR) (C) at day 14 of post-transplantation. Results are expressed in mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis Multiple comparison Dunn's test. n=6/group.

**Figure 6: Evaluation of kidney function evaluation at day 90 post-transplantation.**

Evolution of plasma creatinine level (A), fractional excretion of sodium (FeNA) (B), glomerular filtration rate (GFR) (C), proteinuria/creatininuria ratio (D), serum KIM-1 (E) and IL-18 (F) at day 90 post-transplantation. Results are expressed in mean  $\pm$  SD, statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis Multiple comparison Dunn's test. n=6/group.

**Figure 7: Evaluation of histological kidney graft tissue at day 90 post-transplantation.**

Quantification of fibrosis (A; Sirius Red staining), vimentin (B) and mast cells infiltration (C; CD117 staining) at day 90 post-transplantation, in sections obtained from renal kidney cortex of different groups. Related representative images for each group showing Sirius Red staining, vimentin staining and CD117 positive mast cells staining in cortex kidney graft tissue at day 90 post-transplantation (magnification x100). Results are expressed in mean  $\pm$  SD, statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis Multiple comparison Dunn's test. n=6/group.

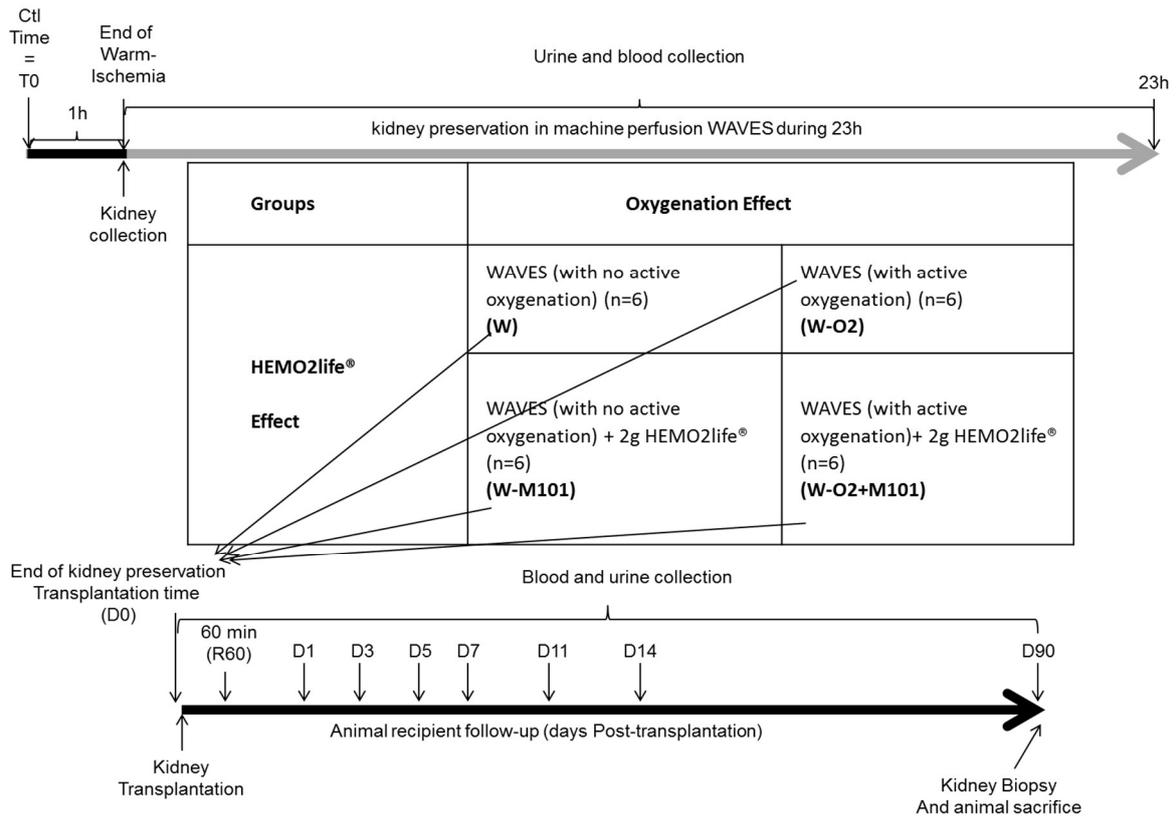


Figure 1

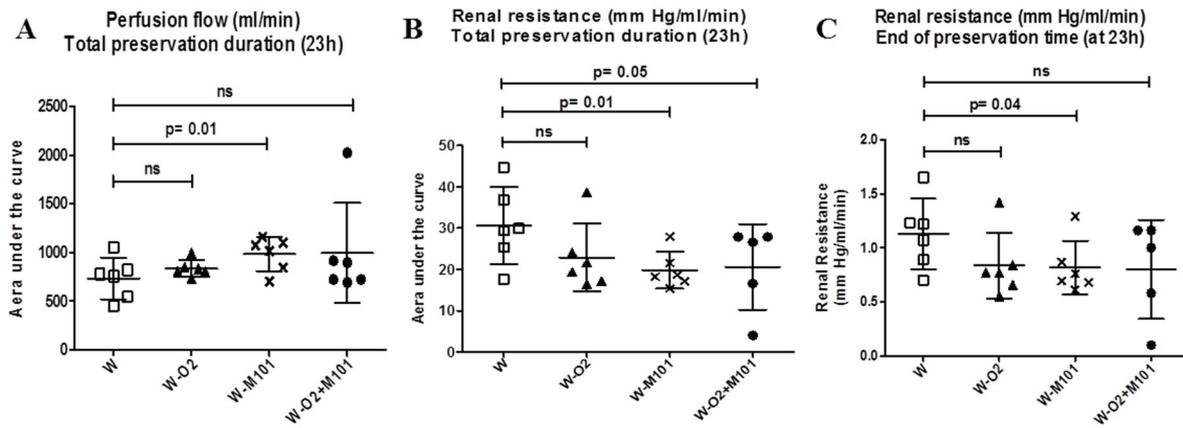
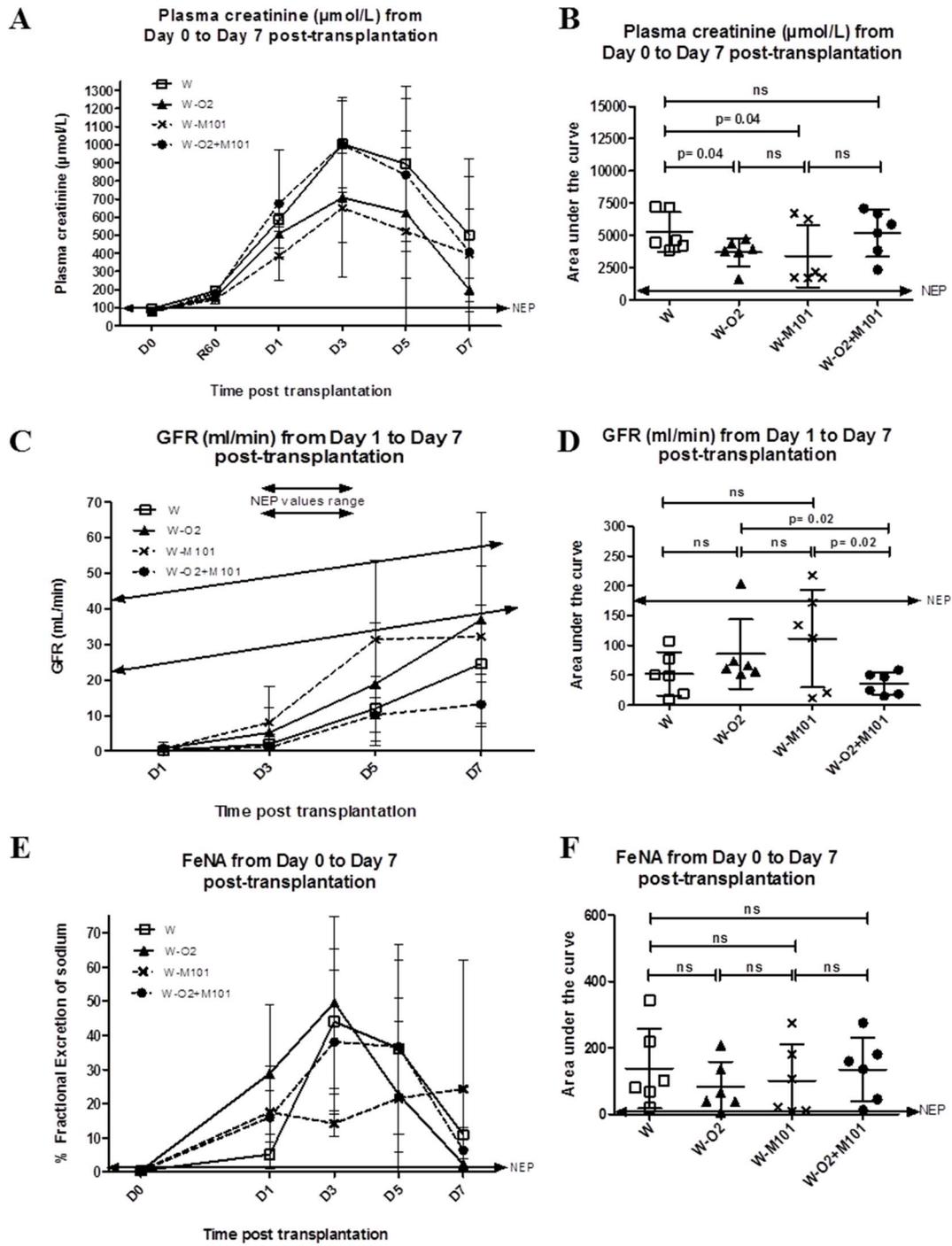


Figure 2



**Figure 3**

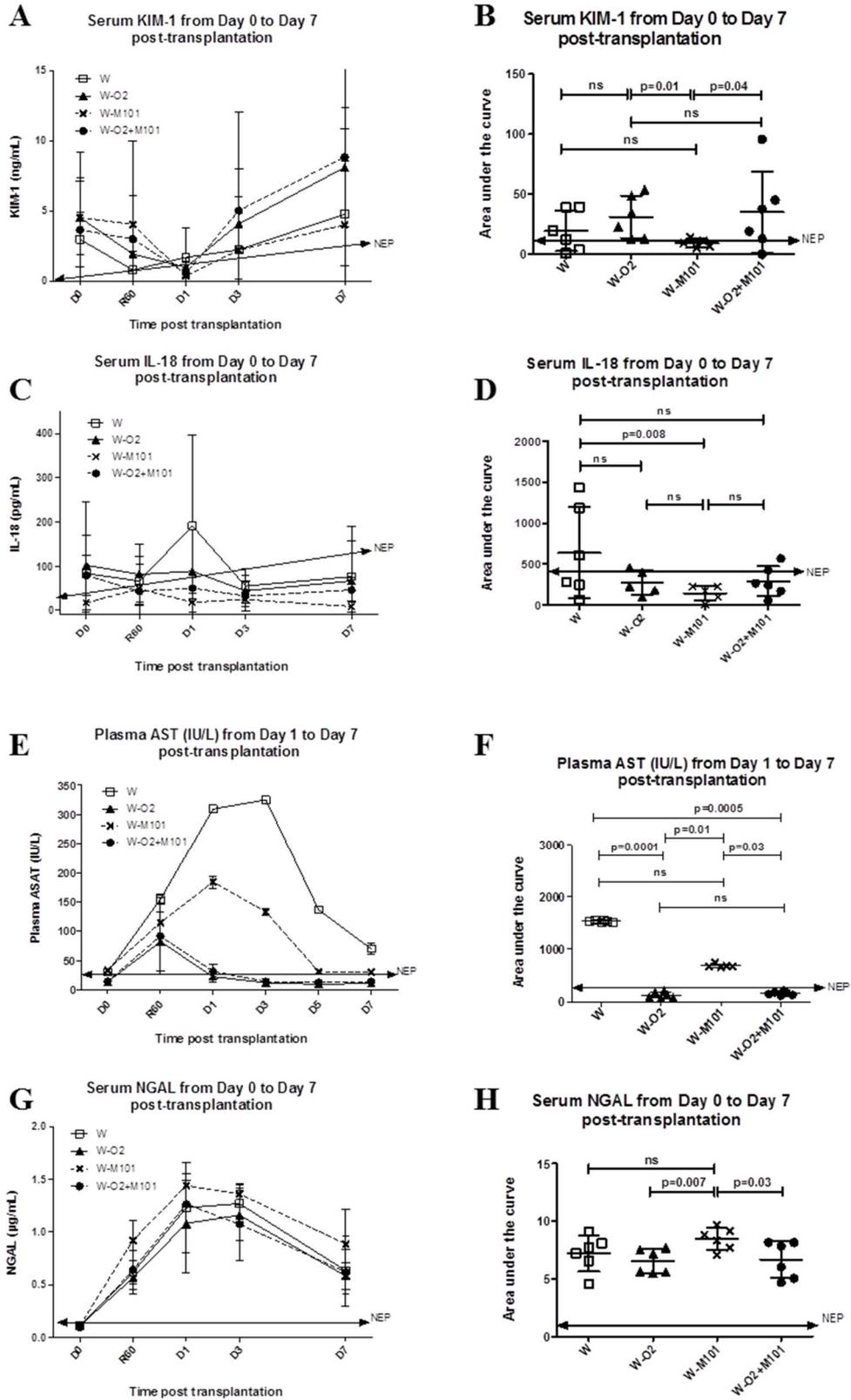
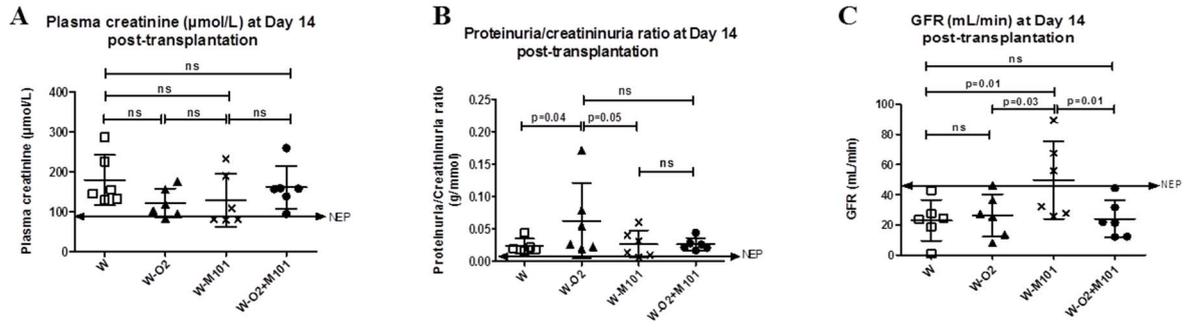


Figure 4



**Figure 5**

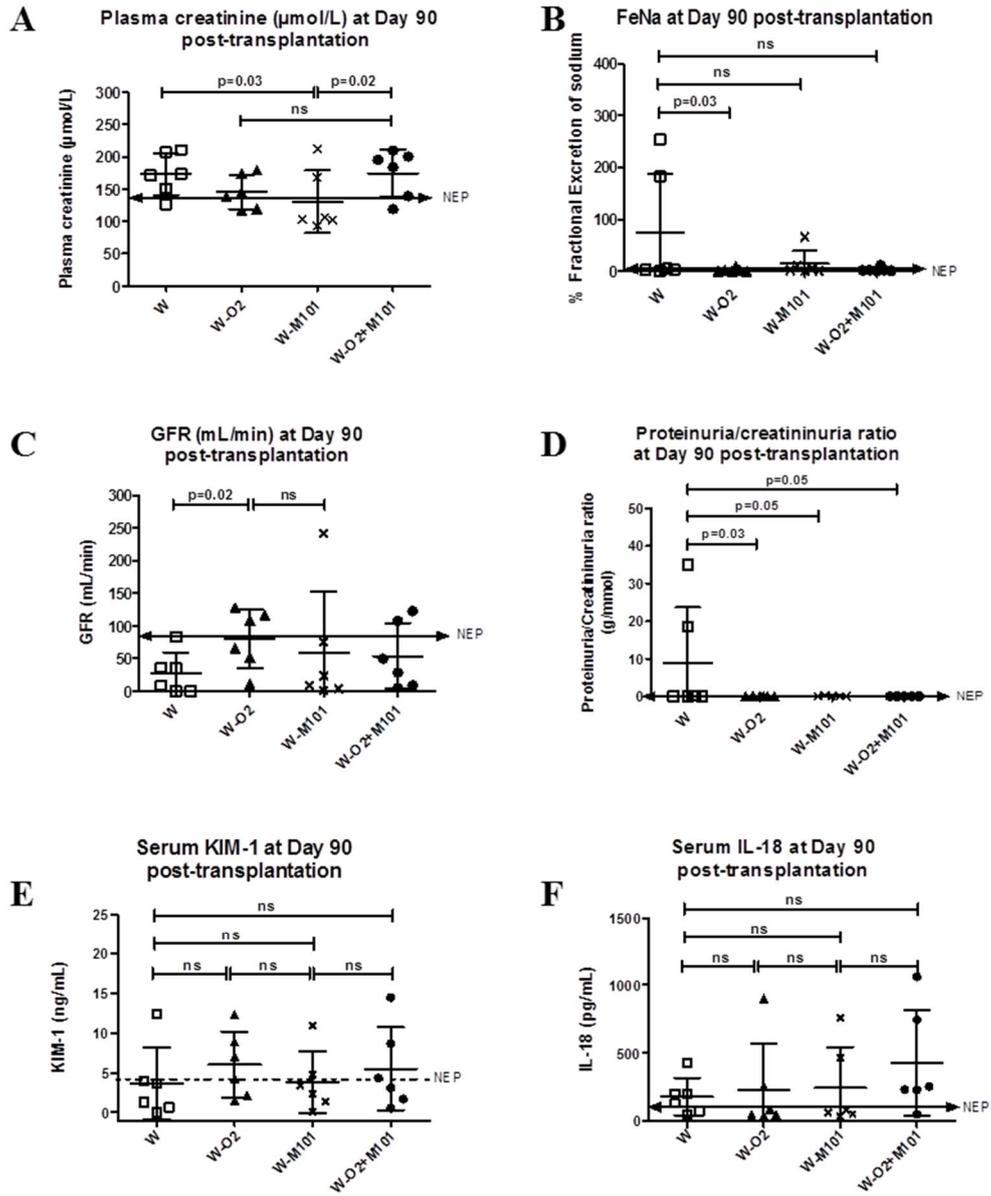
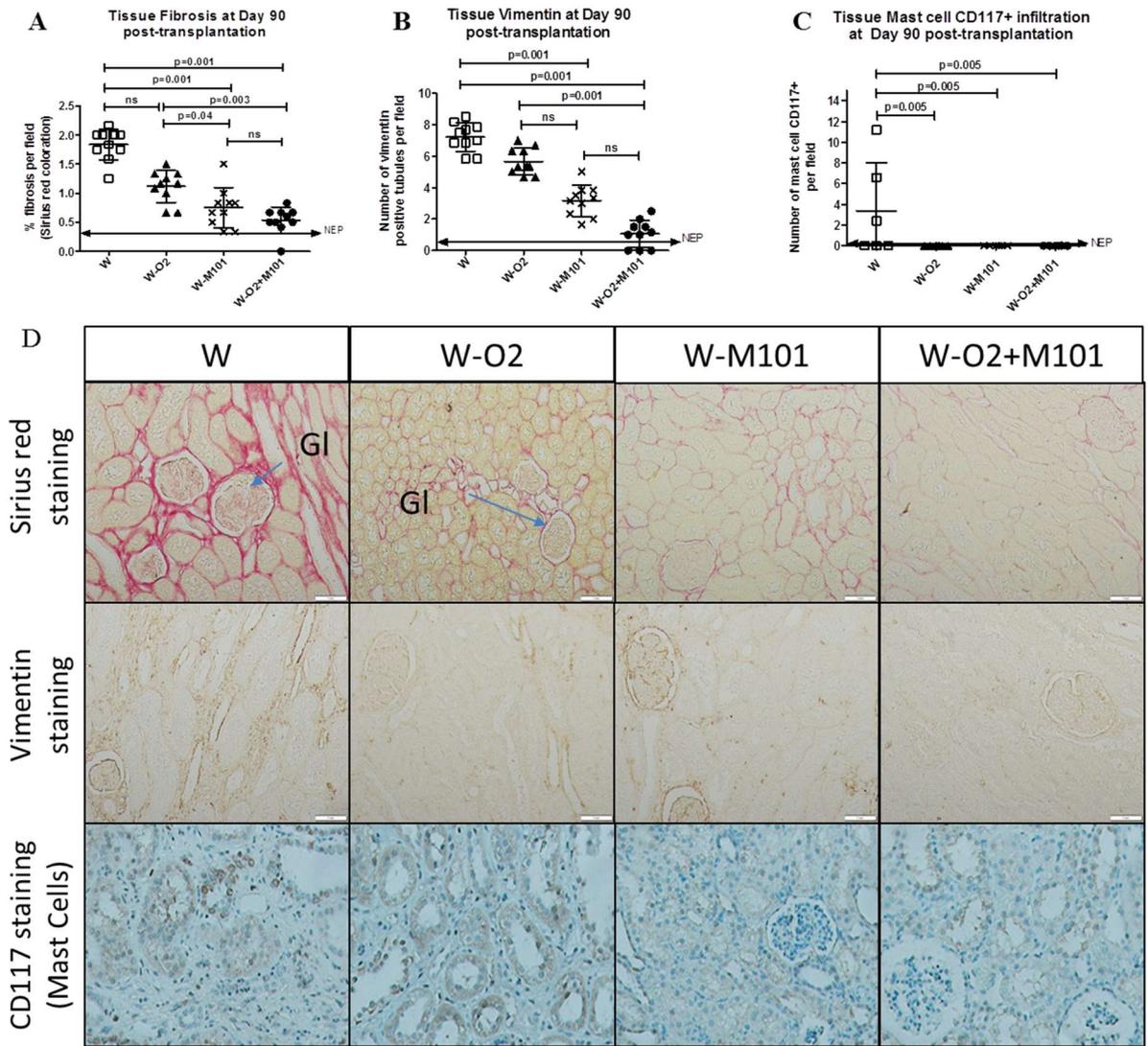


Figure 6



**Figure 7**

## References

1. Garfield SS, Poret AW, Evans RW. The Cost-Effectiveness of Organ Preservation Methods in Renal Transplantation: US Projections Based on the Machine Preservation Trial. *Transplant Proc.* 2009;41(9):3531-3536. doi:10.1016/j.transproceed.2009.10.004
2. Gómez V, Galeano C, Diez V, Bueno C, Díaz F, Burgos FJ. Economic Impact of the Introduction of Machine Perfusion Preservation in a Kidney Transplantation Program in the Expanded Donor Era: Cost-Effectiveness Assessment. *Transplant Proc.* 2012;44(9):2521-2524. doi:10.1016/j.transproceed.2012.09.065
3. Agence de la biomédecine - Le rapport annuel médical et scientifique 2016. <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2016/accueil.htm>. Accessed October 25, 2017.
4. Rudich SM, Kaplan B, Magee JC, et al. Renal transplantations performed using non-heart-beating organ donors: going back to the future? *Transplantation.* 2002;74(12):1715-1720. doi:10.1097/01.TP.0000039165.58547.87
5. Asher J, Wilson C, Gok M, et al. Factors predicting duration of delayed graft function in non-heart-beating donor kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37(1):348-349. doi:10.1016/j.transproceed.2004.11.036
6. Cecka JM. Donors without a heartbeat. <http://www.nejm.org.gate2.inist.fr/doi/pdf/10.1056/NEJMe020069>. Published July 25, 2002. Accessed July 16, 2014.
7. Akoh JA, Denton MD, Bradshaw SB, Rana TA, Walker MB. Early results of a controlled non-heart-beating kidney donor programme. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(6):1992-1996. doi:10.1093/ndt/gfp070
8. Akoh JA. Kidney donation after cardiac death. *World J Nephrol.* 2012;1(3):79. doi:10.5527/wjn.v1.i3.79
9. Sellers MT, Gallichio MH, Hudson SL, et al. Improved outcomes in cadaveric renal allografts with pulsatile preservation. *Clin Transplant.* 2000;14(6):543-549.
10. Maathuis M-HJ, Manekeller S, van der Plaats A, et al. Improved kidney graft function after preservation using a novel hypothermic machine perfusion device. *Ann Surg.* 2007;246(6):982-988; discussion 989-991. doi:10.1097/SLA.0b013e31815c4019
11. Moers C, Smits JM, Maathuis M-HJ, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2009;360(1):7-19. doi:10.1056/NEJMoa0802289
12. De Deken J, Kocabayoglu P, Moers C. Hypothermic machine perfusion in kidney transplantation: *Curr Opin Organ Transplant.* 2016;21(3):294-300. doi:10.1097/MOT.0000000000000306
13. Thuillier R, Allain G, Celhay O, et al. Benefits of active oxygenation during hypothermic machine perfusion of kidneys in a preclinical model of deceased after cardiac death donors. *J Surg Res.* 2013;184(2):1174-1181. doi:10.1016/j.jss.2013.04.071

14. Hart NA 't, Plaats A van der, Faber A, et al. Oxygenation during hypothermic rat liver preservation: An in vitro slice study to demonstrate beneficial or toxic oxygenation effects. *Liver Transpl.* 2005;11(11):1403-1411. doi:10.1002/lt.20510
15. Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, et al. Arenicola marina extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnol J.* 2006;1(3):333-345. doi:10.1002/biot.200500049
16. Thuillier R, Dutheil D, Trieu MTN, et al. Supplementation With a New Therapeutic Oxygen Carrier Reduces Chronic Fibrosis and Organ Dysfunction in Kidney Static Preservation: A New O<sub>2</sub> Therapeutic Molecule Improves Static Kidney Preservation. *Am J Transplant.* 2011;11(9):1845-1860. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03614.x
17. Mallet V, Dutheil D, Polard V, et al. Dose-Ranging Study of the Performance of the Natural Oxygen Transporter HEMO2Life in Organ Preservation. *Artif Organs.* 2014;38(8):691-701. doi:10.1111/aor.12307
18. Glorion M, Polard V, Favereau F, et al. Prevention of ischemia-reperfusion lung injury during static cold preservation by supplementation of standard preservation solution with HEMO2life<sup>®</sup> in pig lung transplantation model. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* October 2017:1-8. doi:10.1080/21691401.2017.1392315
19. Teh ES, Zal F, Polard V, Menasché P, Chambers DJ. HEMO2life as a protective additive to Celsior solution for static storage of donor hearts prior to transplantation. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 2017;45(4):717-722. doi:10.1080/21691401.2016.1265974
20. Evaluation of a Marine OXYgen Carrier (Hemo2Life<sup>®</sup>) for Organ Preservation: First Use in Kidney Transplantation in Humans - ATC Abstracts. <https://atcmeetingabstracts.com/abstract/evaluation-of-a-marine-oxygen-carrier-hemo2life-for-organ-preservation-first-use-in-kidney-transplantation-in-humans/>. Accessed October 3, 2018.
21. Vaziri N, Thuillier R, Favreau FD, et al. Analysis of machine perfusion benefits in kidney grafts: a preclinical study. *J Transl Med.* 2011;9(1):15.
22. Mombelli C, Giordani M, Imperiali N, et al. Proteinuria/Creatininuria Index and its Correlation With the 24-Hour Proteinuria in Renal Transplanted Patients. *Transplant Proc.* 2013;45(4):1635-1638. doi:10.1016/j.transproceed.2013.01.077
23. Winslow RM. Cell-free oxygen carriers: Scientific foundations, clinical development, and new directions. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics.* 2008;1784(10):1382-1386. doi:10.1016/j.bbapap.2008.04.032
24. Alayash AI. Blood substitutes: why haven't we been more successful? *Trends Biotechnol.* 2014;32(4):177-185. doi:10.1016/j.tibtech.2014.02.006
25. Sabbisetti VS, Waikar SS, Antoine DJ, et al. Blood Kidney Injury Molecule-1 Is a Biomarker of Acute and Chronic Kidney Injury and Predicts Progression to ESRD in Type I Diabetes. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2014;25(10):2177. doi:10.1681/ASN.2013070758
26. Sung W-C, Yu H-P, Tsai Y-F, Chung PC-H, Lin C-C, Lee W-C. The ratio of plasma interleukin-18 is a sensitive biomarker for acute kidney injury after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2014;46(3):816-817. doi:10.1016/j.transproceed.2013.09.055

27. Jochmans I, Lerut E, van Pelt J, Monbaliu D, Pirenne J. Circulating AST, H-FABP, and NGAL are early and accurate biomarkers of graft injury and dysfunction in a preclinical model of kidney transplantation. *Ann Surg.* 2011;254(5):784-791; discussion 791-792. doi:10.1097/SLA.0b013e3182368fa7
28. Charlton JR, Portilla D, Okusa MD. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(7):1301-1311. doi:10.1093/ndt/gft510
29. Nepal M, Bock GH, Sehic AM, Schultz MF, Zhang PL. Kidney Injury Molecule-1 Expression Identifies Proximal Tubular Injury in Urate Nephropathy. *Ann Clin Lab Sci.* 2008;38(3):210-214.
30. Lombi F, Muryan A, Canzonieri R, Trimarchi H. Biomarkers in acute kidney injury: Evidence or paradigm? *Nefrol Engl Ed.* 2016;36(4):339-346. doi:10.1016/j.nefro.2016.10.006
31. Zhao X, Zhang Y, Li L, et al. Glomerular expression of kidney injury molecule-1 and podocytopenia in diabetic glomerulopathy. *Am J Nephrol.* 2011;34(3):268-280. doi:10.1159/000330187
32. Gandhi R, Yi J, Ha J, et al. Accelerated receptor shedding inhibits kidney injury molecule-1 (KIM-1)-mediated efferocytosis. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2014;307(2):F205. doi:10.1152/ajprenal.00638.2013
33. Yang L, Brooks CR, Xiao S, et al. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. *J Clin Invest.* 2015;125(4):1620-1636. doi:10.1172/JCI75417
34. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1: a translational journey. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2014;125:293-299; discussion 299.
35. Brooks CR, Bonventre JV. KIM-1/TIM-1 in proximal tubular cell immune response. *Oncotarget.* 2015;6(42):44059. doi:10.18632/oncotarget.6623
36. Serwin NM, Wiśniewska M, Jesionowska A, Skwirczyńska E, Marcinowska Z, Dołęgowska B. Serum levels of 12 renal function and injury markers in patients with glomerulonephritis. *Pol Arch Med Wewn.* 2016;126(7-8):483-493. doi:10.20452/pamw.3477
37. Liang D, Liu H-F, Yao C-W, et al. Effects of interleukin 18 on injury and activation of human proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Carlton Vic.* 2007;12(1):53-61. doi:10.1111/j.1440-1797.2006.00737.x
38. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:463-493. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094615
39. McIlroy DR, Wagener G, Lee HT. Biomarkers of acute kidney injury: an evolving domain. *Anesthesiology.* 2010;112(4):998-1004. doi:10.1097/ALN.0b013e3181cdd3f
40. Fang L, Xie D, Wu X, Cao H, Su W, Yang J. Involvement of endoplasmic reticulum stress in albuminuria induced inflammasome activation in renal proximal tubular cells. *PLoS One.* 2013;8(8):e72344. doi:10.1371/journal.pone.0072344
41. Patel SK, Pankewycz OG, Nader ND, Zachariah M, Kohli R, Laftavi MR. Prognostic Utility of Hypothermic Machine Perfusion in Deceased Donor Renal Transplantation. *Transplant Proc.* 2012;44(7):2207-2212. doi:10.1016/j.transproceed.2012.07.129

42. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation*. 2004;78(2):242-249.
43. Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ. Chronic Renal Allograft Dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(10):3015-3026. doi:10.1681/ASN.2005050463
44. Rush DN, Cockfield SM, Nickerson PW, et al. Factors associated with progression of interstitial fibrosis in renal transplant patients receiving tacrolimus and mycophenolate mofetil. *Transplantation*. 2009;88(7):897-903. doi:10.1097/TP.0b013e3181b723f4
45. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420. doi:10.1172/JCI39104
46. Li M, Luan F, Zhao Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition: An emerging target in tissue fibrosis. *Exp Biol Med*. 2016;241(1):1. doi:10.1177/1535370215597194
47. Roberts I, Brenchley P. Mast cells: the forgotten cells of renal fibrosis. *J Clin Pathol*. 2000;53(11):858. doi:10.1136/jcp.53.11.858
48. Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma : Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(23):15072-15077. doi:10.1073/pnas.232422999
49. Summers SA, Gan P-Y, Dewage L, et al. Mast cell activation and degranulation promotes renal fibrosis in experimental unilateral ureteric obstruction. *Kidney Int*. 2012;82(6):676-685. doi:10.1038/ki.2012.211
50. Veerappan A, Reid AC, O'Connor N, et al. Mast cells are required for the development of renal fibrosis in the rodent unilateral ureteral obstruction model. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2012;302(1):F192. doi:10.1152/ajprenal.00562.2010
51. Morito N, Obara H, Matsuno N, Enosawa S, Furukawa H. Oxygen consumption during hypothermic and subnormothermic machine perfusions of porcine liver grafts after cardiac death. *J Artif Organs*. July 2018:1-8. doi:10.1007/s10047-018-1063-0