

## 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 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)  
Secteur de recherche : Aspect moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :  
Vanessa Mallet

### **Effets de la température et d'un transporteur naturel d'oxygène au cours de la conservation en transplantation rénale**

Directeur(s) de Thèse :  
Thierry Hauet

Soutenue le 12 décembre 2012 devant le jury

#### Jury :

Président	<b>Thierry Hauet</b>	Professeur des Universités, praticien hospitalier, Université de Poitiers
Rapporteur	<b>Stéphane Hourdez</b>	Chercheur, Centre d'études d'océanographie et de biologie marine de Roscoff
Rapporteur	<b>Joan Roselló-Catafau</b>	Doctor, Instituto de investigación biomédica de Barcelona, España
Membre	<b>Jean-Michel Goujon</b>	Professeur des Universités, praticien hospitalier, Université de Poitiers
Membre	<b>Franck Zal</b>	Chercheur, Centre d'études d'océanographie et de biologie marine de Roscoff
Membre	<b>Raphaël Thuillier</b>	Ingénieur de recherche, Université de Poitiers

#### **Pour citer cette thèse :**

Vanessa Mallet. *Effets de la température et d'un transporteur naturel d'oxygène au cours de la conservation en transplantation rénale* [En ligne]. Thèse Aspect moléculaires et cellulaires de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2012. Disponible sur l'Intranet de l'Université de Poitiers <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

# THESE

**Pour l'obtention du Grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS**

**Ecole doctorale : Biologie-Santé**

**Secteur de recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Présenté par : Vanessa Mallet**

**EFFETS DE LA TEMPERATURE ET D'UN  
TRANSPORTEUR NATUREL D'OXYGENE AU  
COURS DE LA CONSERVATION EN  
TRANSPLANTATION RENALE**

**Directeurs de thèse : Professeur Thierry HAUET/ Docteur Franck Zal  
Co-directeur de thèse : Docteur Raphael Thuillier**

**Soutenue le 12 décembre 2012**

**Membres du jury :**

Dr Stéphane Hourdez

Dr Joan Roselló-Catafau

Pr Jean-Michel Goujon

Dr Franck Zal

Pr Thierry HAUET

Dr Raphael Thuillier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de Thèse

Directeur de Thèse

Co-directeur de Thèse

*À ma famille,  
À Loïc,  
À Emrick*

Je remercie le docteur Stéphane Hourdez et le docteur Joan Roselló-Catafau pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je remercie également le professeur Jean-Michel Goujon pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je remercie le professeur Gérard Mauco et le professeur Thierry Hauet de m'avoir accueilli au sein du laboratoire Inserm U927/ U1082 et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je remercie le docteur Franck Zal pour l'opportunité qu'il m'a offerte de travailler sur la molécule M101. Pour le soutien financier et professionnel d'HEMARINA dont il est le représentant.

Je tiens à remercier le docteur Raphael Thuillier. Merci pour ton encadrement pendant ces années de thèse et pour ton aide.

Merci à Sébastien pour avoir encadré mes Masters et ma première de thèse. Merci pour ton soutien, ton enthousiasme, ton humour et tes expressions mémorables.

Je remercie Delphine Dutheil pour son encadrement et ses conseils.

Je remercie chaleureusement le professeur Jean Michel Goujon, Nathalie et Béatrice pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur soutien.

Je tiens à remercier Nicolas et Frédéric pour leurs conseils scientifiques et techniques toujours avisés.

Je remercie Delphine Bon et Valérie Polard pour avoir relu attentivement tout ou partie de ce manuscrit. Merci du temps consacré à redonner un peu de rigueur à ma plume qui a quelques fois tendance à déraiper...

Je remercie mes collègues et ancien collègues au sein du laboratoire : Virginie, Nadège, Sandrine, Françoise, Maïté, Delphine, Sonia, Patrick et François pour votre soutien et pour tous ces bons moments passés.

Je remercie également mes collègues et ancien collègues d'HEMARINA qui m'ont toujours si gentiment accueilli et pour m'avoir encadré lors de mes séjours à Morlaix : Alexandrine, Florie, Elodie, Morgane, Véronique, Morgane, Audrey, Magali, Jérôme et Guillaume.

Merci à tous les chirurgiens et internes en chirurgie du CHU de Poitiers qui ont participé à la réalisation des transplantations rénales porcines de ce travail. Merci à William, à Catherine et à Pierre pour leur gentillesse.

Je tiens à remercier Solenne pour sa gentillesse, son amitié et son soutien qui m'ont été très précieux.

Merci à Vivien, Edouard et Sylvain merci pour votre aide, vos conseils et votre bonne humeur. Bon courage pour la suite.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents, ma famille, mes amis et Loïc pour m'avoir supporté et encouragé pendant ces années de thèse. Merci pour votre soutien, votre aide et votre écoute inconditionnelle.

Merci à mon « loulou d'amour » pour sa joie de vivre et sa tendresse. Tu es mon rayon de soleil.

La méthode de préservation d'organes la plus utilisée actuellement en transplantation rénale est la conservation statique en hypothermie. Cependant, ce mode de conservation induit des dommages inhérents aux lésions du syndrome d'ischémie/reperfusion (IR).

Cette étude a eu pour objectif d'identifier de nouvelles conditions de préservation des greffons, afin de limiter les lésions d'IR, en modulant la température de conservation ou par ajout d'un transporteur d'oxygène.

Nous avons utilisé deux modèles : *in vitro* avec des cellules endothéliales et *in vivo* en autotransplantation rénale chez le porc.

Les résultats ont confirmé les effets délétères de la conservation à 4°C contrairement à des conservations à 19°C, 27°C et surtout 32°C, permettant d'obtenir une activité métabolique, une viabilité et une intégrité cellulaire supérieures ainsi qu'une diminution des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant.

Nous avons aussi démontré les bénéfices d'un nouveau transporteur d'oxygène, M101, dans deux des solutions de conservation les plus utilisés, dans et HTK. L'utilisation de M101 en conservation statique permet une meilleure reprise de fonction à court terme et une réduction de la fibrose, cause principale de la perte du greffon.

Enfin, nous avons montré une conservation des bénéfices de M101 à des doses réduites et déterminé que cette protection était due à une multifonctionnalité de la molécule, combinant un transporteur d'oxygène, une activité superoxyde dismutase et une taille importante (permettant de réguler la pression oncotique).

Ce travail a montré de nouvelles pistes de réflexion vers une préservation, et donc une qualité, supérieure des organes à transplanter.

**Mots clés:** Transplantation rénale, lésions d'ischémie reperfusion, hypothermie, transporteur d'oxygène, modèle porcin, modèle de cellules endothéliales

The most used preservation method in renal transplantation is hypothermic cold storage (CS). However, this method induces damages inherent to the ischemia/ reperfusion (I/R) syndrome.

My study was aimed at identifying new grafts preservation conditions, to limit IR damage, by varying storage temperature or by adding an oxygen carrier.

We used two models: *in vitro* with endothelial cells and *in vivo* in pig renal autotransplantation.

The results confirmed the deleterious effects of 4°C storage in contrast to conservations at 19°C, 27°C and above 32 ° C, resulting in improved metabolic activity, cellular viability and integrity as well as a significant reduction in markers of inflammation and oxidative stress. Then we demonstrated the benefits of a new oxygen carrier, M101, in the two most used preservation solutions, UW and HTK. Indeed, use of M101 in CS protocols improved short-term function recovery and reduced fibrosis development, main cause of graft loss.

Finally, we have shown that the benefits of M101 were preserved at lower doses and we determined that this protection was due to a multifunctionality of the molecule, combining oxygen transport, superoxyde dismutase activity and a large size (regulating oncotic pressure).

This work permitted the uncovering of new concepts towards improved organ preservation and quality for transplantation.

**Key words:** Kidney transplantation, ischemia reperfusion injury, hypothermia, oxygen carrier, porcine model, endothelials cells

## ABREVIATIONS

<b>2,3-DPG</b>	2,3-diphosphoglycérate
<b>ADH</b>	Antidiuretic hormone
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>AIF</b>	Apoptosis inducing factor
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance
<b>ANT</b>	Adenine nucleotide transporter
<b>Apaf-1</b>	Apoptosis activating factor 1
<b>Atg</b>	Autophagy-related gene
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Alpha smooth muscle actine
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>AVC</b>	Accident vasculaire cérébral
<b>AVP</b>	Accident de la voie publique
<b>BCA</b>	Acide Bicinchoninique
<b>BMPs</b>	Bone morphogenic proteins
<b>BSA</b>	Bovine serum albumine
<b>Ccr</b>	Clairance de la créatinine
<b>CD3</b>	Cluster of differentiation 3
<b>CD4</b>	Cluster of differentiation 4
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Ions chlorures
<b>CE</b>	Euro-Collins
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CoA</b>	Coenzyme A
<b>CRN</b>	Circulation Régionale Normothermique
<b>CS</b>	Cold Storage
<b>CT</b>	Threshold cycle
<b>CTGF</b>	Connective Tissue Growth Factor
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potentiel de membrane mitochondrial
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidine
<b>DAMPs</b>	Damage-associated molecular pattern molecules
<b>DDAC</b>	Donneurs décédés après arrêt cardiaque
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonate
<b>DHE</b>	Dihydroéthidium
<b>DISC</b>	Death-inducing signaling complex
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>dNTP</b>	Désoxynucléotides triphosphate
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>DV</b>	Donneur vivant
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EEG</b>	Electroencéphalogramme
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EORs</b>	Espèces oxygénées réactives
<b>EPO</b>	Erythropoïétine
<b>ERAD</b>	Endoplasmic reticulum-associated degradation
<b>FADD</b>	Fas-associated death domain
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavine adenine dinucleotide réduite

<b>FAK</b>	Focal adhesion kinase
<b>FeNa+</b>	Fraction d'excrétion du sodium
<b>FGF-2</b>	Fibroblast growth factor 2
<b>FIAT</b>	Fibrose interstitielle atrophie tubulaire
<b>Flt-1</b>	VEGF-Receptor 1
<b>FoxP3</b>	Forkhead box P3
<b>FSP-1</b>	Fibroblast specific protein-1
<b>GLUT-1</b>	Transporteur de glucose 1
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydase
<b>GTP</b>	Guanosine tri-phosphate
<b>HAEC</b>	Human aortic endothelial cell
<b>Hb</b>	Hémoglobine
<b>HBL</b>	Hexagonal Bilayer
<b>HBOC</b>	Hemoglobin based oxygen carrier
<b>HCl</b>	Acide hydrochlorique
<b>HES</b>	Hydroxyéthyl starch
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor
<b>HIF</b>	Hypoxia-inducible factor
<b>HLA</b>	Human Leucocyte Antigen
<b>HMGB1</b>	High mobility group box 1
<b>HO-1</b>	Heme oxygénase 1
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Péroxyde d'hydrogène
<b>HRE</b>	Hypoxia response element
<b>HRP</b>	Horse Radish Peroxidase
<b>HSPs</b>	Heat Shock proteins
<b>HTK</b>	Histidine tryptophane kétoglutarate
<b>HUVEC</b>	Human umbilical vein endothelial cells
<b>IbISA</b>	Infrastructures biologie santé et agronomie
<b>ICAM-1</b>	Intracellular adhesion molecule-1
<b>I<sub>f</sub></b>	Intensité de fluorescence
<b>IGF-2</b>	Insuline-like growth factors 2
<b>IGL-1</b>	Institut Georges Lopez 1
<b>IL</b>	Interleukin
<b>ILK</b>	Integrin-linked kinase
<b>INRA</b>	Institut national de la recherche agronomique
<b>IR</b>	Ischémie reperfusion
<b>K<sup>+</sup></b>	Potassium
<b>KO</b>	Knock out
<b>LAMP</b>	Lysosomal-associated membrane protein
<b>LDH</b>	Lactate déshydrogénase
<b>LDL</b>	Low density lipoproteins
<b>LDLR</b>	Low density lipoproteins receptor
<b>LLC-PK1</b>	Porcine proximal tubular epithelial cell line
<b>LSGS</b>	Low serum growth supplement
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemotactic protein-1
<b>ME</b>	Mort encéphalique
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MET</b>	Microscope électronique à transmission
<b>MMPs</b>	Métalloprotéinases
<b>MP</b>	Machine de perfusion
<b>mPTP</b>	Pore de transition de perméabilité mitochondrial

<b>mTOR</b>	<i>mamalian Target Of Rapamycin</i>
<b>MTT</b>	Sel de tétrazolium
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodium
<b>NADH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>NBT</b>	Nitroblue tetrazolium
<b>NFP</b>	Non function primaire
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anion superoxyde
<b>PAI-1</b>	Plasminogen activator inhibitor type-1
<b>PARP</b>	poly (ADP-ribose) polymerase-1
<b>PAS</b>	Periodic Acid Schiff
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>P<sub>CR</sub></b>	Concentration plasmatique de créatinine
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>PECAM-1</b>	Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 7
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>PFBO</b>	Perfluorooctylbromide
<b>PFC</b>	Perfluorocarbone
<b>PHD</b>	Prolylhydroxylases
<b>PI3K</b>	Phosphatidyl inositol-3-kinase
<b>pmh</b>	par million d'habitants
<b>PMN</b>	Polymorphonuclear neutrophils
<b>P<sub>Na</sub></b>	Concentration plasmatique du sodium
<b>pO<sub>2</sub></b>	Pression partielle en oxygène
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator-activated receptors
<b>PTM</b>	Pore de transition mitochondrial
<b>qPCR</b>	Quantitative polymerase chain reaction
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>RG</b>	Ringer lactate
<b>RIN</b>	RNA integrity number
<b>RIP</b>	receptor-interacting proteins
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>RRF</b>	Reprise retardée de fonction
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction
<b>SDS</b>	Sodium dodécyl sulfaté
<b>SEM</b>	Erreur standard à la moyenne
<b>SnoN</b>	Sloan- Kettering Institute proto-oncogene (Ski)-related novel gene, non-Alu containing
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>SVF</b>	Sérum de veau fœtal
<b>TCD</b>	Tube contourné distal
<b>TCP</b>	Tube contourné proximal
<b>TEM</b>	Transition épithélio-mésenchymateuse
<b>TGF-β</b>	Transforming growth factor β
<b>TK</b>	Tyrosine kinase
<b>TLM</b>	Two layer method
<b>Th1</b>	Lymphocytes T helper 1
<b>Th2</b>	Lymphocytes T helper 2
<b>TIMP</b>	Tissue inhibitor of metalloproteinase
<b>TLR</b>	Toll-like receptor

<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor alpha
<b>tPA</b>	Tissue-type plasminogen activator
<b>TRADD</b>	TNF receptor type 1-associated death domain protein
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis-inducing ligand
<b>T reg</b>	Lymphocytes T régulateurs
<b>UCR</b>	Concentration urinaire de la créatinine
<b>UNa</b>	Concentration urinaire du sodium
<b>UNOS</b>	United Network for Organ Sharing
<b>U-PA</b>	Urokinase-type plasminogen activator
<b>UPR</b>	Unfolded protein response
<b>dans</b>	Solution de l'Université du Wisconsin
<b>V</b>	débit urinaire
<b>VCAM-1</b>	Vascular cell adhesion molecule-1
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>vHL</b>	von Hinppel-Lindau
<b>XTT</b>	Sel de tétrazolium
<b>ZA</b>	<i>Zonula Adhaerens</i>
<b>ZO</b>	<i>Zonula occludens</i>

# SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	9
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	13
I. INTRODUCTION.....	18
II. GENERALITES.....	22
A. LA TRANSPLANTATION RENALE .....	23
1. Historique de la transplantation .....	23
2. Les différents types de donneurs .....	27
3. Activité de transplantation rénale en France .....	32
4. Devenir du greffon rénal après greffe.....	35
B. RAPPELS ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES RENALES .....	36
1. Structure et fonction du rein chez l’Homme.....	36
2. Fonction du néphron .....	39
3. Vascularisation rénale.....	43
III. PHYSIOPATHOLOGIE DE L’ISCHEMIE/ REPERFUSION. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	47
C. Définition générale .....	48
D. La phase d’ischémie .....	49
1. Déplétion énergétique et acidose intracellulaire.....	50
2. Altération ionique et désorganisation du cytosquelette .....	50
3. Dysfonctionnement mitochondriale.....	51
4. Les systèmes de défense antioxydants.....	54
E. La phase de reperfusion.....	56
1. Le stress oxydant .....	57
2. Initiation de la mort cellulaire.....	58
F. L’activation vasculaire, l’inflammation et la réponse immunitaire innée et adaptative .....	65
1. L’activation vasculaire.....	65
2. Les TLRs et les signaux Danger.....	66
3. La réponse immunitaire innée .....	67
4. La réponse immunitaire adaptative.....	70
G. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et la fibrose tubulo-interstitielle.....	73
1. La transition épithélio-mésenchymateuse ou dédifférenciation cellulaire .....	74
2. La fibrose tubulo-interstitielle .....	82
IV. OBJECTIFS .....	84

V. MATRIELS ET METHODES.....	87
A. METHODES RELATIVES A LA CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES ENDOTHELIALES .....	88
1. Modèles d'études .....	88
2. Isolement des cellules .....	88
3. Milieu de culture.....	89
4. Repiquage des cellules.....	89
5. Numération et détermination de la viabilité cellulaire .....	89
6. Congélation/décongélation .....	89
B. METHODES DE DOSAGES RELATIVES A L'ANALYSE CELLULAIRE.....	91
1. Tests métaboliques.....	91
2. Méthode d'évaluation cellulaire des ARNm par pCR quantitative en temps réel.....	96
3. Méthode d'évaluation cellulaire par microscopie électronique.....	103
4. Statistiques.....	104
C. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX D'AUTO TRANSPLANTATION DANS UN MODELE DE PORC LARGE WHITE .....	106
1. Modèle animal .....	106
2. Protocole d'anesthésie .....	106
3. Modèles chirurgicaux .....	107
4. Suivi post-greffe des animaux .....	109
5. Sacrifice des animaux .....	109
D. METHODES RELATIVES AU MODELE <i>IN VIVO</i> .....	110
1. Analyse des paramètres biochimiques fonctionnels .....	110
2. Analyse des paramètres histologiques .....	111
3. Evaluation des lésions histologiques du rein .....	112
4. Evaluation de la fibrose interstitielle .....	112
VI. PREMIERE PARTIE : LES TEMPERATURES .....	114
A. INTRODUCTION.....	115
1. Les effets délétères de la conservation hypothermique à 4°C .....	115
2. Nouvelles conservations envisagées.....	115
Ces données ouvrent des voies intéressantes pour faire évoluer les conditions de conservation. ....	118
B. RESULTAT: EVALUATION DES EFFETS DE DIFFERENTS DEGRES D'HYPOTHERMIE LORS DE L'ISCHEMIE REPERFUSION RENALE.....	119
1. Objectifs de l'étude.....	119
2. Protocoles utilisés .....	120
3. Résultats obtenus .....	120

4.	Conclusions.....	135
C.	DISCUSSION GENERALE .....	137
D.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	145
VII.	DEUXIEME PARTIE : TRANSPORTEURS D'OXYGENE.....	148
A.	INTRODUCTION.....	149
1.	La persufflation.....	149
2.	Les perfluorocarbures (PFC) .....	151
3.	Les transporteurs d'oxygène basés sur des hémoglobines (HBOC).....	153
4.	La solution Lifor .....	158
5.	La molécule Hemarina-M101 .....	159
B.	RESULTAT 1 : EVALUATION DE L'AJOUT D'UN NOUVEAU TRANSPORTEUR D'OXYGENE THERAPEUTIQUE SUR LA FIBROSE CHRONIQUE ET LA DYSFONCTION DE L'ORGANE LORS DE LA PRESERVATION STATIQUE RENALE.....	163
1.	Objectifs de l'étude.....	163
2.	Protocoles utilisés .....	164
3.	Résultats obtenus .....	164
4.	Conclusions.....	181
C.	RESULTATS 2 : EVALUATION DE L'EFFICACITE/ DOSE ET DU MECANISME DU TRANSPORTEUR D'OXYGENE M101 SUR LA PRESERVATION DES ORGANES.....	182
1.	Objectifs de l'étude.....	182
2.	Protocoles utilisés .....	183
3.	Résultats.....	183
4.	Conclusions.....	195
D.	DISCUSSION GENERALE .....	196
1.	Preuve de concept des bénéfices de M101 contre les lésions d'IR rénale.....	196
2.	Etude dose réponse et mécanistique des bénéfices de M101 contre les lésions d'ischémie reperfusion rénale.....	200
E.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	205
	BIBLIOGRAPHIE.....	207
	VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE.....	225
	ANNEXE.....	227

# LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

## LISTE INDEXEE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Représentation des changements physiopathologique associés à la mort encéphalique.....	30
<b>Figure 2:</b> Histogramme de survie des greffons rénaux suivant la période de greffe. ....	34
<b>Figure 3:</b> Schéma représentant une coupe sagittale de rein d'Homme .....	37
<b>Figure 4:</b> Anatomie du rein et du néphron d'Homme. Schéma d'une coupe sagittale de rein, d'un néphron, d'un glomérule et le mésangium.....	38
<b>Figure 5 :</b> Mouvements de sécrétion et de réabsorption de substances urinaires à partir d'un néphron chez les vertébrés. ....	42
<b>Figure 6 :</b> Pression partielle d'O <sub>2</sub> selon les régions du parenchyme rénal. ....	45
<b>Figure 7:</b> Schéma des changements moléculaires et biochimiques induits par l'IR rénale .....	49
<b>Figure 8 :</b> Etapes principales de production d'ATP à partir d'un sucre simple (glucose) en conditions anaérobies.....	52
<b>Figure 9 :</b> Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	53
<b>Figure 10 :</b> Extension des lésions d'ischémie lors de la reperfusion et ses conséquences. ....	56
<b>Figure 11 :</b> Schéma de la production d'EOR, au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale. ....	57
<b>Figure 12 :</b> Mécanismes de mort cellulaire induits lors de l'IR.....	59
<b>Figure 13 :</b> Voies d'activation «extrinsèque» et «intrinsèque» des caspases au cours de l'apoptose. ..	61
<b>Figure 14 :</b> Schéma représentant l'activation et l'inhibition de l'autophagosome lors de l'autophagie	62
<b>Figure 15 :</b> Représentation schématique des étapes de recrutement, d'adhésion et de diapédèse des leucocytes au niveau de l'endothélium vasculaire. ....	69
<b>Figure 16 :</b> Schéma représentant les principales étapes de la TEM.....	74
<b>Figure 17 :</b> Voies de signalisation principales impliquées dans la TEM.....	78
<b>Figure 18 :</b> Contrôle de l'activité des MMPs tissulaires effectif sur trois niveaux.....	81
<b>Figure 19:</b> Représentation schématique des différentes phases d'une PCR et du principe de la technique de détection utilisant le SYBR green.....	100
<b>Figure 20 :</b> Représentation graphique de la PCR en temps réel .....	101

<b>Figure 21</b> : Photos représentant: le lavage du rein par l'artère rénale après son prélèvement et avant sa conservation, et la greffe rénale. ....	108
<b>Figure 22</b> : Marquage de la fibrose tubulo-interstitielle par coloration au Rouge Sirius de reins de porc ayant subis ou non une ischémie. ....	113
<b>Figure 23</b> : Analyses métaboliques des cellules endothéliales microvasculaires rénales conservées à différentes températures. ....	123
<b>Figure 24</b> : Observation morphologique par microscopie électronique des cellules endothéliales microvasculaires rénales porcines conservées en hypoxie pendant 24h en UW dans différentes températures puis reperfusées durant 24h. ....	126
<b>Figure 25</b> : Evaluation du stress oxydant et des voies de l'hypoxie dans les cellules microvasculaires conservées dans l'UW à différentes températures par test DHE, dosage du NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , et RT-qPCR. ....	129
<b>Figure 26</b> : Evaluation de l'inflammation induite par les différentes températures de conservation dans des cellules endothéliales rénales suite à une hypoxie de 24h en dans à différentes températures et une réoxygénation de 2h en sang de porc à 37°C par RT-qPCR et comptage des leucocytes adhérentes. ....	132
<b>Figure 27</b> : Marquage à l'acide périodique de Schiff (PAS) représentatif après 1h, 6h ou 24h de conservation de reins de porc en dans à 4°C, 19°C ou 32°C. ....	134
<b>Figure 28</b> : Organisation fonctionnelle des composants de la chaîne respiratoire. ....	138
<b>Figure 29</b> : Structure et conformation de l'hémoglobine extracellulaire M101 d' <i>Arenicola marina</i> . ....	161
<b>Figure 30</b> : Courbes des spectres de M101, ajoutée à la solution UW à une concentration de 1g/L, au cours du temps. ....	165
<b>Figure 31</b> : Evaluation de l'activité SOD de M101 par des tests d'inhibition de la formation de NBT. ....	166
<b>Figure 32</b> : Evaluation des dommages cellulaires suite à une conservation des cellules LLC-PK1 à 4°C pendant 48h en UW. ....	168
<b>Figure 33</b> : Analyses métaboliques des cellules LLC-PK1 suite à une conservation à 4°C pendant 24h dans la solution UW contenant des concentrations croissantes de M101 allant de 0 à 10g/L. ....	169
<b>Figure 34</b> : Evaluation des dommages cellulaires suite à une conservation des cellules LLC-PK1 à 4°C pendant sept jours en UW contenant des doses croissantes de M101 allant de 0 à 10g/L. ....	170
<b>Figure 35</b> : Analyses métaboliques des cellules LLC-PK1 conservées à 4°C dans différentes solutions de conservation. ....	172
<b>Figure 36</b> : Evaluation de la fonction rénale après transplantation des reins conservés en UW (A-C-E) ou HTK ± M101. ....	175
<b>Figure 37</b> : Marquage à l'acide périodique de Schiff représentatif de biopsies de reins à D1, D14 et M1 après transplantation pour les groupes UW, UW+M101, HTK, HTK+M101. ....	178

<b>Figure 38</b> : Marquage rouge sirius représentatif pour les groupes UW , UW+M101, HTK et HTK+M101 à M3 posttransplantation. Quantification du développement de la fibrose, de la créatininémie et de la protéinurie dans chaque groupe. ....	180
<b>Figure 39</b> : Analyses métaboliques des cellules HAEC suite à une hypoxie/hypothermie de 24h dans la solution UW contenant des concentrations croissantes de M101. ....	185
<b>Figure 40</b> : Observation morphologique par microscopie électronique des HAEC conservées en hypoxie/hypothermie pendant 24h en UW contenant des doses croissantes de M101.....	187
<b>Figure 41</b> : Analyses métaboliques des cellules HAEC suite à une hypoxie/hypothermie de 24h en solution UW contenant des doses croissantes de la molécule M101 native ou de l'une des deux molécules modifiées (CyanMet ou DodecaM) suivie par 24h de réoxygénation dans un milieu et des conditions de culture régulières. ....	189
<b>Figure 42</b> : Mesure séquentielle de la créatinine sérique après transplantation.....	193
<b>Figure 43</b> : Marquage au rouge sirius des tissus UW, UW+2g/L, UW+1g/L, UW+5g/L et quantification du développement de la fibrose dans chaque groupe. ....	194

## LISTE INDEXEE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Séquence des différentes amorces utilisées lors de l'évaluation tissulaire des ARNm par RT-qPCR.....	103
<b>Tableau 2</b> : Evaluation des lésions histologiques des reins après conservation <i>ex vivo</i> à 4°C, 19°C ou 32°C. ....	135
<b>Tableau 3</b> : Evaluation de la stabilité de M101 dans différentes solutions commerciales de conservation de greffons .....	167
<b>Tableau 4</b> : Evaluation histologique des greffons rénaux.....	177

# I. INTRODUCTION

En France, chaque année environ 7000 nouveaux malades parviennent au stade terminal d'une insuffisance rénale chronique. Ce nombre augmente d'environ 6 % tous les ans. Le vieillissement de la population et la réduction néphronique qui en résulte, ainsi que la prévalence élevée de l'hypertension artérielle, des maladies vasculaires et du diabète, favorisent la progression des maladies rénales. L'insuffisance rénale est donc un problème de santé publique majeur.

La transplantation est la thérapie de choix dans l'insuffisance rénale terminale. Elle a un intérêt unanimement reconnu dans l'amélioration de la qualité et la durée de vie des patients transplantés, et elle représente aussi une économie de coût non négligeable en termes de santé publique. En effet, à partir de la seconde année post-transplantation, le coût de prise en charge d'un patient transplanté est d'environ 20 000€, ce qui représente une économie de 60 000€ par an par rapport à un patient en hémodialyse. La greffe rénale représente 61% de l'activité totale de greffe. Les besoins en greffe ne cessent d'augmenter. D'année en année, les besoins progressent en effet avec l'élargissement des indications médicales de la greffe et le vieillissement de la population. La transplantation de rein est quantitativement la plus importante. Cependant, elle reste la plus marquée par la pénurie de greffon, la demande de greffe étant largement supérieure à l'offre d'organes. Le nombre de malades en attente d'une greffe rénale s'élève à 12320 en 2011, soit une augmentation de 10,5% par rapport à 2010 (rapport annuel et scientifique de l'Agence de Biomédecine 2011). Tandis que le nombre de greffes, réalisées par an, stagne et n'atteint que 2976 actes en 2010, aboutissant à un indice de pénurie de 4,1 (indice de pénurie défini par le nombre total d'inscriptions sur la liste d'attente pour une année, rapporté au nombre total de greffes réalisées pendant cette même année).

Face à la pénurie, les critères de prélevabilité des organes ont été élargis à des donneurs considérés comme « limites » car ils présentent l'une des caractéristiques suivantes: en état hémodynamique instable, âgés ou présentant des facteurs de comorbidité non négligeables. Du fait de l'état de santé du donneur, ces organes dits « marginaux » ont une qualité inférieure à celles des reins « optimaux », venant de donneurs en meilleure santé, et sont plus sensibles aux lésions subies lors de la période d'ischémie/reperfusion (IR).

L'ischémie est définie comme l'arrêt de l'apport sanguin au tissu ou à l'organe. Cette interruption des connections vasculaires induit un arrêt des apports en nutriments et une chute de la pression partielle en oxygène dans les zones ischémiées qui va résulter en un déséquilibre sévère entre l'apport et la demande métabolique provoquant une altération du métabolisme cellulaire (appelé « lésions

d'ischémie »). La reperfusion est la restauration de l'apport sanguin (de la perfusion et de la réoxygénation concomitante) au tissu ou à l'organe qui va engendrer une potentialisation des lésions tissulaires, initiés lors de l'ischémie, et une réponse inflammatoire profonde (appelé « lésions de reperfusion »). Ces lésions d'IR, caractérisées par les reprises différées de fonction et les dysfonctions primaires, favorisent les rejets aigus et participent au développement des lésions chroniques [1]. Ces lésions d'IR sont dépendantes de l'état initial du greffon, des moyens et de la durée de conservation ainsi que des facteurs de risque et de comorbidités du receveur qui peuvent contribuer au développement des lésions du greffon aboutissant progressivement à la néphropathie chronique.

Actuellement, la majorité des centres de transplantation conservent les greffons avec la solution de préservation UW (University of Wisconsin, Viaspan®) en hypoxie à 4°C afin de protéger les cellules et les tissus des lésions d'IR. Toutefois, cette méthode de préservation hypothermique, basée sur le principe d'inhibition métabolique par le froid, est aujourd'hui remise en question. De plus, même si le métabolisme est ralenti, la cellule a encore besoin d'oxygène, faisant de l'hypoxie un des principaux obstacles à surmonter en vue d'améliorer la qualité des organes. En effet, il a été démontré que le syndrome d'IR conduit à la dégradation de l'intégrité cellulaire [2, 3], à l'acidose, à la perte d'ATP [4], à la réaction inflammatoire [5], à l'apoptose liée à la perméabilisation de la membrane mitochondriale [6] et à la génération d'espèces radicalaires oxygénées (EOR) qui vont directement endommager les tissus [7]. Ces constatations amènent à se poser la question de la pertinence des moyens de conservation hypothermique et hypoxique actuels lors de la conservation d'organes « marginaux ».

Afin d'améliorer la fonction et la survie des greffons rénaux, le but de ce travail a été d'identifier de nouvelles conditions de préservation des greffons, afin de limiter les lésions d'IR. D'ailleurs, l'expertise collective sur la transplantation d'organe conduite par l'INSERM en 2009 a placé l'IR comme une entité à part entière la recherche biomédicale en transplantation et à accordé une haute priorité aux programmes de recherche portant sur l'approche physiopathologique [8]. La première partie de ce travail a eu pour objectif d'explorer la possibilité d'une température de conservation plus adéquate dans un modèle *in vitro* de cellules endothéliales microvasculaires de porc, les premières cibles des lésions d'IR. La deuxième partie a eu pour objectif d'évaluer, dans un modèle d'autotransplantation rénale chez le porc, les effets d'un nouveau transporteur d'oxygène, une hémoglobine extracellulaire de ver marin (M101), en tant qu'additif aux solutions de conservation ainsi que de caractériser le mécanisme à l'origine de son efficacité.

Ce mémoire aborde dans une première partie les aspects généraux de la transplantation rénale et les différents aspects physiopathologiques de l'IR. Puis, les résultats obtenus ont été décrits et discutés, dans le but d'apporter des éléments de réponse aux équipes de transplantation concernant de nouvelles perspectives de préservation des organes à transplanter. Enfin, les techniques qui ont permis l'analyse métabolique, transcriptomique et microscopique des cellules ainsi que l'analyse fonctionnelle et histologique des tissus ont ensuite été détaillées.

## II. GENERALITES

# A. LA TRANSPLANTATION RENALE

## 1. Historique de la transplantation

Dès le III<sup>e</sup> siècle, on peut trouver des fresques représentant les premières scènes de greffes, principalement de membres, comme celle représentant Saint Côme et Saint Damien greffant la jambe d'un éthiopien récemment décédé à un homme qu'ils venaient d'amputer. Cependant ces pratiques semblent rester anecdotiques jusqu'à la fin du second millénaire.

Des efforts plus concrets ont lieu dès le XIX<sup>ème</sup> siècle, avec les tentatives de greffe de tissus comme la peau, de dents, et les greffes de petits organes tels que les testicules en sous cutané. Cependant ces pratiques restent en marges de la norme et il faut attendre le XX<sup>ème</sup> siècle pour que la transplantation d'organe connaisse son essor et notamment la greffe rénale qui sera rapidement retenue comme organe de prédilection de par sa dualité, permettant à un donneur de survivre grâce à son rein restant, et du calibre important de ses vaisseaux propice aux anastomoses. Ces tentatives de greffe rénale ont d'abord été réalisées de l'animal vers l'animal, puis de l'animal vers l'homme et enfin de l'Homme vers l'Homme.

### 1.1. Les premiers pas de la greffe

En 1890, Locke puis Ringer découvrent les milieux nutritifs pour perfuser et conserver l'organe isolé. Mais les premières expériences de transplantation n'auraient pu voir le jour sans le développement préalable de l'anastomose vasculaire. Dès la fin du XIX<sup>ème</sup> et le début du XX<sup>ème</sup> siècle, des chirurgiens, principalement européens et français, parmi lesquels M. Jaboulay et A. Carrel, ont réalisé les premières anastomoses vasculaires [9]. En 1902, le Dr Ulmann rapporte la première transplantation d'un rein de chien au niveau du cou avec l'émission d'une infime quantité d'urine au niveau de l'uretère abouché à la peau. En 1902 également, le Dr Carrel rapportait ses essais de greffe rénale chez le chien. Peu après, il émigra aux Etats-Unis où il raffina l'approche chirurgicale des anastomoses vasculaires et pratiqua des autogreffes (autologues) et des allogreffes de différents types d'organes, toujours chez l'animal. Simultanément, il élaborait une véritable méthodologie de transplantation expérimentale par comparaison histologique et fonctionnelle entre l'organe greffé et le

non greffé. Il proclama l'intérêt d'une conservation hypothermique de l'organe prélevé (les prémices de la conservation). Ces expériences permirent au Dr Carrel de réaliser que des autogreffes et des allogreffes de rein ne se comportaient pas de la même façon et que l'échec des allogreffes ne pouvaient pas s'expliquer que par des problèmes techniques [9]. En 1903, le Russe Y. Voronoy parvient lui aussi à une conclusion majeure: le rejet est un événement immunologique. Il décide alors de tenter la première homotransplantation rénale à partir d'un rein de cadavre sur une jeune femme atteinte d'insuffisance rénale. L'échec est immédiat mais un nouveau pas a été accompli. En 1906, M. Jaloubay greffe un rein de porc puis un rein de chèvre au pli du coude de deux femmes atteintes d'insuffisance rénale. Dans les deux cas, les malades décèdent peu après.

Après la seconde guerre mondiale, un regain d'intérêt pour la transplantation et la biologie sous-jacente donne un nouvel essor à la transplantation. En 1951, huit transplantations rénales furent pratiquées par trois équipes parisiennes (dirigées respectivement par C. Dubost, R. Küss et M. Servelle) au départ de donneurs condamnés à mort ou de malades nephrectomisés. Tous les receveurs décédèrent. Ce sont ces mêmes équipes qui mirent au point, la même année, une technique chirurgicale permettant de placer le greffon dans la fosse iliaque. Cette méthode a ensuite été universellement adoptée et est toujours utilisée à l'heure actuelle. La technique chirurgicale progresse, la survie s'améliore et atteint parfois plusieurs mois. La première transplantation rénale à partir d'un donneur vivant (de la mère vers le fils) a lieu en 1952 sur le jeune M. Renard par J. Hamburger, L. Michon, N. Economos et J. Vaysse à l'Hôpital Necker à Paris. L'opération est un succès, le rein fonctionne immédiatement. Mais au bout de 21 jours, le greffon cessera progressivement de fonctionner, pour aboutir à un rejet sans appel et à la mort du jeune garçon.

## 1.2. L'apparition de l'immunosuppression

En 1952, J. Dausset publie ses premiers résultats sur le système HLA (Human Leucocyte Antigen). Dès lors, pour que la greffe réussisse et que le système immunitaire du receveur ne rejette pas l'organe du donneur, deux solutions sont possibles : soit les systèmes HLA du donneur et du receveur sont les plus proches possibles, comme c'est le cas pour les vrais jumeaux; soit il faut affaiblir le système immunitaire du receveur pour empêcher le rejet de se produire. En 1954, à Boston, l'équipe des Dr Murray, Merrill et Harrison réalise la première greffe rénale entre deux vrais jumeaux [10]. Le donneur et le receveur étant génétiquement semblable, le problème du rejet ne se pose pas. Il s'agit de la première transplantation rénale « réussie », c'est-à-dire qui fonctionne pendant plus de six mois. En 1956 à Boston puis à Paris, sont effectuées des greffes entre faux jumeaux avec irradiation et

utilisation de corticoïdes. On perçoit bien que l'on ne peut en rester à la greffe entre jumeaux et que l'obstacle de l'incompatibilité biologique doit être franchi. L'immunosuppression apparaît, elle est induite par irradiation totale, utilisation de 6-mercaptopurine (6-MP), corticoïdes, azathioprine ou encore méthotrexate. En 1959, le Pr Hamburger à Paris [11] et le Dr Merrill à Boston réussissent les premières greffes rénales entre faux jumeaux. Les receveurs sont soumis à des séances d'irradiation totale, pour supprimer temporairement la fonction immunitaire de la moelle osseuse, et à un traitement médicamenteux anti-rejet à base de corticoïdes. En 1960, R. Kuss et M. Legrain réalisent les 3 premières greffes hors gémellarité. Deux des patients greffés survivront 18 mois.

En 1962, l'Américain D. Hume réalise la première greffe avec immunosuppression à partir d'un rein de donneur décédé. Le patient survit pendant 21 mois, grâce à un nouveau médicament immunosuppresseur, l'azathioprine, utilisé en association avec les corticoïdes. Malgré l'efficacité limitée et les lourds effets secondaires des traitements immunosuppresseurs de l'époque, les greffes rénales entre personnes non apparentées se multiplient. Un facteur va favoriser ce mouvement : l'apparition de la technique de dialyse rénale, qui offre une solution de secours en cas d'échec. Après de nombreuses années de persévérance et grâce à la multidisciplinarité, la transplantation devient un traitement standard à partir de 1970. Le biologiste suisse JF. Borel découvre, en 1972, les propriétés immunosuppressives de la ciclosporine, un antibiotique. Utilisée à partir de 1982 cette molécule va transformer radicalement les perspectives des greffes et la durée de vie des greffons.

### 1.3. La mort cérébrale

En 1959, l'école neurologique parisienne et notamment celle de Mollaret décrivent le « coma dépassé » qui survient lors des réanimations, le terme de mort cérébrale naît. Les intellectuels admettent alors que l'homme est plus dans son cerveau que dans son cœur et que l'on est mort alors que tout le corps est "vivant" mais que le cerveau ne fonctionne plus. L'état de mort cérébrale ouvre alors le vaste champ du prélèvement à cœur battant et l'idée du don d'organes apparaît [12]. La mort cérébrale ou mort encéphalique est définie comme une destruction irréversible de l'ensemble des fonctions cérébrales de l'encéphale. Il s'agit d'un processus de nécrose ischémique dû à un arrêt circulatoire cérébrale, malgré la persistance d'une activité cardiaque.

En France, le diagnostic de mort encéphalique fait l'objet d'une réglementation précise (décret du 2 décembre 1996). L'examen clinique est essentiel, il doit établir la présence simultanée de trois signes cliniques [13, 14]:

– absence totale de conscience et d'activité motrice spontanée ;

- abolition de tous les réflexes du tronc cérébral ;
- absence totale de ventilation spontanée vérifiée par une épreuve d'hypercapnie.

Le caractère irréversible de la destruction encéphalique est attestée par:

- soit deux électroencéphalogrammes (EEG) nuls et aréactifs effectués à un intervalle minimal de quatre heures sur une durée d'enregistrement de trente minutes;
- soit une angiographie objectivant l'arrêt de la circulation encéphalique.

#### 1.4. La conservation des organes

L'hypothermie constitue le principe de base de la conservation des organes [15, 16]. Basé sur la loi de Van't Hoff, elle permet de diminuer le métabolisme de l'organe ainsi que de ralentir les réactions biochimiques et enzymatiques [6].

Outre le principe de l'hypothermie, les travaux de Collins puis de Belzer ont permis de développer des solutés de conservation pour les organes prélevés afin de conserver les greffons de façon optimale, entre leur prélèvement et leur revascularisation [17-19]. L'équipe de Pegg obtient d'abord des résultats encourageants chez le chien, les greffons rénaux étant préservés dans du sang ou du sérum à froid [20].

Pour les premières transplantations rénales à partir de donneurs vivants réalisées dans les années 1950, les reins étaient refroidis par contact et parfois lavés avec du Ringer [21]. Puis apparaissent de véritables solutions formulées pour la préservation statique d'organe. Elles constituent un vecteur pour le froid et apportent des substances capables de lutter contre les mécanismes biologiques naturels de dégradation afin de maintenir les greffons *ex vivo* en bon état de fonctionnement jusqu'à leur transplantation.

Badet et al. rapportent dans une revue portant sur l'utilisation des liquides de conservation en transplantation rénale paru en 2006 que : « Dans les années 70, alors que se développe le prélèvement sur des donneurs en état de mort encéphalique, l'augmentation des temps d'ischémie pousse un certain nombre de centres à s'intéresser aux liquides de conservation. C'est dans ces circonstances que Collins met au point un nouveau liquide de conservation de type « intracellulaire » (concentration très élevée en potassium, électrolyte physiologiquement intracellulaire, et une faible teneur en sodium)[19] qui sera secondairement modifié dans le réseau Eurotransplant pour devenir l'Eurocollins (suppression du magnésium qui précipitait durant le stockage et addition de glucose).

A la fin des années 80, Belzer et son équipe développent une nouvelle solution (Solution de l'Université du Wisconsin ou UW) qui essaye de répondre de manière rationnelle au cahier des charges

connu à l'époque en matière de conservation d'organes et tente d'améliorer les résultats obtenus avec Eurocollins qui restent très inégaux pour le rein et particulièrement mauvais avec le foie et le pancréas. Les conditions nécessaires à la survie des cellules se précisent et le métabolisme spécifique de chaque organe est considéré. L'utilisation de cette solution va marquer un tournant dans le concept de liquide de conservation. Son utilisation en pratique clinique va véritablement donner un nouvel élan à la greffe d'organe solide [22, 23] car il permet non seulement d'augmenter les temps d'ischémie de façon considérable mais également d'améliorer très significativement les résultats immédiats de la greffe pour le rein [24], le foie [25, 26] et le pancréas [23]. A partir de ce moment, l'UW devient la solution de conservation de référence et plusieurs études en transplantation rénale et hépatique comparant l'UW à l'Eurocollins renforcent cette tendance [27-29].

A la fin des années 90, alors que la position de l'UW en pratique clinique se renforce, la recherche permet de montrer que les solutions intracellulaires riches en potassium présentent un certain nombre d'inconvénients et que l'UW est probablement perfectible. Des arguments expérimentaux indiscutables permettent en effet aujourd'hui de considérer qu'un UW de composition extracellulaire (inversion des concentrations de  $K^+$  et de  $Na^+$ ) donne dans des modèles expérimentaux de référence des résultats meilleurs que la solution intracellulaire originale [30].» [21].

Plus récemment, des solutions de conservation de nouvelle génération sont arrivées sur le marché telles que le Celsior® ou l'Histidine Tryptophane Kéto-glutarate (HTK ou Custodiol®) définies par une concentration en potassium relativement basse; ou les solutions IGL-1 (Société IGL : Institut Georges Lopez) et SCOT (Macopharma) contenant un agent colloïde tel que le Polyéthylène Glycol (PEG).

Malgré les résultats probants des nouvelles solutions de conservation dans des modèles expérimentaux, de nombreuses équipes hésitent encore à les utiliser lors des greffes, l'UW étant encore considéré comme la solution de référence.

## **2. Les différents types de donneurs**

### **2.1. Les donneurs vivants**

Historiquement, les premières greffes rénales avec donneurs vivants (DV) ont été réalisées à Paris il y a plus de 50 ans. Les greffes à partir de DV se sont alors développées de façon très différente en fonction des pays, selon les choix politiques et culturels ainsi que du degré de pénurie d'organes.

En France, malgré une augmentation de 26,9% par rapport à 2009, la greffe à partir de donneurs vivants reste peu appliquée et ne représente que 9,8% de l'ensemble des greffes rénales réalisées en 2010 [31]. Tandis qu'au Japon, dans les pays du nord de l'Europe, les Etats-Unis ou le Canada, ce type de don représentait de 90 à 42% des greffes en 2011 d'après le rapport UNOS (United Network for Organ Sharing).

En France, le prélèvement sur DV en vue d'une greffe est autorisé depuis la loi Caillavet de 1976. Actuellement, le principal élément du dispositif législatif et réglementaire concernant le prélèvement d'organe sur DV est la loi de bioéthique du 7 juillet 2011 qui a étendu le cercle des donneurs vivants, jusque-là restreint par la loi de bioéthique du 6 août 2004 à la famille proche (parents, époux, frères et sœurs, enfants, ainsi que toute personne apportant la preuve d'une vie commune d'au moins deux ans avec le receveur, les grands parents, oncles, tantes et cousins), à toute personne pouvant apporter la preuve d'un lien affectif étroit et stable avec le receveur. Elle a également introduit le don croisé d'organes entre personnes vivantes dans la législation française. Le don croisé d'organes consiste pour le receveur potentiel, d'un couple «donneur/receveur» A, à bénéficier du don d'une autre personne, d'un couple «donneur/receveur» B, ayant exprimé l'intention de don et également placée dans une situation d'incompatibilité à l'égard de la personne dans l'intérêt de laquelle le prélèvement peut être opéré, tandis que cette dernière bénéficie du don du premier donneur. Lors de la mise en œuvre du don croisé, les actes de prélèvement et de greffe sont engagés de façon simultanée respectivement sur les deux donneurs et sur les deux receveurs.

La protection du donneur a été renforcée par la loi de 2004 pour garantir son consentement libre et éclairé, le donneur potentiel étant auditionné par un comité d'experts qui donne, *in fine*, l'autorisation de prélèvement.

Néanmoins, la question éthique de la greffe réalisée avec un rein prélevé sur un DV trouble toujours la communauté néphrologique française. En effet, le recours à un DV est un acte agressif délibéré sur un sujet en bonne santé, notion qui contrevient à la règle médicale du « *primum non nocere* ». De plus, la greffe à partir d'un DV entraîne une charge de travail supplémentaire des équipes hospitalières qui ont du mal à mobiliser les ressources nécessaires à la double prise en charge médicale du donneur et du receveur, ainsi qu'au suivi et à la coordination de la procédure d'autorisation de don. Elle conduit également à des difficultés de gestion et des retards de remboursement des frais entre les Etablissements et les Caisses d'assurance maladie.

## 2.2. Les donneurs décédés en état de mort encéphalique

En 2010, les causes de passage en mort encéphalique (ME) sont principalement le fait d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) pour 57 %, de traumatismes pour 25 % dont 12 % d'accidents de la voie publique (AVP)[31], et dans une moindre mesure de comas anoxiques.

En France, le nombre de sujets en état de ME recensés par l'Agence de la biomédecine est de 3 049 pour l'année 2010, soit 47,1 donneurs recensés par million d'habitants (pmh). Il représente 9 à 13 % des patients décédés en réanimation toutes pathologies confondues [32]. Cette extrapolation a été faite en excluant les décès de cause considérée comme une contre-indication absolue ou relative au prélèvement, et en incluant ceux par accident vasculaire cérébral (AVC), traumatisme de la tête et du cou, anoxie ou arrêt circulatoire. Sur 47,1 donneurs en ME recensés pmh, 22,8 donneurs pmh sont prélevés. La moyenne d'âge des donneurs prélevés se situe à 53,6 ans en 2011 [33].

Les causes de non-prélèvement sont multiples, mais l'opposition de l'entourage du défunt ou celle du défunt lui-même en est la principale (33,7 %) en 2010.

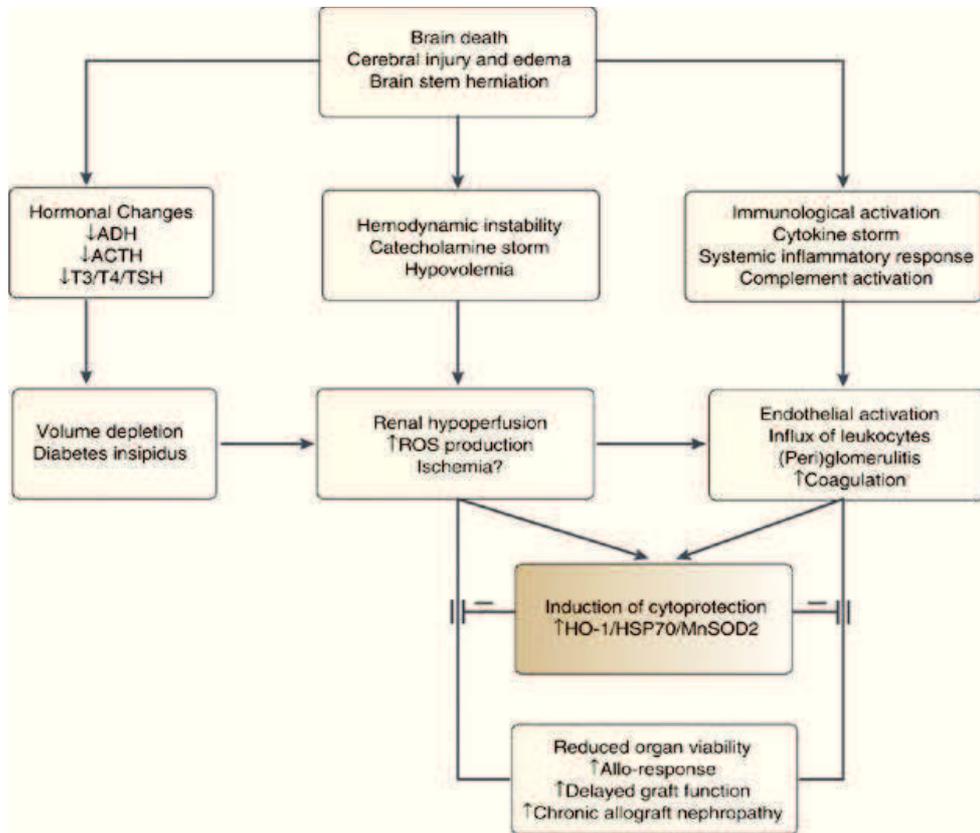
Ces donneurs sont des sujets à cœur battant dont les autres organes restent au moins un temps fonctionnels sous réserve d'une réanimation adéquate, permettant leur éventuel prélèvement en vue de greffe.

Cependant, ces organes sont directement touchés par l'arrêt des interactions avec l'encéphale ; et la vitesse de progression vers la mort cérébrale influe sur l'importance des conséquences physiopathologiques de celle-ci. Au cours de la ME on observe notamment une instabilité hémodynamique conduisant à un orage cathécholaminergique, un désordre électrolytique entraînant un diabète insipide ainsi que des anomalies de la coagulation (Figure 1).

On note également l'importance du rôle joué par la ME dans la genèse d'un véritable processus inflammatoire. Un traumatisme cérébrale conduit à la production d'un très grand nombre de cytokines (Interleukine-1(IL-1), -1 bêta (IL-1 $\beta$ ), -6 (IL-6), -8 (IL-8), -10 (IL-10), -12 (IL-12), Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ )) et de protéines connues pour leur rôle dans l'adhésion et l'activation des cellules inflammatoires (E-selectine, Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), néoptérine,  $\beta$ 2-microglobuline, IL-2 receptor-fragment). Différentes cellules inflammatoires (macrophages, cellules Natural killer (NK), lymphocytes T helper (Th)) peuvent également infiltrer différents tissus au décours de la ME [34].

Ces conséquences peuvent avoir un retentissement important sur le fonctionnement de ces organes en entraînant potentiellement une hypoperfusion tissulaire et une augmentation de la production d'EOR.

Cependant, certains mécanismes de protection sont induits tel que l'augmentation de l'expression des gènes cytoprotecteurs que sont l'hème oxygénase-1 (HO-1), la protéine de choc thermique 70 ou heat shock protéine 70 (HSP70) et la superoxyde dismutase mitochondriale manganèse-dépendante (Mn-SOD) dans le but de préserver la viabilité des organes [35-37].



**Figure 1:** Représentation des changements physiopathologique associés à la mort encéphalique [35].

Chaque année en France, les greffes réalisées à partir de donneurs décédés en état de ME représentent environ 90 à 95% de l'ensemble des greffes rénales [31]. Les greffons provenant de ces donneurs sont soumis à une période d'ischémie froide comprise entre 18 et 20 heures, qui correspond au temps de conservation statique *ex vivo* de l'organe dans une solution de conservation à 4°C, avant d'être transplantés à un receveur compatible.

### 2.3. Les donneurs décédés après arrêt cardiaque

Historiquement, les prélèvements de reins ont débuté avec les donneurs décédés après arrêt cardiaque (DDAC) ont été abandonnés après les années 1970 au bénéfice des donneurs en état de mort encéphalique. En effet, la plus grande facilité de prélèvement sur ces derniers en termes de plan organisationnel, de plus grande marge de temps et de meilleure qualité des résultats concernant la survie de greffons et des receveurs avaient amené les équipes de transplantation françaises à abandonner totalement les prélèvements d'organes sur DDAC vers 1985. En effet, la technique de prélèvement d'organes sur des sujets à « cœur arrêté » consiste à préserver *in situ* les organes au décours de l'arrêt cardiaque le plus rapidement possible, l'hypoperfusion découlant de cet arrêt majorant les lésions d'IR, un timing qui est moins contraignant dans le cas des donneurs en ME pour lesquelles les organes restent perfusés et oxygénés.

Récemment, pour faire face à la carence de greffons, certains pays ont développé ce type de programme avec des résultats en matière de greffes au moins équivalents à ceux obtenus à partir de greffons provenant de donneurs en état de ME. Suite à ces résultats et après une recommandation émise dès juin 2004 par le comité d'éthique de l'Etablissement français des Greffes, la France a ouvert son programme de prélèvements sur DDAC en octobre 2006 suite au décret du 2 août 2005.

Dans un premier temps, l'activité de prélèvement sur DDAC n'a concerné que le rein et 9 sites hospitaliers volontaires en ont testées la faisabilité selon un protocole strictement encadré. Depuis, cinq nouveaux centres pilotes ont signé la convention, ce qui porte à 14 le nombre de centres Français autorisés à réaliser ce genre de protocole. Malheureusement, le programme de prélèvement sur DDAC n'a pas progressé en 2011, notamment concernant la greffe rénale : 58 donneurs soit 0,9 pmh (contre 62 donneurs en 2010) ont fait l'objet d'un prélèvement d'organes ayant abouti à 65 greffes de rein (79 en 2010), soit 2,2% de l'activité totale de greffe de reins [31, 38].

Les contraintes pour ces organes sont en effets plus importantes, car ils subissent tout d'abord une période d'ischémie chaude *in vivo* qui ne doit pas excéder 150 minutes et qui comprend : i) une période de no flow (30 minutes maximum), correspondant au temps entre l'effondrement et la mise en œuvre d'une réanimation cardio-pulmonaire spécialisée; ii) une période de low flow (120 minutes maximum), correspondant à la mise en place d'un système de réanimation efficace pour le patient. S'ajoute ensuite une période de préservation *in situ* des organes abdominaux (d'une durée maximum de 180 minutes lors de l'utilisation d'une sonde de Gillot pour préservation hypothermique ou 240 minutes avec une CRN (circulation régionale normothermique) qui utilise le sang du patient), suivi par la conservation de l'organe *ex vivo* à 4°C dans une solution de conservation pendant une durée maximum de 18h. Ces organes plus « fragiles » ne peuvent être conservés selon la méthode de

conservation statique traditionnelle et nécessitent une perfusion hypothermique continue ou pulsatile grâce à des systèmes de perfusion ou machines de perfusion (MP). Les MP permettent d'améliorer les conditions de transport et le soin apporté à ce type d'organes dits « limites », ainsi qu'aux organes provenant des donneurs en état de ME [39]. Ce sont des systèmes fournissant une pression et une température contrôlables combinées à une perfusion continue ou pulsatile, nécessitant l'utilisation de solutions de conservation appropriées. Ces MP permettent d'apporter directement les substrats et l'oxygène aux cellules ainsi que d'éliminer les éventuels déchets toxiques des capillaires sanguins du greffon par lavage de ceux-ci.

En conclusion, le prélèvement sur DDAC peut donc désormais être considéré comme une technique de plus en plus fiable, cependant le recul sur l'expérience française est trop court pour effectuer des comparaisons de survie des greffons à long terme. Ces bons résultats ont conduit le comité médical et scientifique de l'Agence de la Biomédecine à valider début 2008 un protocole médical de prélèvement du foie à partir de DDAC [40].

### **3. Activité de transplantation rénale en France**

#### **3.1. Les chiffres liés à la transplantation rénale**

La greffe rénale est quantitativement la plus fréquente des transplantations d'organes, avec 61% de l'activité totale de greffe, et a nettement augmenté depuis 1987. Cependant, la transplantation rénale reste la plus marquée par la pénurie, le nombre de malades en attente d'une greffe rénale augmentant chaque année : 8496 malades étaient encore en attente d'une greffe au 1<sup>er</sup> janvier 2011, soit une augmentation de 10,5% par rapport à 2010 [31, 38]. Tandis que le nombre de greffes, réalisé par an, stagne et n'atteint que 2892 greffes en 2010, aboutissant à un indice de pénurie de 2,6. La durée d'attente est aussi plus longue avec 22,3 mois en moyenne pour la cohorte 2008-2011 comparé à 18,1 mois pour la cohorte 2004-2007.

Afin de faire face à cette pénurie, les critères d'éligibilité pour les donneurs ont été étendus d'où la notion de donneurs « à critères élargis », « marginaux » ou « limites ». Les donneurs à critères élargis ont été définis par quatre facteurs de risque [41, 42]:

- Donneurs de 60 ans et plus
- Décès de cause cérébro-vasculaire (AVC)

- Antécédents d'hypertension artérielle
- Créatininémie supérieure à 150  $\mu\text{mol/L}$

Parmi ces critères, l'âge est le plus marquant. En effet, ces dernières années l'âge des donneurs a augmenté dans tous les pays. En France, l'âge moyen des donneurs en état de ME est passé de 37,5 ans en 1996 à 53,6 ans en 2010 (en valeur absolue le nombre de donneurs de plus de 60 ans a plus que doublé depuis 2004) et les donneurs de plus de 60 ans représentent actuellement 37,5 % de l'ensemble des donneurs en 2010 contre 25,7 % en 2008. L'augmentation régulière de l'âge moyen des donneurs et de la part des donneurs âgés de plus de 60 ans a été prise en compte par l'Agence de Biomédecine et un programme de financement de MP destinées aux greffons prélevés sur des sujets de plus de 60 ans ou de plus de 50 ans associés à des comorbidités va débiter en 2012 [31].

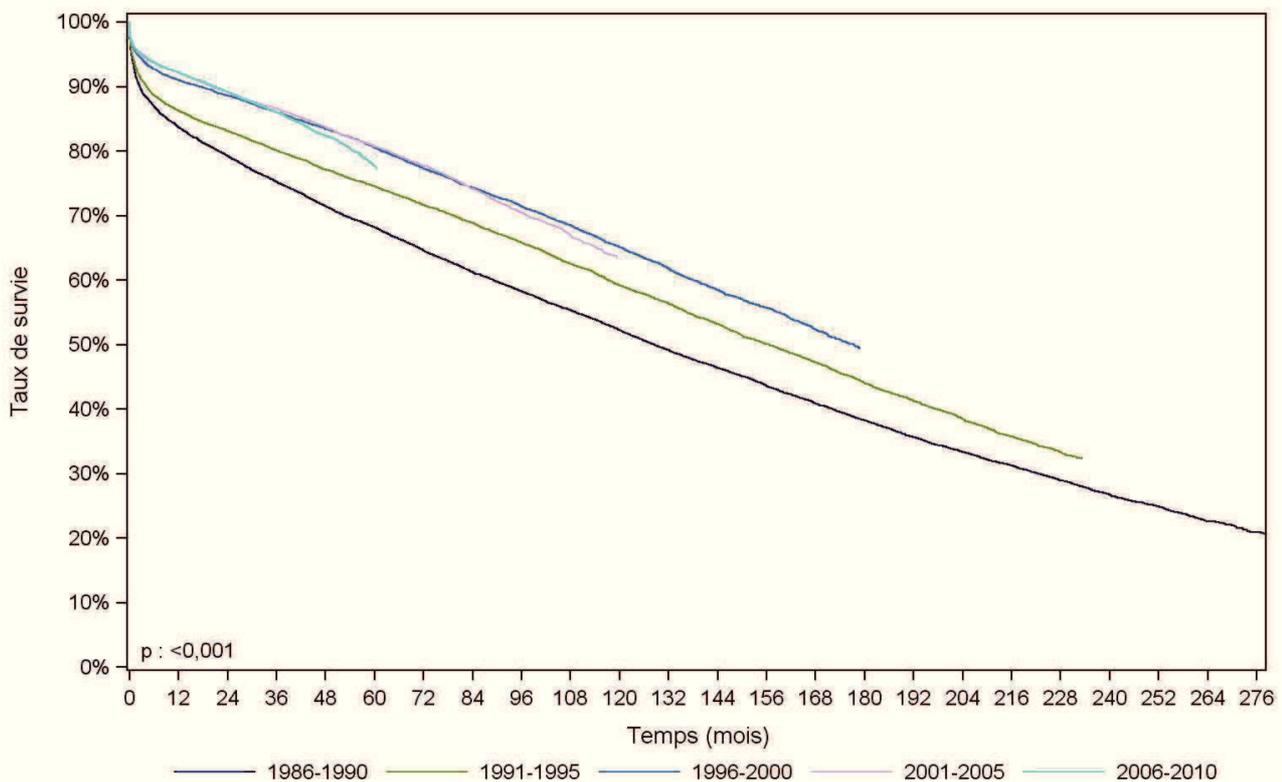
Parmi ces 2892 greffes de rein réalisées en 2010, la majorité des greffons provienne de personnes en état de ME, ce qui représente 1572 donneurs prélevés (correspondant à 49,5% des donneurs recensés) soit 24,1 pmh contre 1476 en 2010. On observe de nouveau une progression de l'activité après une phase de stagnation depuis 2008. Pour les DV, l'activité de greffe poursuit sa progression en 2011 avec 335 donneurs (5,1 pmh) permettant de réaliser 302 greffes de rein (10% des greffes rénales) contre 283 en 2010. Il s'agit d'une population de petite taille mais toute augmentation, même minime, du nombre de donneurs prélevés à une conséquence très positive car chaque donneur permet en moyenne de greffer 3,4 personnes. Le prélèvement sur DDAC qui a débuté fin 2006 montrait une progression jusqu'en 2010, année pour laquelle 62 donneurs avaient été prélevés. Malheureusement une régression s'opère en 2011 avec 58 donneurs, soit 0,9 pmh, qui ont fait l'objet d'un prélèvement d'organes ayant abouti à 66 greffes de rein.

Il est certain que, dans les années à venir, la population des donneurs va évoluer et que les équipes auront de plus en plus de donneurs et de greffons limites à leur disposition. Pour cette raison, il semble essentiel de définir des procédures visant à améliorer, d'une part, la qualité de l'organisation du prélèvement et de la transplantation et, d'autre part, celle des greffons.

#### 2.4. Survie des greffons post-greffe

En comparant les courbes de survie des greffons, on note une amélioration significative des résultats selon les cohortes de greffe. En effet, la survie à 1 an entre les cohortes 1986-1990 et 2006-2010 est passée de 83,6% à 92,1 % et à 5 ans de 68,2% à 77,6 % (Figure 2). La survie à 10 ans pour la cohorte 1993-2010 est significativement meilleure avec des greffons provenant de DV (77,9% contre 62,8 % avec donneur décédé) [43]. De plus, le taux de survie à 10 ans est identique que le donneur décédé soit en ME ou à cœur arrêté.

L'âge du donneur influence significativement le taux de survie du greffon à long terme. En effet, la créatininémie des receveurs de greffons de donneurs âgés est plus élevée que celle des receveurs de greffons de donneurs plus jeunes. Les éléments altérant la survie des greffons de donneurs âgés sont la durée de l'ischémie et la présence de lésions histologiques importantes [44].



**Figure 2:** Histogramme de survie des greffons rénaux suivant la période de greffe [43].

## 4. Devenir du greffon rénal après greffe

### 4.1. La non fonction primaire

La non fonction primaire (NFP) est définie comme l'absence totale et irréversible de fonction du greffon. La NFP est liée aux lésions histologiques de nécrose corticale, qui représentent le stade ultime et irréversible de la nécrose tubulaire aiguë, et elle est principalement liée à la durée d'ischémie chaude lorsqu'elle excède 30 minutes [45-47]. D'après les données récentes de la littérature, son incidence est de l'ordre de 6 et 16 % pour les DDAC selon les équipes de transplantation, alors qu'elle se situe entre 4 et 10 % pour les donneurs à cœur battant [48-51].

### 4.2. La reprise retardée de fonction

La reprise retardée de fonction (RRF) du greffon se définit par la nécessité d'au moins une séance de dialyse dans la première semaine après la greffe. La RRF représente habituellement un facteur prédictif de la survie des greffons rénaux indépendamment d'altérations [52]. Son incidence significativement plus importante, avec 30 à 90 %, en cas de DDAC *versus* 20 à 50 % en cas de prélèvement sur donneurs à cœur battant, est principalement liée aux effets délétères de l'ischémie chaude [46, 48-51, 53-56]. Du point de vue histologique, sa survenue correspond principalement à des lésions de nécrose tubulaire aiguë, comme l'ont démontré Gok et al. à partir de biopsies d'artère du greffon [57].

Au vu de ces données, les greffons « marginaux », utilisés de plus en plus fréquemment du fait de la pénurie d'organes, doivent être préservés avec le plus grand soin lors de la période de conservation. Cependant, la méthode de conservation la plus utilisée actuellement, qui est la conservation statique en hypothermie, ne semble pas adéquate pour ce type de greffons, plus sensible aux lésions d'IR inhérentes à la transplantation. C'est pourquoi il est important d'identifier de nouvelles conditions de conservation.

# B. RAPPELS ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES

## RENALES

### 1. Structure et fonction du rein chez l'Homme

#### 1.1. Fonction du rein

Le rein assure de multiples fonctions telles que :

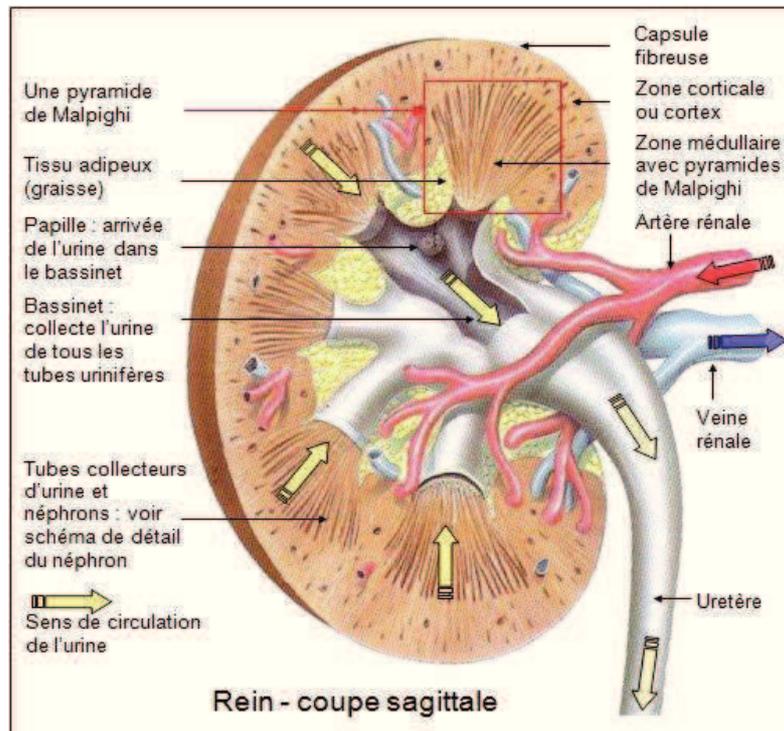
- le maintien de l'équilibre hydro-électrolytique, c'est-à-dire du volume, de la tonicité et de la composition électrolytique des liquides de l'organisme,
- l'élimination des déchets de l'organisme (urée, créatinine, acide urique) et des substances chimiques exogènes (médicaments, substances toxiques),
- la production de rénine, d'érythropoïétine, de 1,25 dihydroxycholecalciferol, de prostaglandines et de kinine,
- la néoglucogénèse à partir d'acides aminés et d'acide lactique.

#### 1.2. Histologie du rein

Les reins sont des organes pairs formés de deux zones distinctes: une partie périphérique, le cortex, et partie profonde, la médullaire (Figure 3).

Le cortex recouvre la base des pyramides de Malpighi et s'introduit entre les pyramides constituant les colonnes de Bertin. Les pyramides de Malpighi envoient des rayons médullaires appelés pyramides de Ferrein dans le cortex appelé labyrinthe.

La médullaire est formée par 8 cônes (4 à 18) appelés pyramides de Malpighi. La médullaire comprend 2 parties : la médullaire externe, dont la base externe jouxte le cortex, qui comporte une couche externe et une couche interne et la médullaire interne formant la papille, fait saillie dans les calices [58].



**Figure 3:** Schéma représentant une coupe sagittale de rein d'Homme [59]

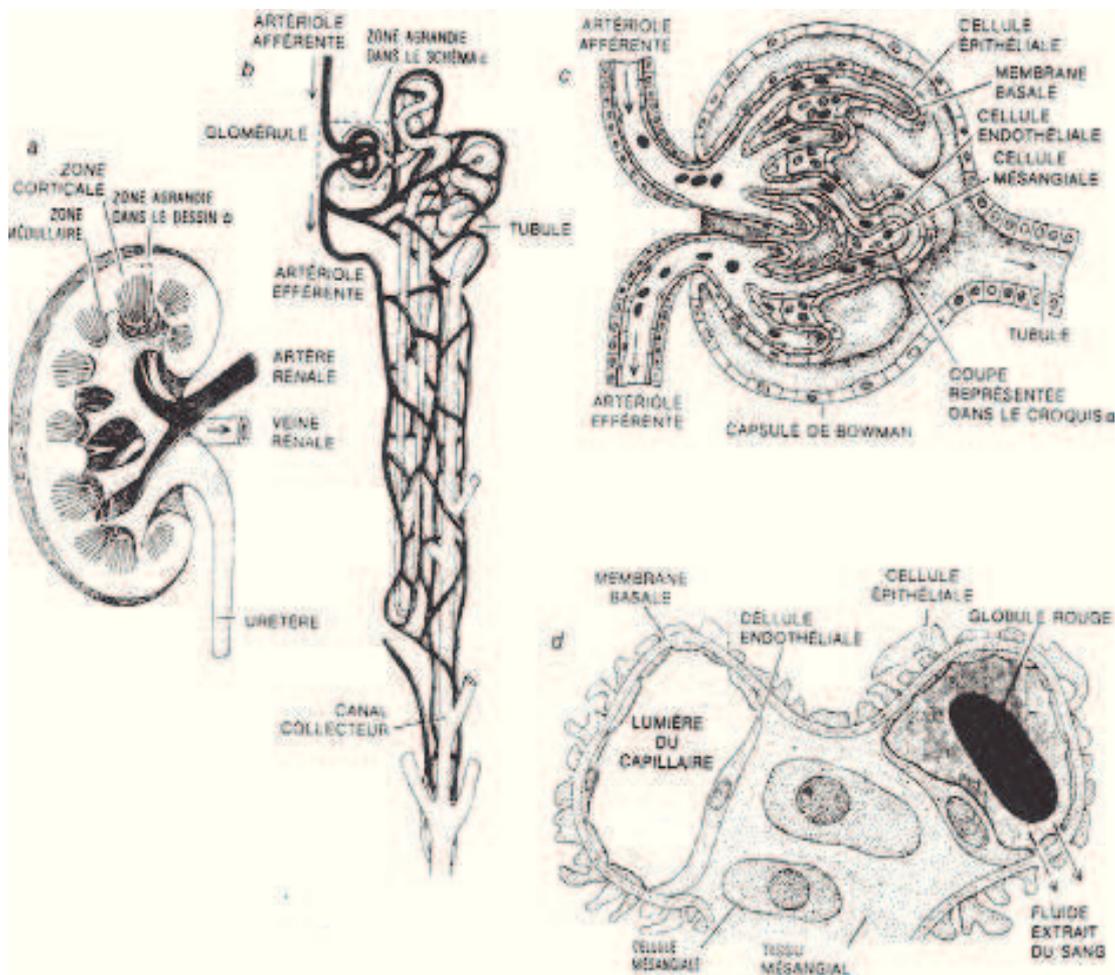
### 1.3. Structure néphronique

« Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein. Chaque rein comporte environ 1 300 000 néphrons situés dans le tissu interstitiel où cheminent également les vaisseaux et les nerfs. Chaque néphron comporte plusieurs segments (Figure 4) :

- Le glomérule a la forme d'une sphère limitée par une enveloppe, la capsule de Bowman, constituée par des cellules épithéliales reposant sur une membrane basale qui se prolonge avec celle du tube contourné proximal et avec celle du floculus. Le glomérule présente deux pôles : un pôle urinaire, où s'insère le tube contourné proximal, et un pôle vasculaire où pénètre l'artériole afférente et d'où sort l'artériole efférente au contact de l'appareil juxta glomérulaire. Le glomérule est essentiellement constitué par un réseau capillaire, le floculus, réalisant un système porte artériel entre l'artériole afférente et l'artériole efférente. Les parois des capillaires glomérulaires constituées de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale. Ce réseau capillaire possède deux propriétés fondamentales : une conductivité hydraulique très élevée autorisant un débit de filtration élevée ( $120 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ ) et une imperméabilité aux macromolécules supérieure à 68 Kda.

- Le tubule rénal, composé d'un tube proximal, d'un tube intermédiaire et d'un tube distal. Chaque tube comprend différentes parties. Le tube proximal comprend deux parties : un tubule contourné et un tubule droit. Le tube intermédiaire très fin qui comporte les branches fines descendante et ascendante de l'anse de Henle. Le tube distal avec deux parties : un tube droit large constituant la branche ascendante large de l'anse de Henle et un tube contourné qui se jette dans un canal collecteur
- La macula densa, élément de l'appareil juxta glomérulaire, au contact du tube contourné distal et de l'artériole afférente.

Le cortex contient les glomérules, le tube contourné proximal, le tube contourné distal tandis que le tube droit proximal, le tube intermédiaire et le tube droit distal, formant l'anse de Henle, sont dans la médullaire ainsi que les canaux collecteurs de Bellini. » [58]



**Figure 4:** Anatomie du rein et du néphron d'Homme. Schéma d'une coupe sagittale de rein (A), d'un néphron (B), d'un glomérule (C) et le mésangium (D) [60]

## 2. Fonction du néphron

Le néphron remplit deux fonctions essentielles : la filtration glomérulaire et les mécanismes de réabsorption et de sécrétion tubulaires.

### 2.1. L'urine primitive

La filtration glomérulaire représente la première étape de la formation de l'urine. Une fraction du plasma (20%) circulant dans les capillaires glomérulaires, filtre à travers la structure complexe de la paroi capillaire pour former l'urine primitive dans l'espace de Bowman et s'écoule ensuite dans le tube proximal. Le glomérule est une structure spécialisée formée de capillaires sanguins et dont l'endothélium est en étroite relation avec l'épithélium rénal. Au final, le plasma est filtré à travers une structure formée de trois couches successives : les cellules endothéliales des capillaires, la membrane basale et les cellules épithéliales viscérales ou podocytes. Ces cellules aux propriétés contractiles sont constituées de longs prolongements ou pédicelles entre lesquels les fentes de filtration permettent la diffusion de l'ultrafiltrat dans l'espace urinaire. L'urine primitive résultant de cette filtration possède deux caractéristiques essentielles :

- d'une part, une identité quasi identique au plasma pour certains caractères physico-chimiques comme le pH, la concentration des différents ions, urée, glucose ...
- d'autre part, une faible concentration de protéines de l'ordre de 200 à 300 mg/L. Il s'agit donc d'un ultrafiltrat plasmatique d'un débit d'environ 120 mL/min chez l'Homme.

La nature des substances constituant cet ultrafiltrat est déterminé par le caractère sélectif de la membrane basale du glomérule. Cette sélectivité est faite en fonction de la taille de la substance, la membrane glomérulaire possédant une perméabilité élevée pour l'eau et les solutés de petite taille, mais faible pour les molécules les plus grosses. Les molécules de poids moléculaire inférieur à 5000 daltons, à condition qu'elles ne soient pas liées aux protéines, traversent la membrane glomérulaire librement et se retrouvent dans l'ultrafiltrat à une concentration identique à celle du plasma. A l'inverse, les molécules de poids moléculaire supérieur à 70 000 daltons sont retenues en majorité. La membrane basale possède également une sélectivité en fonction de la charge électrique des substances: étant chargée négativement, elle a tendance à repousser les protéines elles-mêmes chargées négativement au pH plasmatique physiologique.

La filtration glomérulaire semble être le résultat de deux processus [61] :

- La filtration qui correspond au transfert de solutés et de solvant au travers d'une membrane perméable sous l'influence d'un gradient de pression. La filtration glomérulaire est déterminée par l'équilibre des pressions de part et d'autre de la paroi du capillaire glomérulaire. A pression efficace de filtration donnée, la filtration glomérulaire dépend également de la perméabilité des capillaires glomérulaires. En effet, cette dernière conditionne le débit du filtrat glomérulaire et la nature des substances composant l'urine primitive. Le débit de filtration glomérulaire dépend, outre le nombre de néphrons fonctionnels, de la surface de filtration, de la perméabilité des glomérules, de la pression artérielle et du débit sanguin traversant les glomérules.
- La diffusion, qui correspond au transfert passive de solutés au travers d'une membrane sous l'influence d'un gradient de concentration, interviendrait également pour expliquer le débit élevé de la filtration glomérulaire.

## 2.2. L'urine définitive

L'urine primaire, résultant de la filtration glomérulaire du sang, subit alors trois modifications essentielles au cours de sa traversée tubulaire (Figure 5): la réabsorption de l'eau, la réabsorption du sodium et l'excrétion des ions  $H^+$  ou  $H_3O^+$  grâce à des mouvements passifs, qui se font par diffusion simple, et des mouvements actifs, qui font intervenir des échangeurs. Les cellules épithéliales polarisées qui tapissent la lumière des tubes proximaux contribuent, avec leurs nombreuses microvillosités membranaires, à la régulation des mécanismes de réabsorption et de sécrétion tubulaire.

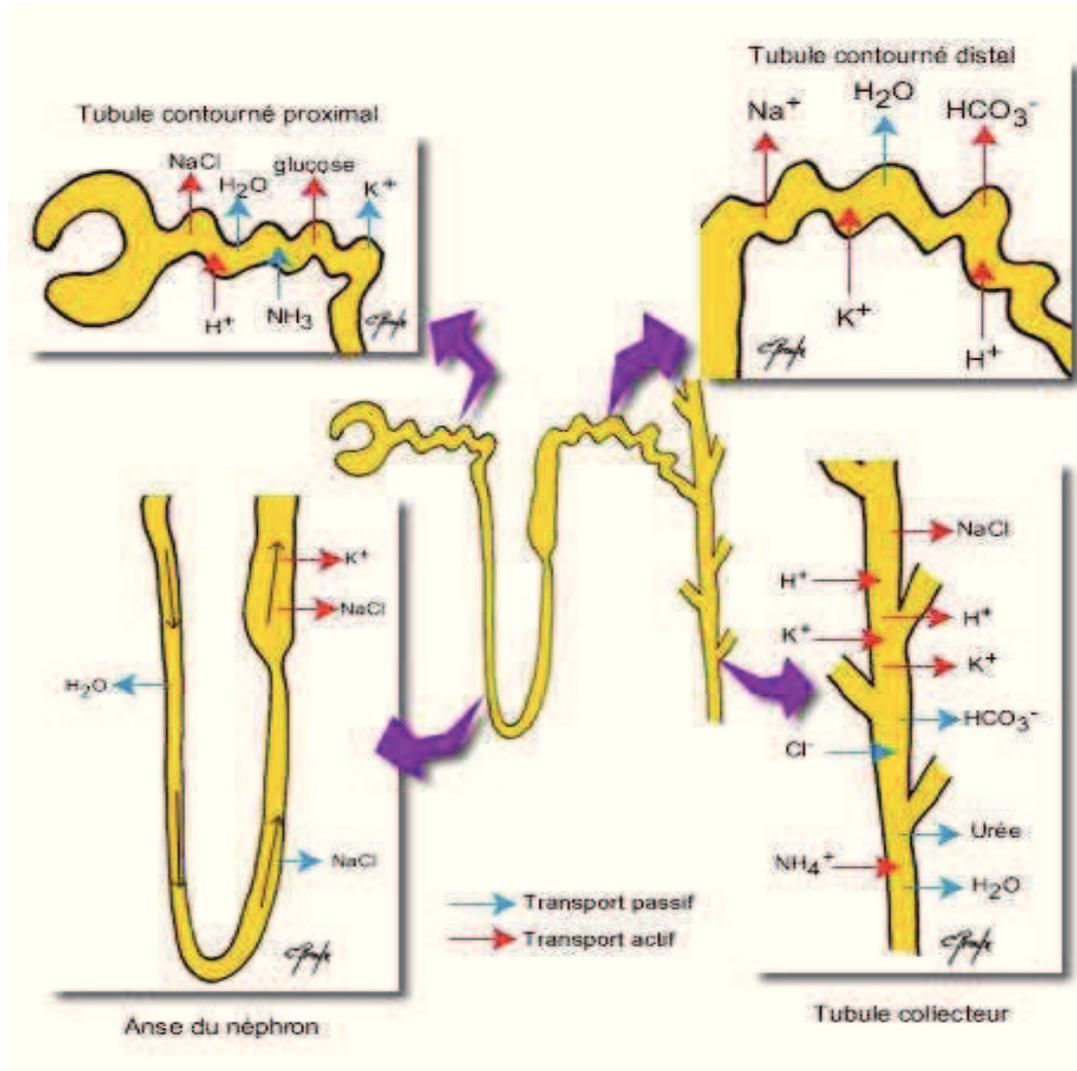
Le tube contourné proximal (TCP) est constitué d'un épithélium capable de réabsorber 60% de l'ultrafiltrat plasmatique ( $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $HCO_3^-$ , glucose, acides aminés). L'épithélium tubulaire est un épithélium polarisé car il est capable de mettre en place et de maintenir des gradients de concentration ionique entre les compartiments qu'il sépare, c'est-à-dire l'urine primitive à la sortie du glomérule d'une part, les capillaires péri-tubulaires et l'interstitium d'autre part. Ces fonctions vectorialisées sont la conséquence d'une organisation polarisée de la cellule épithéliale qui a la capacité d'insérer sélectivement différentes molécules dans des compartiments distincts de la membrane plasmique appelés domaines. Le domaine apical, qui est en contact avec l'urine primitive, possède une importante bordure en brosse faite de microvillosités longues et denses. En revanche, le domaine basolatéral est en contact avec les cellules voisines et avec l'interstitium par l'intermédiaire de la membrane basale synthétisée par la cellule elle-même [62].

De plus, l'épithélium tubulaire comporte de nombreux transporteurs ioniques membranaires dont le plus connu est la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase situé dans la membrane basolatérale. Les jonctions intercellulaires sont peu développées avec des jonctions serrées courtes ou *Zonula Occludens* (ZO) et des jonctions adhérentes ou *Zonula Adhaerens* (ZA) plus étendue et localisées sous les ZO.

Dans le TCP, 60% du sodium de l'urine primitive est réabsorbé, contribuant à la formation d'un gradient électrochimique responsable de la réabsorption des ions chlore ainsi qu'un gradient osmotique qui permet la réabsorption de l'eau. D'autres substances comme le bicarbonate, le sulfate, le glucose, le potassium, le phosphate, et les acides aminés sont également réabsorbés à ce niveau. L'équilibre acido-basique est maintenu par la sécrétion des ions  $\text{H}^+$  et des ions bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ) en excès, prévenant ainsi l'acidose grâce au maintien du pH physiologique à 7,4. D'autres substances comme les déchets azotés (urée, créatinine et acide urique), les toxines et les molécules pharmacologiques sont également éliminées dans les urines. Un de ces déchets les plus connus, la créatinine, ne subit donc ni réabsorption ni sécrétion tubulaire et la facilité de sa mesure permet le calcul d'une clairance qui est le reflet du débit de filtration glomérulaire.

L'anse de Henle contribue à de nombreuses fonctions physiologiques comme la formation d'un gradient ionique cortico-médullaire, la dilution de l'urine et la réabsorption de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Mg}^{2+}$ , accompagnée d'une réabsorption d'eau continue au niveau de la branche descendante tandis que la branche ascendante est imperméable à l'eau et ne réabsorbe que les ions sodium et chlore.

Le tube contourné distal (TCD), qui est constitué de cellules épithéliales plus petites et dépourvues d'une bordure en brosse, contribue également à la réabsorption du sodium, favorisée par l'aldostérone, hormone sécrétée par les glandes surrénales. Tandis que le pouvoir de concentration ou de dilution de l'urine dépend d'une autre hormone, l'hormone antidiurétique (ADH) ou vasopressine, synthétisée au niveau de l'hypothalamus et sécrétée par l'hypophyse postérieure lorsque l'osmolarité du sang augmente. Cette réabsorption d'eau et de sodium, qui est sous contrôle hormonal, se poursuit également au niveau du canal collecteur.



**Figure 5 :** Mouvements de sécrétion et de réabsorption de substances urinaires à partir d'un néphron chez les vertébrés.

Ces propriétés fonctionnelles particulières des différentes régions histologiques du rein impliquent que des lésions rénales conduisent à des conséquences différentes selon la région rénale endommagée : des lésions glomérulaires conduiront à une protéinurie, alors que des lésions tubulaires induiront des modifications de la composition électrolytique de l'urine.

Le rein est donc un organe très complexe, avec un réseau complexe de vaisseaux avec des fonctions spécifiques. Du fait que les capillaires ne gèrent pas seulement des échanges gazeux et des petites molécules comme dans n'importe quel organe, mais doivent aussi être équipés pour faire face aux changements des niveaux de nutriments, de sels et en particulier d'eau au fur et à mesure de la

récupération de ces derniers par les tubules, ainsi l'équilibre osmolaire est très délicat et implique des exigences spécifiques sur les cellules. Une machinerie complexe, comme celle du rein, implique que de petites modifications peuvent ne pas être aussi facilement résolues que dans le cas d'un organe plus simple, et que des incidents importants comme l'ischémie peuvent avoir de profondes conséquences. Ainsi, les propriétés macro-anatomiques du rein le prédisposent aux lésions d'IR.

### 3. Vascularisation rénale

#### 3.1. Rappel d'anatomie vasculaire intrarénale

L'artère rénale se divise en artères interlobaires qui pénètrent dans le parenchyme entre les pyramides de Malpighi. Elles se prolongent par les artères arquées qui effectuent une voûte vasculaire à la jonction cortico-médullaire. Elles donnent naissance aux artères interlobulaires qui cheminent dans le cortex vers la périphérie puis se divisent en artérioles afférentes des glomérules qui se ramifient dans le glomérule pour former un réseau capillaire auquel fait suite l'artériole efférente.

Les artérioles efférentes donnent ensuite naissance :

- aux capillaires péri-tubulaires, lieu d'échange des solutés, de l'oxygène et d'eau entre tubule et capillaire,
- aux artères droites ou *vasa recta* pour les glomérules profonds juxta médullaires, pouvant également naître directement des artères arquées, qui irrigue la médullaire externe et à un moindre degré la médullaire interne [58].

Les capillaires péri-tubulaires débouchent dans une veinule efférente qui rejoint la veine. Ainsi chaque partie du néphron est en lien étroit avec le système artério-veineux favorisant l'épuration des déchets métaboliques et la réabsorption directe de l'eau et des ions dans le sang.

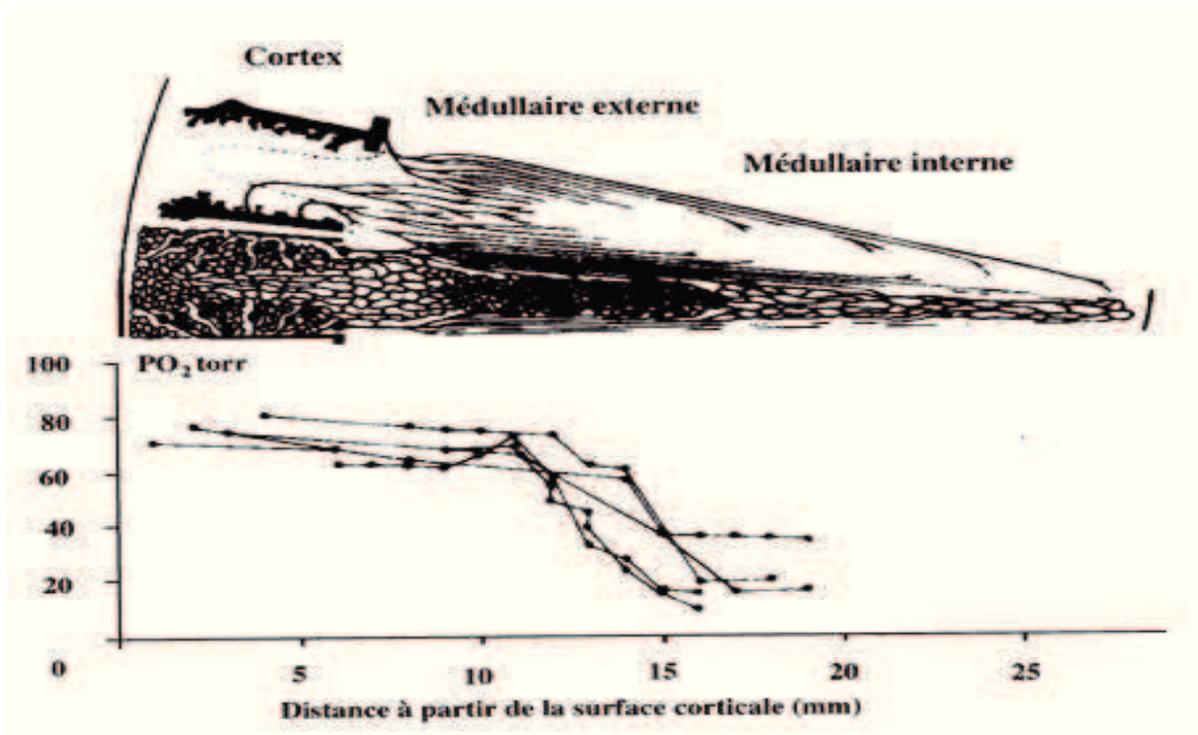
#### 3.2. Perfusion rénale

L'oxygénation du rein est caractérisée par un paradoxe remarquable. D'un côté, en relation avec le poids, les reins sont les organes les plus perfusés de l'organisme, recevant environ un quart du débit cardiaque, et bénéficiant d'une alimentation en oxygène totale de plus de 80 mL/min × 100g de poids. Les reins possèdent globalement une perfusion dite de « luxe » avec un transport d'O<sub>2</sub> relativement élevé (200 mL/min), dont moins de 10% est consommé lors du passage à travers les organes. Néanmoins, il existe une grosse hétérogénéité d'oxygénation selon la zone du parenchyme rénal

considérée. En effet, la médullaire ne reçoit qu'un quart de ce débit rénal total, tandis que le cortex bénéficie des trois quarts du débit rénal total associé à une forte pression partielle locale en O<sub>2</sub>.

De l'autre côté, les tensions en oxygène des tissus dans le parenchyme rénal sont plus faibles que dans la plupart des autres organes et bien inférieurs à ceux mesurés dans la veine rénale. En particulier, la médullaire rénale est considérée comme l'un des sites de l'organisme avec les tensions les plus basses d'oxygène.

L'explication de l'écart entre l'apport d'oxygène élevé et les faibles tensions en oxygène tissulaire du rein se trouve dans l'architecture unique de la vascularisation rénale. Dans le cortex et la médullaire, les branches des artères rénales et les veines fonctionnent de façon strictement parallèle et sont en contact étroit les unes avec les autres sur de longues distances. Ce montage en parallèle permet à l'oxygène de diffuser à partir du système artériel dans le système veineux, avant son entrée dans le lit capillaire. Ainsi l'oxygène est soumis à un échange à contre-courant, comparable avec l'urée, et ce mécanisme est particulièrement pertinent dans la médullaire rénale, où il conduit à des tensions d'oxygène en dessous de 10 mmHg. Cependant, l'échange à contre-courant de l'oxygène se produit également dans les artères pré glomérulaires du cortex rénal, où les tensions d'oxygène sont d'environ 30 mmHg avec une variabilité importante [63]. Le sang artériel arrive dans le parenchyme cortical, où l'on observe le niveau d'oxygène le plus élevé, puis les artères se ramifient et avancent plus profondément dans la médullaire externe, où l'on observe une diminution de la pression partielle en oxygène (pO<sub>2</sub>), avec les niveaux les plus bas dans la papille (Figure 6). Cela implique que les cellules des différentes régions soient adaptées pour fonctionner de façon optimale dans leur microenvironnement spécifique et leur niveau d'oxygénation [64].



**Figure 6 :** Pression partielle d'O<sub>2</sub> selon les régions du parenchyme rénal. La partie supérieure schématise l'organisation vasculaire. L'échange d'O<sub>2</sub> se fait à contre-courant dans les *vasa recta*. La diffusion de l'O<sub>2</sub>, entre les branches artérielles descendantes et veineuses ascendantes explique le gradient corticomédulaire de PO<sub>2</sub>. D'après Brezis et al [65].

Une autre cause de la pression partielle en oxygène basse dans la médullaire est le besoin important en énergie pour les cellules tubulaires de cette région due à une activité métabolique élevée du fait de la réabsorption du sodium dépendant de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, qui est localisée sur la membrane basolatérale de la cellule.

Au contraire, les cellules tubulaires proximales possèdent une machinerie glycolytique minimale et dépendent presque complètement de la phosphorylation oxydative pour la production d'adénosine triphosphate (ATP). Enfin, les cellules de la branche ascendante large de l'anse de Henle de la médullaire ont une plus grande capacité glycolytique et sont donc plus résistantes à l'ischémie [62].

Un autre aspect remarquable, qui est lié à ces considérations anatomiques et physiologiques, est celui de la spécificité métabolique des différentes régions rénale. Situées dans une zone très vascularisée, les cellules de la région corticale sont capables d'utiliser différentes sources de substrats pour leur métabolisme tels que les acides gras, le lactate, les corps cétoniques et les acides aminés [66]. En effet, les cellules de la région corticale externe reposent principalement sur l'oxydation du succinate,

qui a besoin d'une plus faible quantité d'O<sub>2</sub>, et sont capables de déplacer sans peine l'O<sub>2</sub> indépendamment du métabolisme du lactate et du glucose dans le cas d'une diminution des niveaux d'O<sub>2</sub>. Et enfin, les cellules de la région médullaire profonde, compte tenu de leur environnement hypoxique, utilisent la glycolyse anaérobie pour fabriquer l'ATP (adénosine triphosphate).

Dans ce contexte, la susceptibilité à l'ischémie varie d'une région à l'autre [67]. Les cellules du cortex externe ont une grande réserve d'oxygène, et donc ne sentent pas l'effet de l'ischémie transitoire, cependant les cellules épithéliales de la médullaire externe repose sur un métabolisme exigeant en oxygène dans un environnement permettant très peu de réserve, donc sont principalement affectées par l'ischémie.

D'autre part, les cellules papillaires ont besoin de très peu d'oxygène et seront donc les dernières touchées par l'ischémie. Il est cependant important de garder à l'esprit qu'avec une ischémie prolongée, tous les domaines du rein sont touchés.

III. PHYSIOPATHOLOGIE  
DE L'ISCHEMIE/  
REPERFUSION.  
REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE

## A. Définition générale

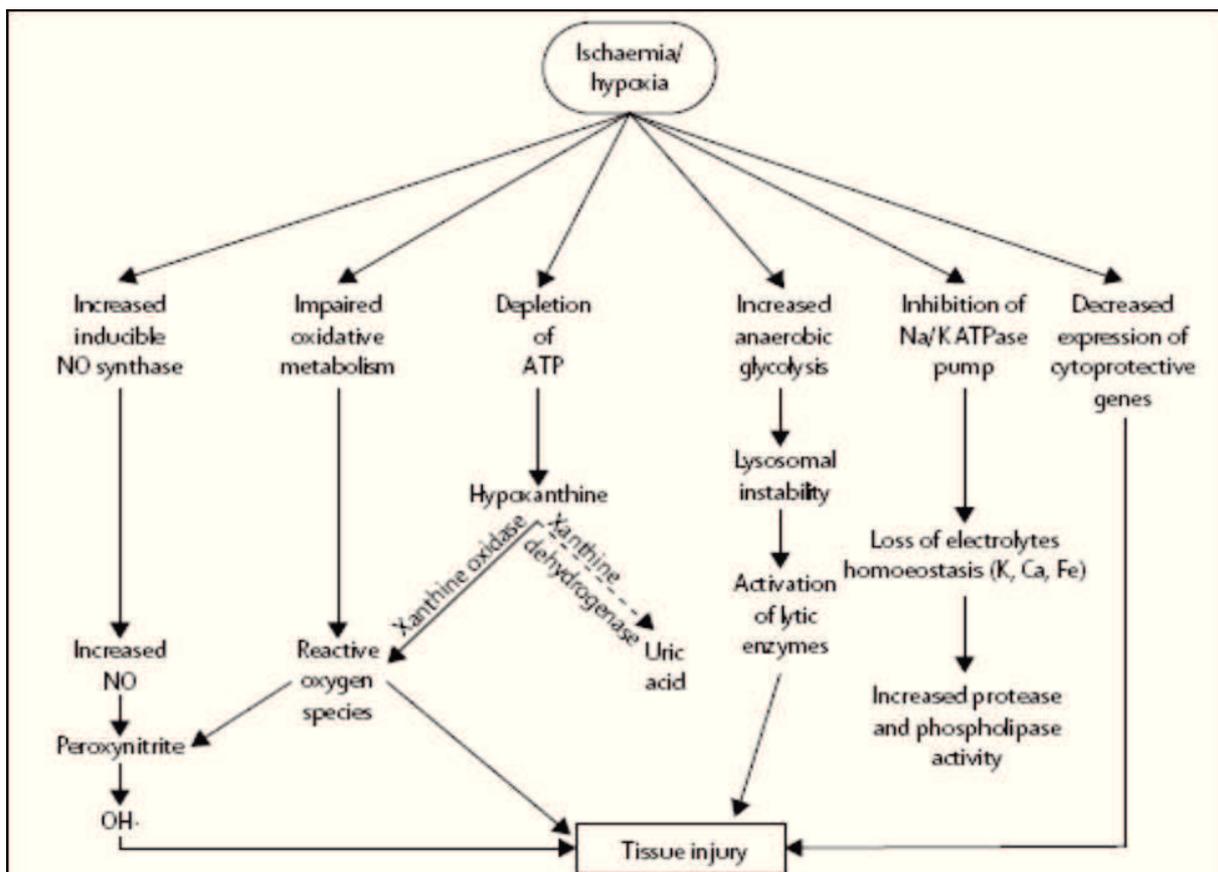
L'ischémie est définie comme l'arrêt de l'apport sanguin au tissu ou à l'organe. Cette interruption des connections vasculaires induit un arrêt des apports en nutriments et, dans tous les organes à l'exception des poumons, une chute de la pression partielle en oxygène dans les territoires ischémiés qui va résulter en un déséquilibre sévère entre l'apport et la demande métabolique provoquant une altération du métabolisme cellulaire (appelé « lésions d'ischémie »). La reperfusion est la restauration de l'apport sanguin (et donc de la perfusion et de la réoxygénation concomitante, exception faite des poumons) au tissu ou à l'organe. Bien que nécessaire, elle est fréquemment associée à une exacerbation des lésions tissulaires, initiées lors de l'ischémie, et une réponse inflammatoire profonde (appelé « lésions de reperfusion »).

Tous les organes sont exposés aux lésions du syndrome d'ischémie/reperfusion (IR) lors de la transplantation. Ce syndrome regroupe un ensemble de processus physiopathologiques responsables de lésions au niveau du greffon. Ces lésions, détaillées dans ce chapitre, sont liées à l'hypothermie et à l'hypoxie lors de la conservation de l'organe *ex vivo*, mais également au réchauffement associé à la réoxygénation de l'organe au cours de la reperfusion [3].

En réalité, l'IR se place dans un processus plus large qui inclut les lésions de l'organe associées à la phase de réanimation du donneur, à la mort encéphalique, aux difficultés du prélèvement et aux conditions de la transplantation chez le receveur, ainsi que les lésions cérébrales. Il faut également ajouter les facteurs de risque du donneur et du receveur qui peuvent contribuer au développement des lésions du greffon [35, 68].

## B. La phase d'ischémie

L'ischémie « froide » recouvre les lésions qui s'observent après la phase circulatoire et pendant la phase de conservation. Hormis dans le cas particulier du poumon, qui n'étant pas mon sujet de thèse ne sera pas discuté plus avant, l'ischémie prive les tissus d'oxygène et de nutriments et cause une accumulation de déchets métaboliques. Les cellules parenchymateuses des organes ont quasiment toutes la même tolérance à l'ischémie et la plupart des lésions irréversibles surviennent au-delà de 120 minutes à température ambiante. Quant aux cellules non parenchymateuses (endothélium vasculaire, macrophages, sinusoidales), elles sont encore plus tolérantes à l'ischémie. L'hypothermie quant à elle diminue le métabolisme cellulaire permettant ainsi d'assurer plus longtemps la viabilité des structures anatomiques et fonctionnelles. Au niveau cellulaire, les principaux changements biochimiques induits par l'ischémie froide sont l'inhibition du métabolisme oxydatif, la déplétion en ATP, l'augmentation de la production d'ATP par glycolyse en conditions anaérobies et l'altération de l'homéostasie ioniques (Figure 7). Ces modifications biochimiques entraînent la mise en place d'un certain nombre de processus qui seront amplifiés lors de la phase de reperfusion.



**Figure 7:** Schéma des changements moléculaires et biochimiques induits par l'IR rénale [69].

## **1. Déplétion énergétique et acidose intracellulaire**

L'ischémie froide résulte en une déplétion rapide de l'ATP cellulaire. En moins de 4 heures, environ 95% de la quantité d'ATP a disparu, provoqué par la diminution de sa synthèse et l'augmentation de sa consommation [4]. L'ATP est progressivement hydrolysée en hypoxanthine, qui, en absence d'oxygène, ne peut être métabolisé notamment car ce processus se produit dans des conditions aérobies. L'absence d'oxygène conduit au découplage de la chaîne respiratoire, la mitochondrie ne peut plus assurer la phosphorylation oxydative permettant la production d'ATP et la régénération subséquente des cofacteurs sous leur forme oxydée nécessaire au métabolisme oxydatif. La cellule utilise alors la voie de la glycolyse anaérobie pour produire de l'ATP, cependant cette production résiduelle est insuffisante face aux besoins énergétiques de la cellule. De plus, la production de lactate qui en découle ainsi que l'accumulation de protons, conséquence du découplage de la chaîne respiratoire de la mitochondrie, provoque une acidose cellulaire [69, 70]. La baisse du pH active alors les phospholipases et les protéases conduisant à une instabilité lysosomale avec l'activation des enzymes lytiques, pouvant conduire à la mort cellulaire.

## **2. Altération ionique et désorganisation du cytosquelette**

Lors de l'ischémie, la déplétion en ATP conduit à la perturbation des transporteurs ioniques membranaires assurant le maintien du potentiel de la membrane cellulaire ainsi que du gradient de concentration ionique entre les milieux intra et extracellulaire, en particulier au niveau endothélial.

Au centre de cette problématique se trouve la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, inhibée par la persistance de l'hypoxie ce qui conduit à une élévation de la concentration de sodium cytosolique ainsi qu'une baisse simultanée de celle du potassium. La concentration sodique est responsable d'un œdème, d'une désorganisation cellulaire et de l'activation des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  au niveau des organelles de la cellule, entraînant une augmentation cytosolique de calcium et de protons ainsi qu'un dérèglement de l'équilibre ionique d'organelles de première importance, tels que la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique.

Une autre conséquence de l'ischémie est la désorganisation du cytosquelette, qui aboutit à une modification structurale et à une perte de la polarité des cellules tubulaires proximales, entraînant alors une redistribution apicale de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, ce qui accentue l'augmentation du sodium cytosolique et l'œdème cellulaire [71-73].

L'œdème cellulaire va d'abord engendrer une souffrance cellulaire, plus particulièrement au niveau mitochondrial, conduisant à son gonflement et perturbant le métabolisme aérobie. Dans le même temps, le gonflement cellulaire va entraîner une compression du lit vasculaire périphérique, diminuant le débit de perfusion dans l'organe, favorisant le phénomène de "no-reflow" lors de la reperfusion, pouvant aggraver l'hypoxie chronique [74].

De plus, la dépolarisation de la membrane cellulaire conduit à l'ouverture temporaire des canaux calciques voltage-dépendants, contribuant à l'accumulation de calcium dans le cytosol, lésion exacerbée par l'inhibition de la pompe  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase.

En parallèle, la concentration élevée de calcium cytosolique active les systèmes enzymatiques calcium-dépendants. Effectivement, les calpaïnes sont activées et contribuent à la désorganisation du cytosquelette ; la phospholipase  $\text{A}_2$  contribue à la libération des acides gras polyinsaturés favorisant la déstructuration membranaire et l'initiation d'un processus pro-inflammatoire [75-77].

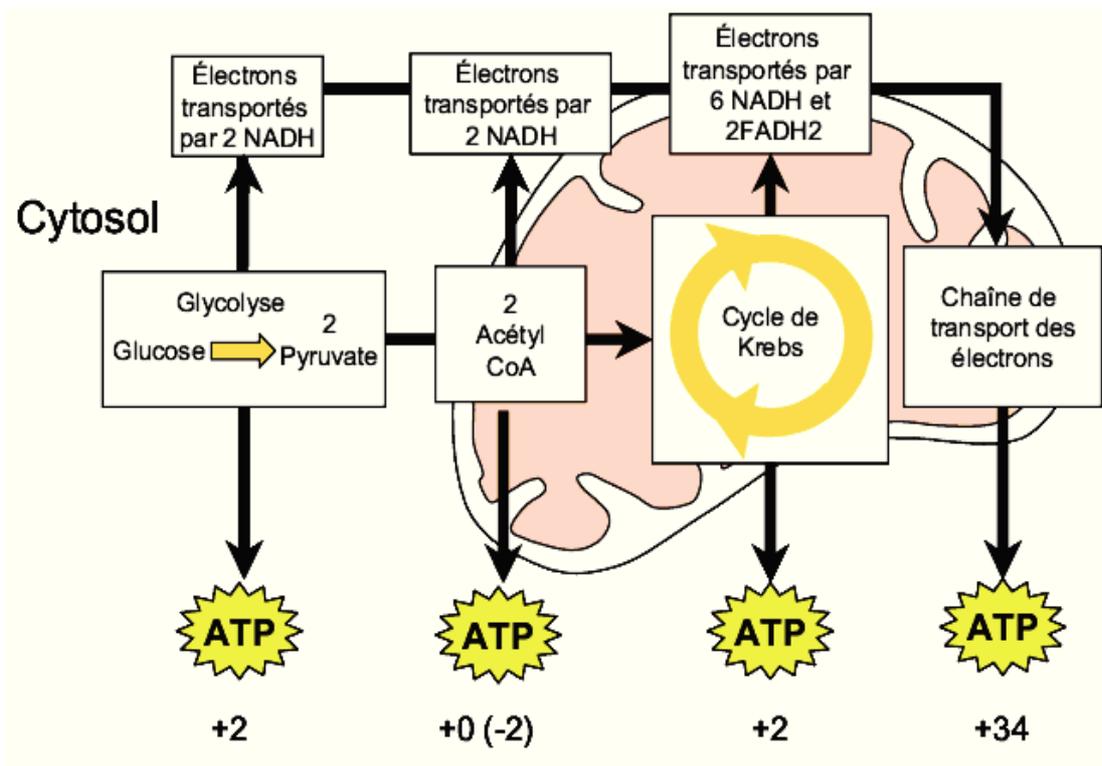
L'élévation de la concentration calcique conduit à la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase qui va intervenir dans la production d'anion superoxyde en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique.

De plus, l'ischémie induit une diminution notable du pH intracellulaire. Cette acidose résulte de l'accumulation de protons provenant de l'inhibition des pompes ATPases ainsi que de l'hydrolyse de l'ATP.

### **3. Dysfonctionnement mitochondriale**

#### **3.1. Fonctions principales de la mitochondrie**

Dans les conditions physiologiques, la glycolyse qui se déroule dans le cytoplasme, oxyde progressivement une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate et va conduire à la production de deux molécules d'ATP et de deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) (Figure 8). Dans les mitochondries, le pyruvate formé est alors oxydé par le pyruvate déshydrogénase en acétyl Coenzyme A (CoA), avec formation de NADH. L'acétyl CoA peut également provenir de la  $\beta$ -oxydation des acides gras, avec formation de coenzyme réduit, NADH et flavine adénine dinucléotide réduite ( $\text{FADH}_2$ ). L'acétyl CoA va être transformé grâce au cycle de Krebs en équivalents réduit (NADH et  $\text{FADH}_2$ ).



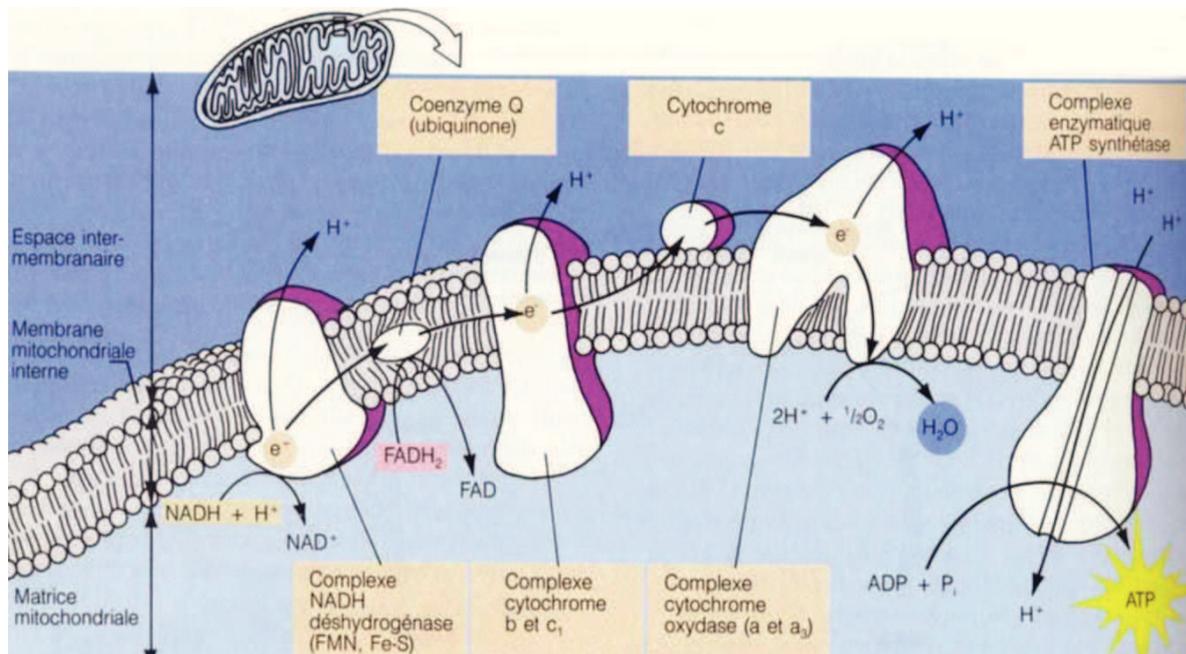
**Figure 8 :** Etapes principales de production d'ATP à partir d'un sucre simple (glucose) en conditions anaérobies [78].

Afin de produire de l'énergie, ces coenzymes réduits vont être réoxydés au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale créant un gradient électrochimique de proton qui va libérer de l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP lors de la phosphorylation oxydative au niveau de l'ATP synthase (phosphorylation de l'ADP en ATP) (Figure 9).

Les complexes I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase) et II (succinate-coenzyme Q oxydoréductase) de la chaîne respiratoire oxydent indépendamment et respectivement le NADH et le FADH<sub>2</sub>, et transmettent des électrons au complexe III (coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase) *via* l'ubiquinone ou la coenzyme Q [79, 80]. Les électrons vont ensuite être transférés *via* le cytochrome c au complexe IV, puis à des molécules d'oxygènes qui vont être réduites et former, avec les protons de la matrice, des molécules d'H<sub>2</sub>O.

Au cours de ce transfert, des protons sont expulsés de la matrice vers l'espace intermembranaire (au niveau des complexes I, III et IV) produisant, de part et d'autre de la membrane interne, un gradient électrochimique d'ions H<sup>+</sup> qui contient l'énergie d'oxydation. Ce gradient est formé d'un gradient de pH (la matrice devient plus basique) et d'un gradient de charges (la face matricielle de la membrane interne est chargée négativement).

Le retour des protons dans la matrice ne peut avoir lieu qu'au niveau de l'ATP synthase (complexes FoF1) : Fo étant un canal transmembranaire qui laisse passer sélectivement les protons, F1 contenant le site catalytique responsable de la synthèse de l'ATP à partir d'ADP et de Pi.



**Figure 9** : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale [81]

### 3.2. Fonctionnement de la mitochondrie au cours de l'ischémie : Production d'espèces oxygénées réactives

Le découplage de la mitochondrie lors de l'ischémie va empêcher le bon fonctionnement de la respiration et aboutir à l'induction d'un stress oxydant, défini par une surproduction d'EOX conduisant à un déséquilibre de l'homéostasie oxydo-réductrice de la cellule. Les EOR sont des espèces partiellement réduites de l'oxygène tels que les radicaux libres ou les molécules produites par un certain nombre de réactions biologiques dans l'organisme.

Bien que le stress oxydant soit couramment décrit lors de la réintroduction de l'oxygène, sa genèse est maintenant clairement établie au moment de l'ischémie malgré un rôle moins évident. L'hypothermie semble plutôt limiter le métabolisme cellulaire et ralentir ainsi tout processus de synthèse, qu'il soit délétère ou non. Néanmoins, il est établi que le ralentissement de la phosphorylation oxydative conduit à une accumulation et une fuite des électrons vers l'oxygène résiduel au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale, induisant une production d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) [79, 80]. La xanthine oxydase, qui est activée notamment par

l'élévation des concentrations calciques, est une enzyme responsable de la production d'anion superoxyde dans ces conditions [82, 83]. Ces EOR ont la capacité de réagir rapidement avec certains constituants cellulaires, entraînant des dommages sévères au niveau des protéines, des acides nucléiques et des lipides, induisant *in fine* l'activation des voies de mort cellulaire comme l'apoptose ou la nécrose.

### 3.3. Les dérivés activés de l'azote : Monoxyde d'azote (NO)

La liaison de métaux de transition tels que le fer, à leurs protéines porteuses (transferrine, ferritine) est également inhibée, pouvant ainsi augmenter éventuellement la concentration intracellulaire de fer libre, puissant catalyseur pour les réactions qui génèrent des radicaux oxygénés. La génération de tels radicaux induit une production d'autres radicaux comme le monoxyde d'azote (NO), qui réagit avec les radicaux superoxydes pour produire le peroxyde d'azote, un oxydant puissant qui modifie les protéines en formant du 3-nitrotyrosine. L'activité NO-synthase est aussi augmentée par l'hypoxie dans les tubules proximaux de rat fraîchement isolés, et les dommages à la membrane sont aussi augmentés quand la L-arginine est ajoutée à la suspension de tubule hypoxique [84]. En outre, le NO a le potentiel de perturber le cytosquelette actif, conduisant au détachement des cellules tubulaires proximales et à l'obstruction tubulaire. Par conséquent, bien que la production accrue de NO par la NO synthase inductible pourrait atténuer les lésions rénales en favorisant la vasodilatation, la majorité des études suggère un rôle négatif du NO dans ce cadre par l'activation de lésions induites par les radicaux oxygénés [69].

## 4. Les systèmes de défense antioxydants

Les effets potentiellement délétères des espèces radicalaires sont contrôlés par la présence de systèmes antioxydants cellulaires tels que la Superoxyde dismutase (SOD), la catalase ou encore la glutathion peroxydase (GPx). Ces systèmes permettent de piéger les EOR pour produire des molécules moins délétères pour les cellules.

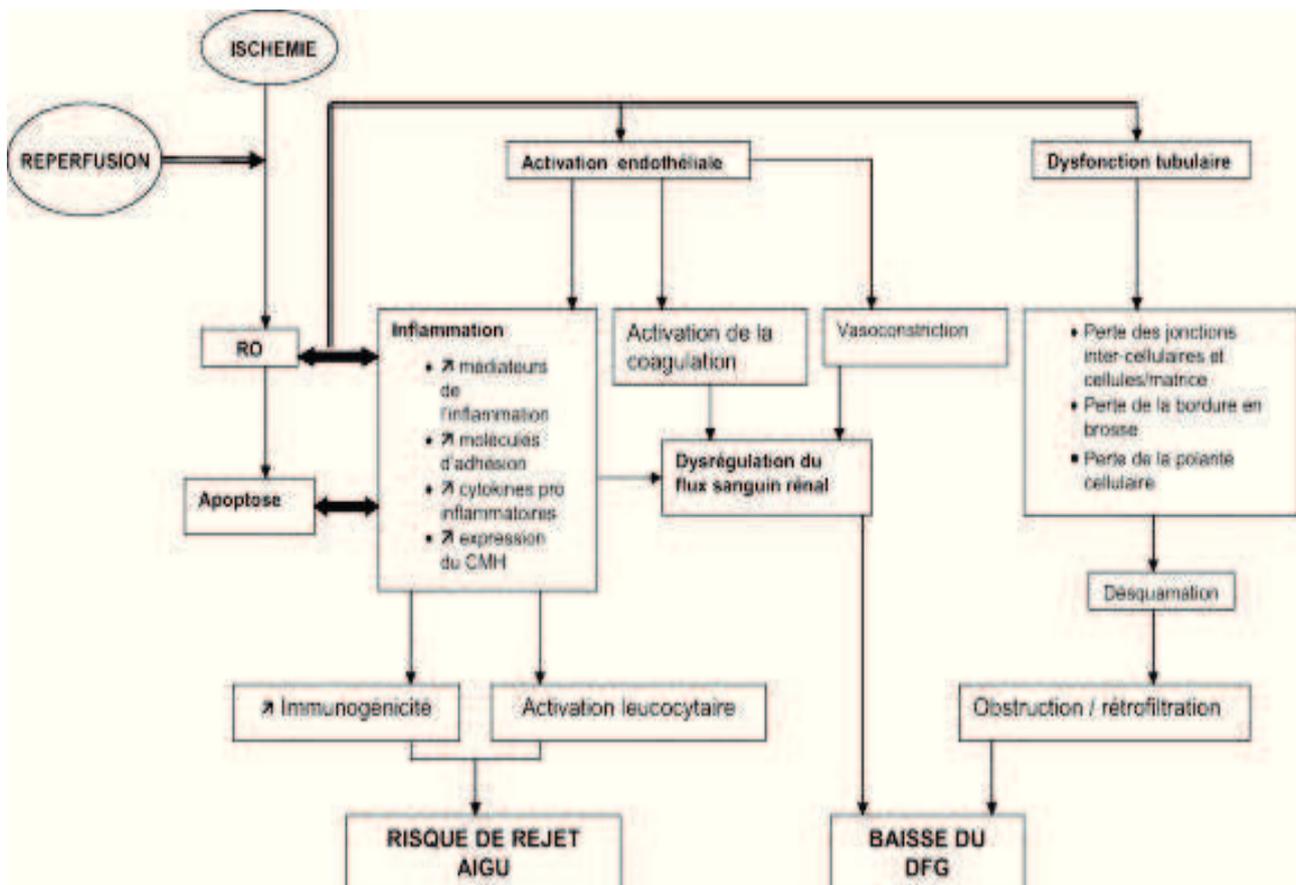
Il existe trois types de SOD ayant des localisations différentes, la SOD cytoplasmique dimérique à cuivre et zinc (Cu-Zn SOD ou SOD1), la SOD mitochondriale tétramérique à manganèse (Mn-SOD ou SOD2) et la SOD extracellulaire tétramérique à cuivre et zinc (Cu-Zn SOD ou SOD3). Ce sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) empêchant ainsi la coexistence de ces deux espèces radicalaires, et par conséquent

la génération du radical hydroxyle. L'action de la SOD doit toutefois être couplée à celle d'enzymes qui dégradent le peroxyde d'hydrogène, telles que les catalases ou les GPx, afin d'éviter l'augmentation des concentrations en  $H_2O_2$ , qui induirait la formation de radical hydroxyle en présence de fer. La catalase permet de transformer l' $H_2O_2$ , en oxygène moléculaire et en eau. La GPx permet de réduire l' $H_2O_2$ , en eau, grâce à la présence de glutathion réduit.

Alors que des périodes d'ischémie, qu'elles soient courtes ou prolongées, mènent à l'altération du transport des électrons à travers les différents complexes de la chaîne respiratoire, une période d'ischémie prolongée entraîne une altération de l'efficacité des systèmes de défense antioxydants des cellules [80]. Lors de la conservation, il a été décrit une diminution de l'expression de la Mn-SOD, malgré que ceci soit controversé [85, 86].

## C. La phase de reperfusion

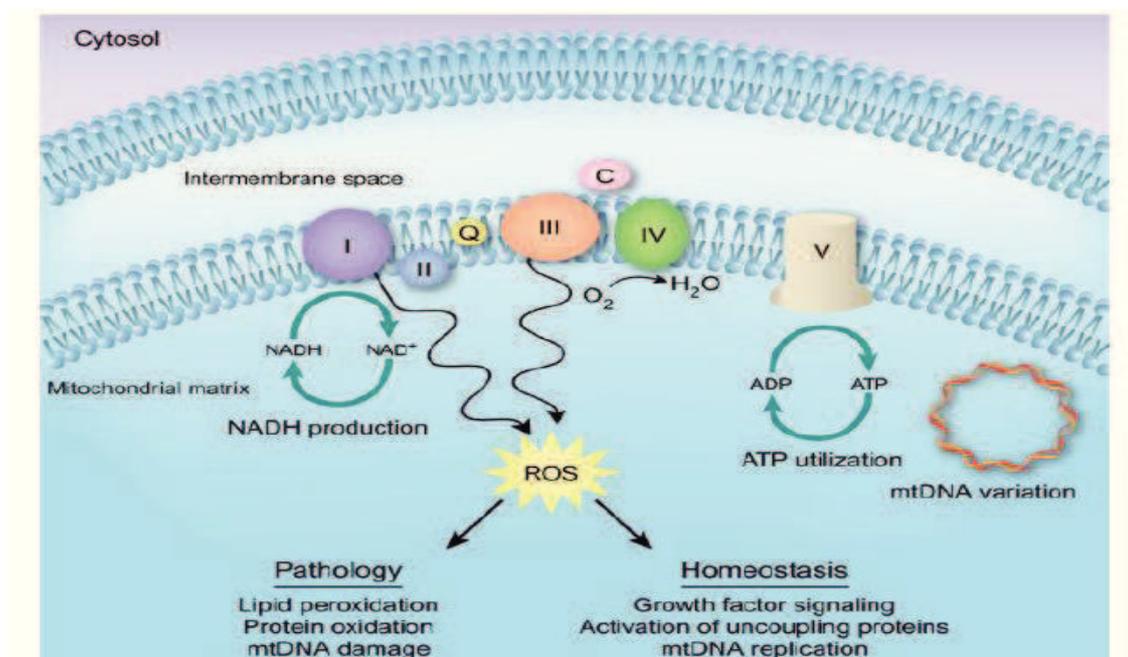
La reperfusion est définie comme la restauration de la circulation sanguine et donc de l'apport en oxygène et en nutriments au tissu ou à l'organe. Ceux-ci, endommagés par l'ischémie, sont alors le site de l'activation d'une séquence d'événements qui accentuent les lésions (Figure 10) et, dans le cas du rein, jouent un rôle pivot dans le développement de la reprise retardée de fonction du greffon. La reperfusion produit un réchauffement, une réoxygénation, un retour au métabolisme anaérobie et une production d'ATP. Cette phase est caractérisée par la mise en place d'un processus inflammatoire, une explosion du stress oxydant lié à la réintroduction brutale d'oxygène ainsi que le développement des voies d'adaptation à l'hypoxie. La réapparition du flux sanguin au niveau des vaisseaux et de l'organe ischémié induit une activation de l'endothélium vasculaire, engendrant une augmentation du recrutement des cellules inflammatoires au niveau des sites lésionnels.



**Figure 10 :** Extension des lésions d'ischémie lors de la reperfusion et ses conséquences [87].

## 1. Le stress oxydant

Paradoxalement, bien que la réoxygénation soit nécessaire, elle conduit à des effets délétères initiés lors de l'ischémie. En effet, l'afflux brutal d'oxygène, qui a lieu lors la reperfusion, va entraîner une explosion du stress oxydant dépassant largement les capacités des systèmes antioxydants cellulaires tels que la SOD ou le glutathion, considéré comme le tampon oxydo-réducteur cellulaire majeur. L'accumulation des électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale au moment de l'ischémie est un des mécanismes responsables de cet état pro-oxydant. Lors de la reperfusion et notamment de la réintroduction de l'oxygène, ces équivalents réducteurs vont s'échapper des complexes mitochondriaux I et III pour partiellement réduire l'oxygène et ainsi former des espèces réactives de l'oxygène (Figure 11). Dans les conditions physiologiques, le dioxygène est tétra réduit de façon progressive en eau, au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, par l'apport de quatre électrons. Lors de la reperfusion, la réduction partielle de l'oxygène conduit à la production massive d'espèces qui ont un caractère oxydant et sont de surcroît très réactives tels que l'anion superoxyde, qui pourra oxyder directement les composants des macromolécules biologiques, ainsi que d'autres EOR plus toxiques, non limités par les systèmes anti-oxydants submergés. De plus, les dommages causés à l'intégrité de la mitochondrie lors de l'IR et notamment au complexe V vont entraîner un défaut de production d'ATP même en présence d'oxygène [80].



**Figure 11 :** Schéma de la production d'EOR, au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale [88].

« Un second mécanisme est celui qui fait intervenir le complexe xanthine oxydase/déshydrogénase. A l'état physiologique, cette enzyme sous la forme xanthine déshydrogénase catalyse la réaction de métabolisation de l'hypoxanthine en xanthine et de xanthine en acide urique en utilisant comme accepteur d'électron le cofacteur  $\text{NAD}^+$ . Au cours de la phase d'ischémie, l'ATP est progressivement dégradé en hypoxanthine, tandis que l'augmentation de calcium cytosolique active des protéases calcium-dépendantes qui convertissent la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase. Cette enzyme catalysera la formation d'acide urique à partir de l'hypoxanthine en utilisant l'oxygène comme accepteur d'électron produisant de l'anion superoxyde qui sera à l'origine de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  grâce à une réaction catalysée par les SOD. Cette espèce partiellement réduite de l'oxygène va réagir avec l' $\text{O}_2^-$  par la réaction de Fenton Haber Weiss, facilitée par la disponibilité accrue de fer libre lors de l'ischémie, pour former le radical hydroxyle connu pour être l'espèce radicalaire de l'oxygène la plus cytotoxique pouvant être à l'origine de l'oxydation des constituants cellulaires. Simultanément, la production concomitante d'anion superoxyde et de monoxyde d'azote conduit à la production d'ion peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) possédant des propriétés cytotoxiques. La disponibilité du monoxyde d'azote est alors réduite, participant à une élévation du tonus vasomoteur.» [9]

Lors de la reperfusion, l'infiltration leucocytaire au niveau des tissus lésés est également responsable de la production d'EOR. En effet, ces neutrophiles et monocytes présentent à leur surface la NADPH oxydase, un complexe enzymatique dont les protéines cytosoliques et membranaires vont s'assembler lors d'une activation cellulaire comme l'IR [89, 90]. La NADPH oxydase activée va être capable d'oxyder le NADPH présent à l'intérieur des cellules et réduire, suite à un transfert d'électrons, l' $\text{O}_2$  en  $\text{O}_2^-$ , qui sera libéré au niveau du site lésé.

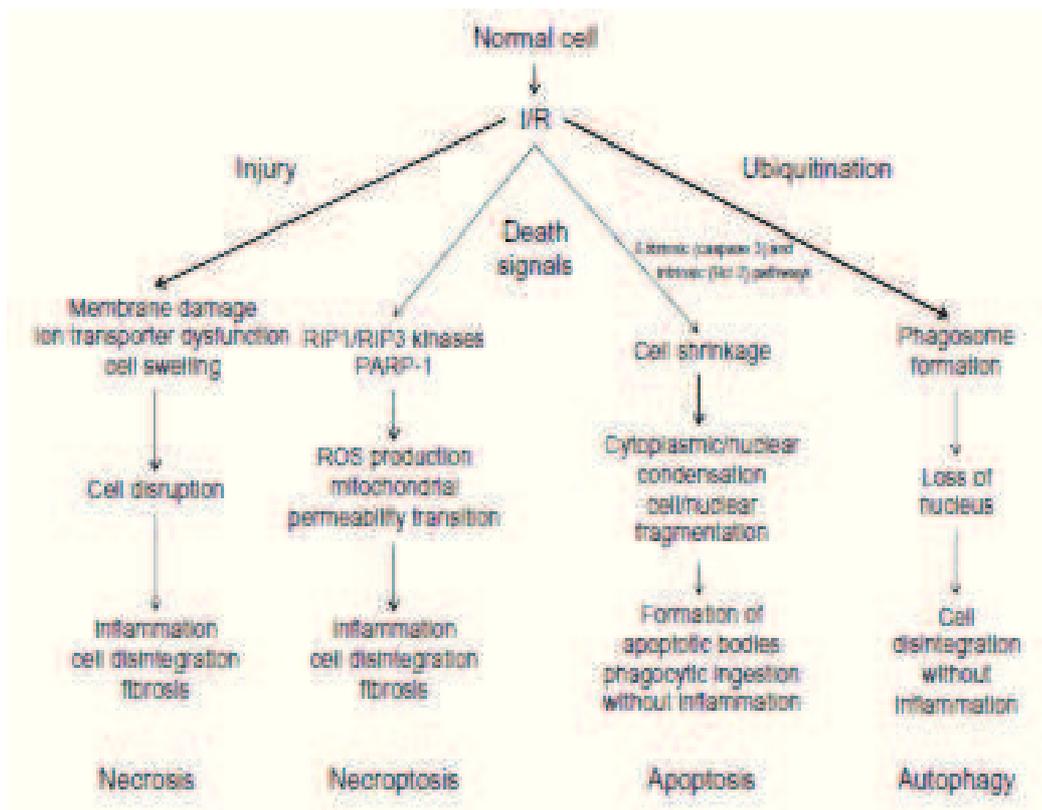
Le stress oxydant et les défenses anti-oxydantes ont donc un rôle prépondérant dans le développement précoce des lésions d'IR.

## **2. Initiation de la mort cellulaire**

Pendant de nombreuses années, la communauté scientifique pensait que la mort cellulaire induite par l'IR se produisait par des facteurs extrinsèques tels que la perte des ressources énergétique, l'élaboration de médiateurs inflammatoires et des molécules toxiques, et une lésion mécanique, un mode de mort cellulaire appelée nécrose (oncosé). Cependant, il est maintenant reconnu que les cellules peuvent également être programmées pour mourir par mécanismes de signalisation cellulaire via les processus d'apoptose [91] et de l'autophagie [92].

En outre, un nouvel ensemble de preuves indique que les événements apparemment aléatoires et incontrôlés associés à une nécrose peuvent, dans certaines circonstances, effectivement impliquer la mobilisation et la coordination des mécanismes de signalisation spécifiques d'une quatrième voie de mort appelé nécrose programmée ou nécroptose (Figure 12). Chacun de ces types morphologiquement distinctes de la mort cellulaire semblent donc contribuer d'une certaine manière à la pathogenèse des lésions de l'IR [93].

Les travaux de Salahudeen et coll. dans un modèle de cellules tubulaires proximales humaines ont montré que la nécrose était initiée lors la conservation hypothermique et se prolongeait au cours de la réoxygénation et du réchauffement des cellules [94], tandis que l'apoptose était un processus spécifique lié à la phase de réchauffement des cellules, démontré par l'absence de cellules TUNEL ou annexine-V positives, deux marquages spécifiques des cellules apoptotiques, dans un modèle de conservation hypothermique cellulaire.



**Figure 12 :** Mécanismes de mort cellulaire induits lors de l'IR [93].

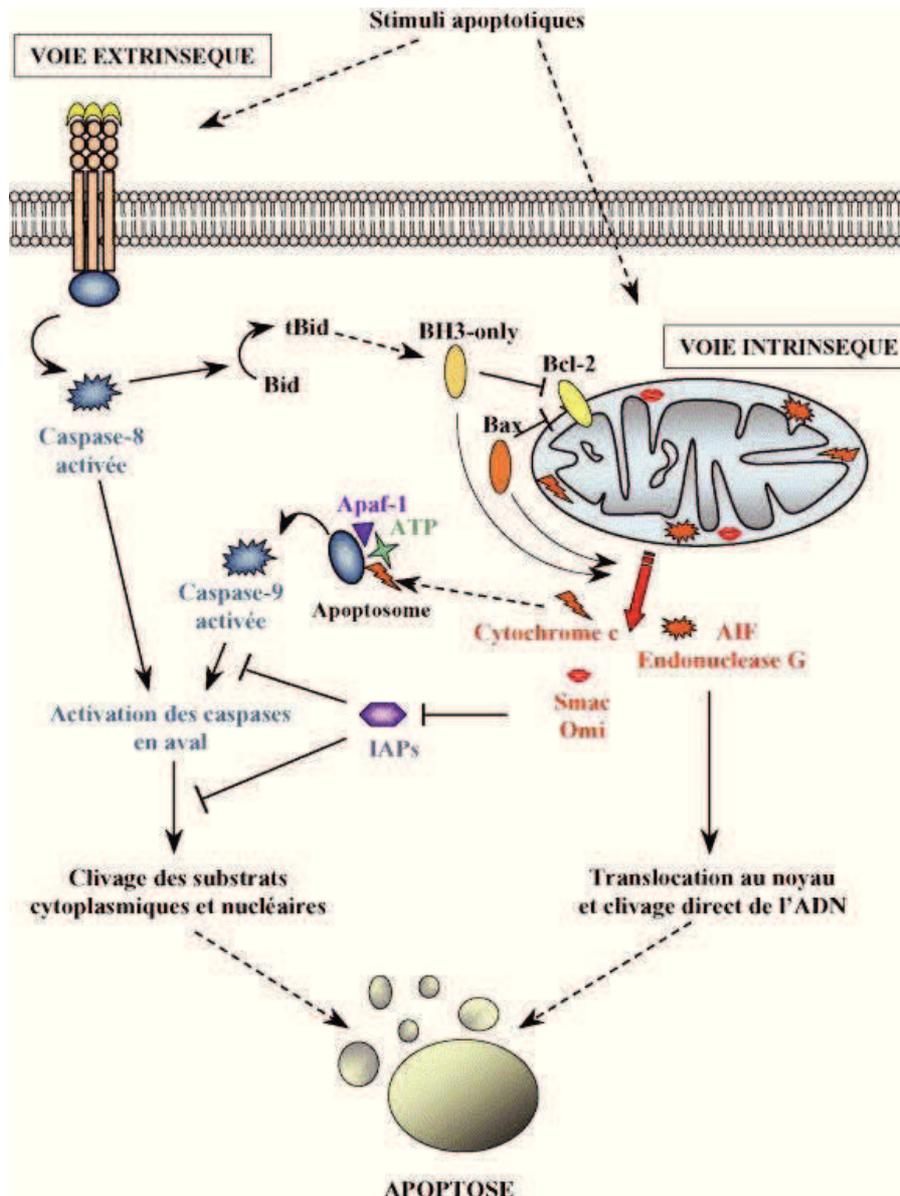
## 6.1. L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus intracellulaire régulé, déclenché par la libération de protéines mitochondriales qui orchestrent une cascade d'activation protéique aboutissant au rétrécissement de la cellule et de son noyau, avec une persistance de l'intégrité de la membrane plasmatique jusque tard dans le processus. De plus, l'apoptose est un processus actif, la formation de l'apoptosome étant ATP-dépendante, contrairement à la nécrose [95].

Les mécanismes apoptotiques sont canoniquement divisés en voies «extrinsèques» et «intrinsèques».

La voie «extrinsèque» implique l'activation de récepteurs tels que les récepteurs Fas, TNF, et TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Lors de la reperfusion, l'augmentation de la production de TNF $\alpha$  permet sa fixation sur ces récepteurs conduisant à leur trimérisation et le recrutement d'un certain nombre de protéines contenant des domaines de mort (Death Domain) telles que FADD (Fas-associated death domain) et TRADD (TNF receptor type 1-associated death domain protein), molécules adaptatrices capables de recruter la pro-caspase 8. Le complexe oligomérique de mort, appelé DISC (Death-inducing signaling complex) et formé par le récepteur TNF, FADD et la pro-caspase 8, capable d'activer la caspase 8, activant à son tour les caspases effectrices 3 et 7 [96].

En ce qui concerne la voie «intrinsèque», la séquence d'IR induit la translocation et l'intégration des membres pro-mort de la famille de protéine Bcl2 (par exemple, Bax, Bak) dans la membrane externe de la mitochondrie [97]. Ces protéines, par un mécanisme qui reste encore controversée, perméabilisent la membrane externe, permettant ainsi la libération de protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire, notamment le cytochrome c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, et l'endonucléase G (Figure 13). Le cytochrome c interagit avec la protéine cytosolique Apaf1 (Apoptotic protease activating factor 1), formant ainsi, en présence d'ATP, un complexe multiprotéique appelé apoptosome, capable d'activer la caspase 9 entraînant l'activation finale de la caspase 3, une protéase qui agit comme exécuteur de la cellule par protéolyse de nombreuses protéines cellulaires. Smac /DIABLO et Omi/HtrA2 activent les caspases en séquestrant ou en digérant les protéines inhibitrices des caspases, respectivement, alors que l'endonucléase G médie la fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) [93].



**Figure 13 :** Voies d'activation «extrinsèque» et «intrinsèque» des caspases au cours de l'apoptose [98].

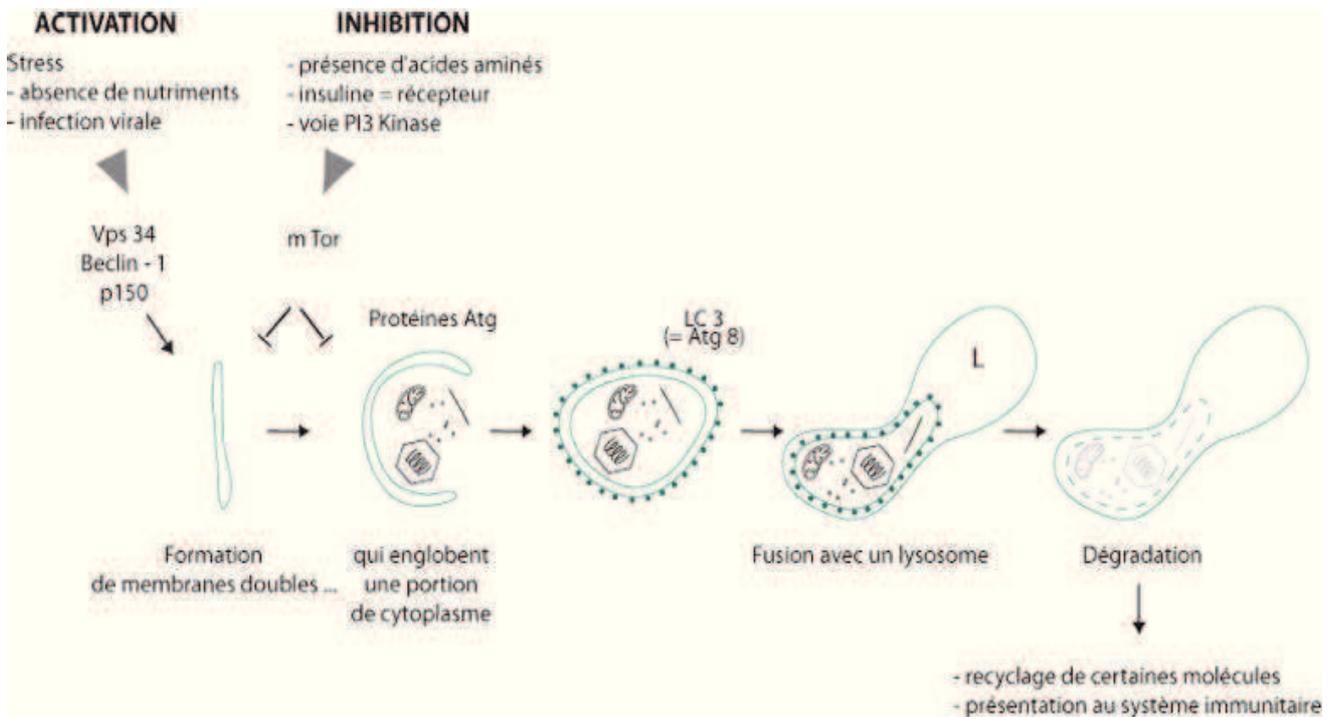
## 6.2. L'autophagie

L'autophagie est le mécanisme principal de la cellule permettant l'élimination par ses propres lysosomes des organites obsolètes ou endommagés et des agrégats de protéines. C'est aussi un mécanisme de survie cellulaire permettant de résister à des conditions de stress, telles que la carence en nutriments, l'hypoxie, la dysfonction mitochondriale, et l'infection par recyclage des constituants cellulaires, tels que les acides aminés et les acides gras, afin de maintenir la fonction des cellules.

Ainsi, l'autophagie est en fait un mécanisme de survie cellulaire plutôt qu'un processus de mort cellulaire. Cependant, l'autophagie incontrôlée mène finalement à la mort de la cellule et peut

contribuer aux lésions d'IR. Morphologiquement l'autophagie commence avec l'expansion d'une membrane d'isolement, ou phagophore, autour de l'organelle à traiter. La membrane enveloppe ensuite complètement les constituants pour former l'autophagosome vésiculaire, qui fusionne ensuite avec un lysosome et les matériaux séquestrés sont dégradés.

Comme l'apoptose, l'autophagie est strictement réglementée et est médiée par des voies spécifiques. Le contrôleur principal est mTOR (*mamalian Target Of Rapamycin*), qui inhibe l'autophagie. Cependant, dans des conditions de privation en éléments nutritifs ou de stress, mTOR est inactivé. Ceci déréprime une autre kinase appelée Atg (autophagy-related gene) 1 qui, avec Atg13 et Atg17, amorce la formation du phagophore. La formation du phagophore est en outre facilitée par un autre complexe constitué d'une phosphoinositide 3-kinase (PI3K) de classe III (PIK3C3; aussi appelée vps34), vps15 (p150) et beclin-1 (Figure 14). Ce complexe, à son tour, recrute Atg12, Atg5 et Atg8 (également appelé LC3), qui sont essentielles pour l'allongement de la membrane et l'achèvement de l'autophagosome. Maintenant terminée, la fusion de l'autophagosome vers le lysosome est médiée par la petite GTPase Rab7 et la protéine membranaire lysosomale LAMP2 (Lysosomal-associated membrane protein 2) [93].



**Figure 14 :** Schéma représentant l'activation et l'inhibition de l'autophagosome lors de l'autophagie [99]

### 6.3. La nécrose

Lors de l'ischémie, le mécanisme majeur entraînant le mort cellulaire est la nécrose [100]. La nécrose est caractérisée morphologiquement par un gonflement des cellules et de leurs organites constitutifs, une dysfonction mitochondriale, une fragmentation de la chromatine, une rupture de la membrane plasmique, et une libération du contenu intracellulaire cytoplasmique dans le milieu extérieur, à l'origine d'un processus inflammatoire local. Contrairement à la nature programmée de l'apoptose et de l'autophagie, la nécrose était considérée comme se produisant par hasard, un processus incontrôlés qui conduit à la mort «accidentelle» de la cellule en réponse à un stress important.

Cependant, un concept de nécrose programmée, également appelée nécroptose, en particulier dans des conditions telles que l'IR, commence à prendre forme. Plus précisément, il est maintenant connu que le stress cellulaire ou l'activation des récepteurs de mort mobilise et active un groupe de sérine / thréonine kinases appelées RIPs ('receptor-interacting proteins'). En particulier, RIP1 et RIP3 semblent agir dans la coordination en tant que médiateurs de nécrose.

L'activation de RIP 1 et 3 conduit, à son tour, à l'augmentation de la production d'EOR soit par l'activation de la NADPH oxydase, soit par l'augmentation de la production d'oxydants mitochondriaux selon le type de cellule.

La conclusion selon laquelle necrostatin-1 (un petit composé à base de tryptophane identifiée par criblage d'une banque chimique d'environ 15 000 composés pour leur capacité à inhiber la mort cellulaire invoqué par TNF $\alpha$  en présence de zVAD.fmk) réduit la mort cellulaire nécrotique induite par TNF $\alpha$  à travers l'inhibition de l'activité kinase de RIP1 soutient le concept de nécrose induite par les récepteurs via un processus cellulaire contrôlé [93].

Une des cibles mitochondriale potentielles pour la nécrose médiée par RIP est le pore de transition mitochondrial (PTM) une structure à l'existence encore controversée qui jouerait un rôle critique dans la progression de la mort cellulaire en réponse à une IR. Le PTM serait un grand canal non spécifique localisé dans la membrane interne mitochondriale. Inhibée à faible pH, le PTM est maintenu au repos durant l'ischémie. Toutefois, lors de la reperfusion, la production excessive d'EOR associée à la surcharge de Ca<sup>2+</sup> de la matrice mitochondriale, provoqueraient l'ouverture du PTM. Cette augmentation soudaine de la perméabilité de la membrane interne dissiperait le gradient électrochimique de proton ( $\Delta\Psi_m$ ), conduisant à la déplétion en ATP, ainsi qu'à une production d'EOR supplémentaire, et, finalement, au gonflement et la rupture de la mitochondrie conduisant à l'activation des voies pro-apoptotiques. Bien que proposé à l'origine comme médiateur de l'apoptose, des études génétiques récentes ont suggéré que le PTM est principalement impliqué dans la nécrose.

Une troisième voie de nécrose potentielle implique l'activation de l'enzyme de réparation de l'ADN PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymerase-1). Un stress génotoxique tel qu'induisent les agents oxydants et alkylants conduit à une hyperstimulation de PARP-1 qui active la cystéine protéase calpaïne qui stimule, à son tour, la libération de AIF (apoptosis-inducing factor) à partir de la mitochondrie, où il transloque vers le noyau et dégrade l'ADN. L'interaction avec d'autres mécanismes tels que ceux des kinases RIP et celui du PTM n'est pas clair à ce stade, mais il a été montré que la mort cellulaire médiée par PARP-1 peut être dépendante de RIP1 [93].

## D. L'activation vasculaire, l'inflammation et la réponse immunitaire innée et adaptative

L'inflammation induite par l'IR est appelée inflammation stérile car elle se produit généralement en l'absence de micro-organismes. Similaire à la réponse aux agents pathogènes, l'inflammation stérile induite par l'IR est caractérisée par un recrutement marqué des neutrophiles et la production de cytokines et de chimiokines, et d'autres stimuli pro-inflammatoires.

### 1. L'activation vasculaire

Il est depuis longtemps reconnu que l'endothélium, en particulier celui qui tapisse la paroi microvasculaire, n'est pas simplement une interface passive entre la circulation et l'espace extravasculaire, mais plutôt un organe dynamique et actif qui joue un rôle crucial dans l'homéostasie vasculaire. L'IR produit un dysfonctionnement des grandes fonctions endothéliales, compromettant la régulation des propriétés de barrière vasculaires, le contrôle de l'adhérence et du trafic extra-vasculaire des cellules effectrices inflammatoires/immunitaires.

Les cellules endothéliales sont disposées dans une mono-couche qui constitue une barrière efficace entre le sang et les tissus sous-jacents. L'intégrité de la barrière endothéliale dépend des complexes de jonction intercellulaire entre les cellules endothéliales adjacentes. Les complexes jonctionnels, ainsi que leurs liens avec les éléments du cytosquelette, sont, à leur tour, régulés par les mécanismes de signalisation intracellulaires sensibles à des stimuli physiologiques/pathophysiologiques, par exemple, les EOR, les cytokines, les médiateurs lipidiques et les protéases. L'IR provoque la dissolution des deux jonctions, adhérentes et serrées, qui sont des complexes de jonction endothéliales majeurs médiant la perméabilité paracellulaire. La libération post-ischémique de médiateurs pro-inflammatoires variés, en particulier ceux qui sont libérés par les leucocytes migrant et/ou adhérent incluant les EOR, les cytokines, les chimiokines telles que RANTES, les protéases, les facteurs de faible poids moléculaire (histamine, PAF et le LTB<sub>4</sub>) et les facteurs de croissance, va induire la phosphorylation des composants de jonction, leur internalisation et/ou leur dégradation, et donc, la dissolution de jonctions intercellulaires [93].

## 2. Les TLRs et les signaux Danger

La réponse inflammatoire lors des lésions ou de la mort cellulaire présente de nombreuses similitudes avec celle observée au cours des infections microbiennes. En particulier, les récepteurs de l'hôte qui interviennent dans la réponse aux micro-organismes sont impliqués dans l'activation de l'inflammation stérile lors de l'ischémie et de la reperfusion. Les ligands se liant aux « Tolls-Like » Récepteurs (TLRs) conduisent à l'activation des voies de signalisation, incluant la voie du NF- $\kappa$ B, des MAPK (mitogen-activated protein kinase) et de l'interféron de type 1, l'activation cellulaire et la production de cytokines pro-inflammatoire [101]. Bien que vital pour la défense de l'hôte contre les infections par des agents pathogènes, le système immunitaire inné peut également être activé pendant les conditions inflammatoires stériles telles que l'IR, où les cellules endommagées libèrent de l'ATP, des protéines HMGB1 (high mobility group box 1), des protéines de choc thermique, des protéines S100, entre autres, qui sont collectivement appelés DAMPs (damage-associated molecular patterns). Selon ce nouveau corpus de preuves, le système immunitaire réagit à des signaux de danger ou d'alarme libérés par les tissus endommagés, par opposition à la vision classique de la reconnaissance du non-soi.

Ce nouveau modèle d'activation du système immunitaire a été initialement proposé et nommé modèle Danger par Matzinger P. [102, 103].

Les stimuli stériles, en particulier les DAMPs, sont généralement des facteurs intracellulaires qui sont normalement séquestrés et de ce fait cachés de la reconnaissance du système immunitaire. Toutefois, lors de dommages tissulaires, les DAMPs sont libérés dans l'espace extracellulaire lorsque la membrane cellulaire se rompt et provoquent une réponse inflammatoire.

La formation d'EOR, la libération et l'activation des enzymes hydrolytiques, la déstabilisation des membranes lysosomales et la modification des flux ioniques accompagnent la mort cellulaire nécrotique et conduisent à l'activation des voies inflammatoires en plus de la libération des DAMPs. Des travaux récents indiquent que la libération d'ATP intracellulaire par les cellules nécrotiques active l'inflammasome Nlrp3, qui induit à son tour l'adhésion des neutrophiles. Les gradients de chimiokines intravasculaires guident la migration des neutrophiles en roulement le long des veinules, à travers les tissus sains au site endommagé, par des formyl-peptides libérés par les cellules nécrotiques [93].

Les cellules épithéliales rénales expriment les récepteurs TLR2 et TLR4 dont l'expression est augmentée en réponse à l'IR [104-108]. L'activation de TLR4 peut être renforcée par le stress oxydatif, qui est généré par l'IR et est connu pour initier les cellules inflammatoires à réagir de façon plus

importante aux stimuli subséquents. Le traitement à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des macrophages en culture provoque de façon similaire une augmentation de l'expression de TLR4 à leur surface. De plus, une étude de patients ayant subi une greffe rénale a révélé un rôle néfaste de la signalisation de TLR4 dans la perte précoce du greffon. En effet, les ligands endogènes de TLR4 tels que HMGB1 et biglycan sont induits lors de la transplantation rénale chez l'Homme, soutenant ainsi un rôle pour TLR4 dans l'inflammation stérile dans le rein. Dans ce sens, une étude a montré que les reins provenant d'individus présentant une perte de fonction de l'allèle de TLR4 (de même qu'évalué par diminution de l'affinité de TLR4 pour son ligand HMGB1) présentaient des niveaux plus faibles de cytokines pro-inflammatoires en association avec des taux importants de reprise de fonction immédiate après transplantation.

L'expression de TLR2 sur l'épithélium est induite par l'hypoxie ou l'inflammation. La voie de signalisation de TLR2 contribue au développement des lésions rénales aiguës et à l'inflammation durant l'ischémie et la reperfusion par des mécanismes dépendants et indépendants de MyD88, molécule adaptatrice impliquée dans la voie de signalisation médiée par l'IL1 [109, 110]. L'inhibition de TLR2 dans un modèle murin d'IR chez la souris entraîne une protection vis-à-vis des lésions induites par l'IR et du développement de la fibrose, contrairement aux souris avec un génotype sauvage [111]. Dans cette étude, les lésions rénales provoquées par la néphropathie obstructive ont conduit à l'activation de TLR2 entraînant une production de chimiokines et de cytokines telles que MCP-1, IL1  $\beta$  et IL6.

Le résultat final de l'interaction complexe entre les radicaux oxygénés réactifs, les chimiokines et cytokines, les facteurs du complément, les récepteurs d'adhésion, et les leucocytes est un processus inflammatoire qui endommage les cellules épithéliales rénales, en particulier celles du tubule proximal. Ces mécanismes pourraient altérer la fonction rénale au-delà des lésions associées à l'ischémie elle-même.

### **3. La réponse immunitaire innée**

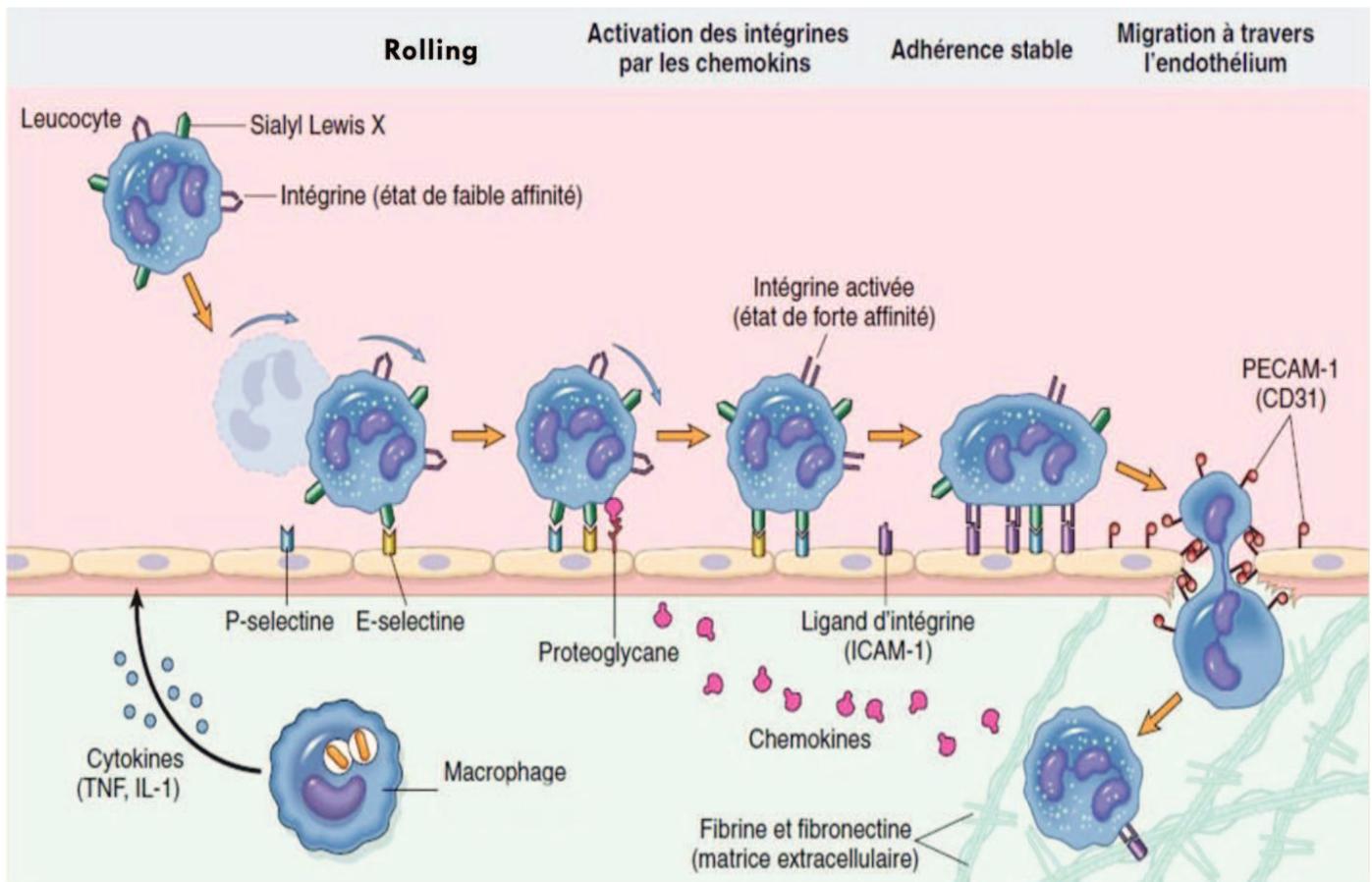
Une caractéristique de l'inflammation induite par l'IR est l'infiltration des PMN (polymorphonuclear neutrophils) dans le tissu. Les cellules endothéliales jouent un rôle central dans ce processus, contrôlant un continuum complexe d'événements comprenant le recrutement local des leucocytes et leur activation, leur adhérence et leur passage à travers l'endothélium, suivi de leur extravasation à travers la paroi vasculaire. En effet, suite à l'IR les cellules endothéliales lésées libèrent alors des cytokines pro-inflammatoires (comme le TNF $\alpha$  ou l'interleukine 1 (IL1)  $\beta$ ) et des

chimiokines, et augmentent l'expression des molécules d'adhérence, qui régulent le trafic des leucocytes circulants depuis le compartiment sanguin vers le compartiment tissulaire [112, 113].

Suite à une séquence d'IR, cette infiltration non spécifique des cellules de l'immunité innée telles que les polynucléaires neutrophiles et les monocytes se produit directement au niveau des sites lésionnels [114-117].

Après le « rolling » initial des leucocytes sur l'endothélium activé, leurs récepteurs interagissent avec les récepteurs d'adhésion présents sur les cellules endothéliales, conduisant à leur immobilisation sur l'endothélium et la diapédèse à travers la paroi du vaisseau (Figure 15)[118].

À chaque étape de ce processus, interviennent différentes molécules d'adhérence membranaire. Les sélectines (E- et P-sélectine) sont des glycoprotéines transmembranaires impliquées dans des interactions faibles entre les cellules endothéliales et leurs ligands spécifiques qui se trouvent entre autre à la surface des leucocytes. Ces faibles interactions, combinées au flux sanguin, résultent en un mouvement de roulement ou « rolling » des leucocytes à la surface de l'endothélium. Cependant, au site de l'inflammation, les cellules endothéliales relarguent des chimiokines. Ces molécules ont pour rôle d'immobiliser les leucocytes roulants et de favoriser leur traversée de l'endothélium. Pour cela elles activent, grâce à un signal intracellulaire, les intégrines, autres molécules d'adhérence présentes à la surface des leucocytes. Les  $\beta 2$  intégrines sont également des glycoprotéines transmembranaires présentes au niveau des neutrophiles, peuvent être stimulée par les EOR. Les  $\beta 2$ -intégrines peuvent interagir avec les molécules présentes à la surface de l'endothélium qui font partie de la sous-famille des immunoglobulines, comme ICAM-1 et VCAM, auxquelles s'ajoute PECAM-1 (Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) au moment de la diapédèse [96]. Les études sur le foie, le cerveau, le myocarde et les reins montrent qu'ICAM1 est surexprimé lors des lésions d'IR et que les anticorps contre ICAM1 empêchent les dommages tissulaires et protègent la fonction de l'organe. De plus, chez le rat, l'inhibition de l'expression d'ICAM1 avec un désoxynucléotides antisens protège contre les lésions d'IR rénales [69]. Cette interaction plus forte va ainsi provoquer une immobilisation totale du leucocyte. En se déformant, celui-ci migre vers le tissu en passant entre les cellules endothéliales. Il s'agit un phénomène complexe dans lequel intervient la séparation des ponts unissant les cadhérines, au niveau des jonctions serrées.



**Figure 15 :** Représentation schématique des étapes de recrutement, d'adhésion et de diapédèse des leucocytes au niveau de l'endothélium vasculaire [119].

Suite à leur extravasation à travers la paroi vasculaire, les PMNs participent à l'élimination des débris cellulaires par phagocytose et entraînent la production d'un arsenal de composés capables d'induire des dommages cellulaires tel que des enzymes protéolytiques, l'anion superoxyde, la myéloperoxydase, ainsi que des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires. La meilleure preuve du rôle de ces phagocytes inflammatoires dans l'IR provient d'études utilisant des stratégies d'épuisement des neutrophiles ou de prévention de leur adhésion à l'endothélium, par l'utilisation d'anticorps immunoneutralisants dirigés contre les molécules d'adhésion ou de souris génétiquement déficientes en molécules d'adhésion [120]. Bien que la primauté des neutrophiles dans le processus soit actuellement le point de vue consensuel, des études récentes ont souligné le rôle potentiel jusqu'ici sous-estimé des autres cellules inflammatoires telles que les macrophages, les lymphocytes, les mastocytes et les plaquettes dans la modulation du recrutement des neutrophiles et leur traitement. L'extravasation des leucocytes adhérents à travers la paroi vasculaire est moins bien comprise et est, actuellement, l'objet de recherche intense [121]. La diapédèse peut se produire par le mouvement

paracellulaire entre les cellules endothéliales adjacentes ou par le mouvement transcellulaire à travers les cellules endothéliales individuels [122]. Dès l'adhésion, le leucocyte modifie sa morphologie, évoluant d'une morphologie sphérique à aplatie (ce qui permet à la cellule adhérente à mieux résister aux effets anti-adhésion imposés par le flux sanguin), subissant une polarisation directionnelle, avec une redistribution de la signalisation, de l'adhésion, du cytosquelette et des protéines des récepteurs vers un bord d'attaque à partir duquel s'étendent les processus, obligeant les leucocytes à «ramper» le long de l'endothélium vers des sites qui permettent la diapédèse. Des travaux récents ont montré que les péricytes et les protéines jonctionnelles, JAM-A, JAM-C, et PECAM-1, facilitent la migration des neutrophiles *in vivo* [121-124]. De plus, un facteur déterminant d'un site approprié pour l'infiltration des neutrophiles peut être un gradient de signaux chimiotactiques provenant de cellules endommagées et mourantes qui servent de guide pour permettre le recrutement intravasculaire des leucocytes strictement aux foyers de la lésion avant qu'ils ne soient autorisés à la diapédèse [125]. Une fois recrutée au niveau du tissu, les PMN sécrètent un grand nombre de facteurs connus pour contribuer à une lésion tissulaire. Ceci inclut des EOR (le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et l'acide hypochloreux), des cytokines, des chimiokines et comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12, l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$  et des « monocyte chemotactic protein-1 » (MCP-1), les protéases, par exemple, l'élastase et la collagénase et des médiateurs lipidiques tels que LTB4 [93, 126].

Les macrophages sont attirés par les facteurs chimiotactiques sécrétés par les neutrophiles ou l'endothélium, entraînant leur recrutement précoce sur le site lésé où ils vont phagocyter les débris cellulaires et les neutrophiles sénescents [127]. Ces cellules, qui expriment ED1, sont également attirées par MCP-1 produit par les cellules épithéliales rénales endommagées [128]. Les macrophages peuvent également sécréter des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL1, IL6) responsables de l'augmentation des neutrophiles recrutés et de l'induction des processus apoptotiques. Néanmoins, les macrophages semblent avoir un double rôle : certaines études mettent en évidence leur rôle dans le développement de la fibrose rénale, alors que d'autres montrent qu'ils interviennent dans la phase de réparation rénale [129, 130].

#### **4. La réponse immunitaire adaptative**

L'ischémie et la reperfusion provoquent une forte réponse immunitaire adaptative impliquant le recrutement précoce sur le site tissulaire lésé des lymphocytes T [131-133], des lymphocytes NKT (Natural Killer T) ou encore des cellules dendritiques résidentes qui sont la principale source de TNF $\alpha$  suite à une phase d'IR [69, 117, 134, 135]. Les mécanismes par lesquels les cellules T antigène-spécifiques sont activées lors de l'inflammation stérile ne sont pas bien compris, mais de nouvelles

données indiquent une contribution à la fois des mécanismes d'activation spécifiques de l'antigène et de ceux indépendants de l'antigène. Plusieurs études ont montré que les lymphocytes T s'accumulent pendant l'ischémie et la reperfusion. Par exemple, les cellules T sont localisées à la zone limite de l'infarctus dans les 24h après reperfusion du cerveau ischémié. Elles s'accumulent entre 3 et 7 jours après la reperfusion puis leur nombre diminuent après 14 jours [136]. Suite à l'exposition à l'IR des cellules présentatrices d'antigène tels que les cellules dendritiques matures ou des macrophages, les lymphocytes T vont être stimulés par l'intermédiaire du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 2 et de signaux de co-stimulation délivrés à la cellule T par ces cellules. La stimulation des lymphocytes T va conduire à une phase d'expansion clonale et à leur différenciation par les lymphocytes T helper 1 (Th1) et T helper 2 (Th2). Les lymphocytes Th1 entraînent la mise en place d'une immunité à médiation cellulaire qui est associée à l'activation des monocytes/macrophages, des cellules NK et des lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Tandis que les lymphocytes Th2 conduisent à la mise en place d'une immunité à médiation humorale, favorisant la production d'anticorps spécifiques. Les cellules Th1 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, par exemple, IL-2, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , alors que les cellules Th2 sécrètent principalement des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13). Des études récentes chez des souris knock-out (KO) soumis à l'IR ont démontré le rôle délétère et protecteur des phénotypes de Th2 médié par Stat 6 et de Th1 médié par Stat 4. Bien qu'une hypothèse raisonnable est que l'équilibre relatif des cellules Th1/Th 2 sous-tend la pathogenèse des lésions d'IR, les rôles spécifiques des phénotypes endogènes Th1 et Th2 dans les lésions d'IR médié par les cellules T sont actuellement inconnus [93]. Les études sur des lignées de souris déficientes en population spécifique de lymphocytes ont montré que les cellules T, qu'elles soient CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>, jouent un rôle néfaste dans l'ischémie et la reperfusion du rein [137]. De plus, des souris KO en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont protégées après une ischémie rénale aiguë, tandis que les souris KO en lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ne le sont pas [138]. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> favorisent les lésions d'IR en augmentant le recrutement des neutrophiles et leur adhérence. La carence en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, par des stratégies de déplétion pharmacologiques, génétiques ou via des anticorps, résulte en la réduction du recrutement des neutrophiles et de l'association des lésions après l'IR. Le recrutement des neutrophiles médié par les cellules T a été attribué à la sécrétion d'IL-17 par lymphocytes T; mais d'autres facteurs dérivés des lymphocytes T, par exemple l'IL-1 ou le TNF $\alpha$ , jouent probablement aussi un rôle. La preuve d'un rôle indépendant des lymphocytes T dans les lésions d'IR a également été obtenue [93].

Ce mécanisme est incertain mais il a été attribué à l'engagement de molécules costimulatrices CD28 et B7, et à la sécrétion d'IFN $\gamma$ . De plus, les cellules T régulatrices ou lymphocytes T CD4<sup>+</sup>-CD25<sup>+</sup>

semblent aussi avoir un rôle dans l'IR, cette fois au niveau de la protection. Les cellules T régulatrices interviennent dans la prévention de l'auto-immunité, ainsi que dans la modulation des réponses immunitaires allogéniques lors de l'induction de la tolérance dans le cadre de la transplantation d'organes [139, 140]. En général, les actions de recrutement et de réparation des cellules Treg commencent 3-7 jours après l'agression [141-144]. La sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, semble servir de médiateur au moins en partie des effets protecteurs de cellules Treg [93, 141-144].

Des stratégies visant à améliorer la fonction des cellules T régulatrices suite à une séquence d'IR pourraient impliquer une stimulation de l'expression de FoxP3 (Forkhead Box P3), le facteur de transcription clef pour la différenciation des cellules T régulatrices. Des études antérieures ont montré que les niveaux de Foxp3 sont soumis à la régulation épigénétique [145]. En effet, les inhibiteurs pharmacologiques des histones/protéines déacetylases sont efficaces dans le traitement des maladies intestinales inflammatoires induites expérimentalement et dans l'amélioration de la survie du greffon cardiaque et de la transplantation d'îlots dans des modèles de souris grâce à une augmentation du nombre et de la fonction des cellules Treg [146]. Cependant, le rôle de ces cellules est mal connu concernant la transplantation d'organes solides. Une corrélation entre les lymphocytes T régulateurs et la survie des reins allo-greffés a été décrite [147]. A l'inverse, une étude récente a démontré une corrélation entre l'apparition de tubulite et de fibrose tubulo-interstitielle et la présence de cellules FoxP3 positives dans le greffon de patients allo-greffés ayant un antécédent de rejet aigu [148].

## E. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et la fibrose tubulo-interstitielle

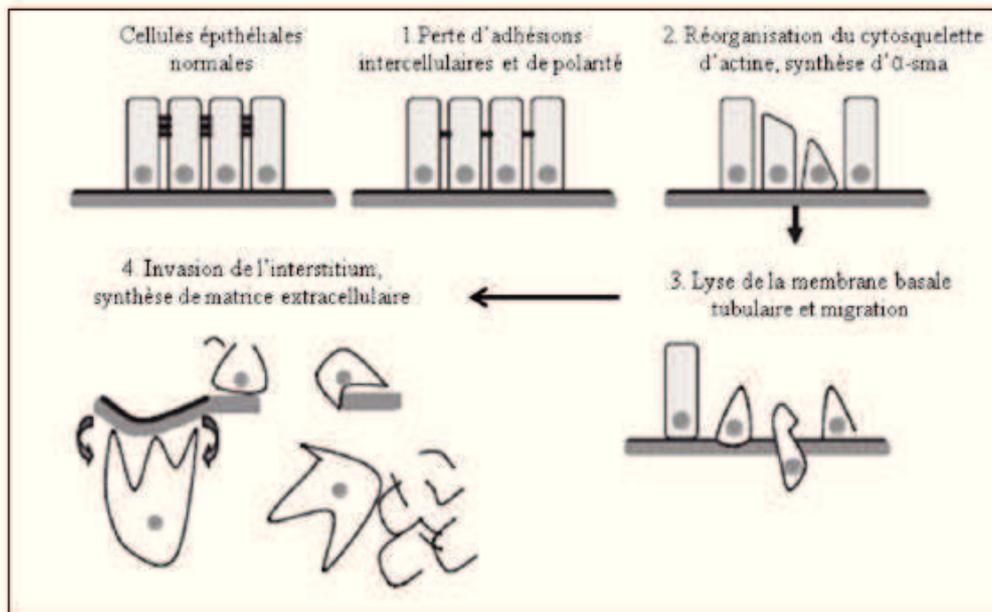
Les conséquences à long terme de l'IR sont intimement liées à la capacité de l'organe à réparer les lésions subies pendant la phase aigüe de ce processus. Comme décrit plus haut, un processus chronique de réponse immunitaire peut prendre place. Ce phénomène, ajouté à d'autres phénomènes lésionnels prenant place dans le greffon en souffrance chronique, dont certains restent à définir en détail, mène au développement de fibrose interstitielle, cicatrice prenant la place du tissu fonctionnel et diminuant la capacité de l'organe à remplir ses fonctions. En effet, la réparation d'un tissu à la suite d'une agression immunologique, infectieuse ou mécanique, est un processus fondamental permettant le renouvellement des cellules mortes ou altérées et *in fine* la conservation de la fonction de l'organe. Le processus de cicatrisation mis en place peut aboutir soit à la restitution *ad integrum* du tissu altéré, soit à la fibrose qui correspond à la production en excès de tissu conjonctif qui va alors progressivement remplacer le tissu originel et aboutir à une dysfonction d'organe. La fibrose peut se développer au niveau tubulo-interstitiel, glomérulaire et vasculaire.

« Les processus aboutissant à la fibrose d'un organe sont éminemment complexes, mais il est admis que les myofibroblastes y jouent un rôle central. Ces cellules sont souvent définies comme des fibroblastes « activés », c'est-à-dire exprimant l'actine de muscle lisse ( $\alpha$ -SMA), synthétisant le transcrit ED-A de la fibronectine et ayant développé des complexes d'adhésion focale très structurés leur permettant de se contracter et de migrer [149, 150]. Sous la pression des médiateurs de l'inflammation produits lors de l'agression tissulaire, ces myofibroblastes vont migrer sur le site de l'agression, synthétiser de la matrice extracellulaire et induire une contraction de la zone tissulaire altérée. Cette contraction, permise par l'existence de fibres de stress d'actines et d' $\alpha$ -SMA qui ont développé des contacts avec les protéines de la matrice extracellulaire, va permettre le rapprochement des zones saines. Les cellules épithéliales au contact de ces zones vont alors proliférer et migrer afin de régénérer le tissu altéré. Si l'agression persiste, l'inflammation chronique et les phases de réparation répétées vont aboutir à l'accumulation excessive de composants de la matrice extracellulaire (acide hyaluronique, fibronectine, collagènes interstitiels, protéoglycans) et constituer une cicatrice permanente. » [151].

## 1. La transition épithélio-mésenchymateuse ou dédifférenciation cellulaire

« Les cellules épithéliales sont intimement jointes entre elles par des structures membranaires hautement spécialisées, jonctions serrées, jonctions adhérentes ou desmosomes par exemple, formant ainsi des couches cellulaires. Elles sont caractérisées par une polarisation apico-basale, une répartition localisée des molécules d'adhésion (intégrines et cadherines), une latéralisation des jonctions intercellulaires, une polarisation des filaments d'actine et reposent sur une lame basale au pôle basal des cellules. Les cellules mésenchymateuses, au contraire, ne forment pas de couches organisées et n'ont pas de polarisation apico-basale. Ces cellules n'ont que de rares contacts focaux avec les autres cellules et ne reposent pas sur une lame basale» [151].

La TEM se caractérise par un processus dynamique lors duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales pour acquérir des propriétés mésenchymateuses, requérant des modifications architecturales et fonctionnelles complexes. Puis, les cellules mésenchymateuses deviennent des myofibroblastes ayant des capacités migratoires et capables de sécréter des molécules de la matrice extracellulaire (MEC), servant de support à l'épithélium en reconstruction. La migration nécessite notamment la sécrétion d'enzymes protéolytiques qui vont détruire la MEC afin d'envahir l'interstitium (Figure 16).



**Figure 16** : Schéma représentant les principales étapes de la TEM [151].

#### 1.4. Les principales étapes de la transition épithélio-mésenchymateuse

Le processus dynamique de transition d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux est bien défini actuellement, *in vitro* et *in vivo*, et est caractérisé par une succession de 4 étapes clés [151-153].

Sous l'effet d'un stress environnemental (ischémie, inflammation, etc.), les cellules épithéliales tubulaires perdent leurs caractéristiques phénotypiques et morphologiques pour acquérir les caractéristiques des cellules mésenchymateuses. Ce changement de caractéristiques débute par la diminution de l'expression d'E-cadhérine ou de ZO-1, ce qui provoque une déstabilisation de l'intégrité de l'endothélium et une perte des adhésions intercellulaires. La perte d'E-cadhérine libère la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme qui à son tour favorise la transcription de gènes impliqués dans la TEM. Ensuite survient la réorganisation du cytosquelette d'actine liée à la répression de gènes nécessaires au maintien du phénotype épithélial et à l'activation de gènes nécessaires à la mise en place du phénotype mésenchymateux avec la synthèse d' $\alpha$ -SMA et de S100A4, aussi connus sous le nom de FSP-1 (pour *fibroblast transcription site 1*). De plus, les filaments intermédiaires des cellules passent d'un réseau riche en cytokératine connecté aux jonctions d'adhérence et aux hémidesmosomes, à un réseau riche en vimentine connecté aux points focaux d'adhérence [154]. La vimentine, filament intermédiaire de type III, est un constituant du cytosquelette. Bien que la plupart des filaments intermédiaires soient des structures stables, la vimentine est une structure dynamique dans les fibroblastes. Elle est normalement exprimée par les cellules ayant une origine mésenchymateuse. Cette protéine est fortement exprimée lors de la TEM, ce qui soutient l'implication des cellules mésenchymateuses dans le développement de la fibrose rénale [155, 156].

L'augmentation d' $\alpha$ -SMA donne à la cellule mésenchymateuse des propriétés contractiles qui lui permettent de migrer, devenant alors un myofibroblaste. Les myofibroblastes sécrètent des métalloprotéases matricielles, MMP-2 et MMP-9, dont l'activité est régulée par des inhibiteurs endogènes TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteases) et par l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor -1). La migration des cellules à travers la membrane basale tubulaire est favorisée par l'augmentation de l'expression des MMPs qui vont digérer ces principaux constituants : le collagène IV et la laminine. L'altération de la membrane basale tubulaire par les MMPs facilite la migration des myofibroblastes dans l'interstitium qui sont devenus capables de synthétiser des constituants de la MEC : fibronectine, collagènes I et III.

Les cellules mésenchymateuses ont un rôle central dans le contrôle de la dégradation et de la réparation des tissus lésés et sont étroitement régulées par les facteurs de croissance et les cytokines. Une inflammation prolongée dans l'interstitium va conduire à l'obtention d'un milieu favorable à l'accumulation des myofibroblastes et la production excessive de molécules de la matrice extracellulaire, aboutissant progressivement à la formation de fibrose interstitielle.

#### 1.5. Initiation de la TEM

L'inflammation joue un rôle important dans l'initiation de la fibrose rénale. En réponse à une agression, les cellules rénales lésées produisent des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines qui vont initier et guider la migration des cellules inflammatoires sanguines circulantes vers l'espace interstitiel rénal [157]. Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules recrutées au niveau du rein lésé suivies par les monocytes/macrophages et les lymphocytes [158].

Les cellules épithéliales et endothéliales sécrètent également des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines tel que MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) qui vont stimuler le recrutement des leucocytes à partir du compartiment sanguin.

L'hypoxie des tissus et l'activation chronique de la voie de l'« hypoxia inducible factor » (HIF) a également été mise en cause dans l'activation de la TEM, notamment à travers une activation dérégulée de la réponse à l'hypoxie. L'hypoxie chronique peut découler de la perte chronique d'une oxygénation correcte des tissus, de part le développement local de l'inflammation, de la déstabilisation des tissus de soutiens et des capillaires locaux, d'un œdème, etc. Elle est également entretenue par l'avancée de la fibrose. Une présentation détaillée de la voie du HIF et de son double aspect aiguë/chronique est présentée en discussion.

#### 1.6. Régulation transcriptionnelle de la TEM

Sous l'effet de nombreux facteurs pro-fibrosants comme le « Transforming Growth Factor  $\beta$  » (TGF- $\beta$ ), CTGF (Connective Tissue Growth Factor), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et des agents vasomoteurs tels qu'endothéline-1, les protéines de la MEC sont synthétisées en grande quantité par les myofibroblastes puis libérées dans l'interstitium.

Dans le milieu extracellulaire, plusieurs facteurs de croissance sont impliqués, qui agissent seuls ou en combinaison, tels que le TGF- $\beta$ , qui est sans aucun doute le médiateur essentiel dans le processus

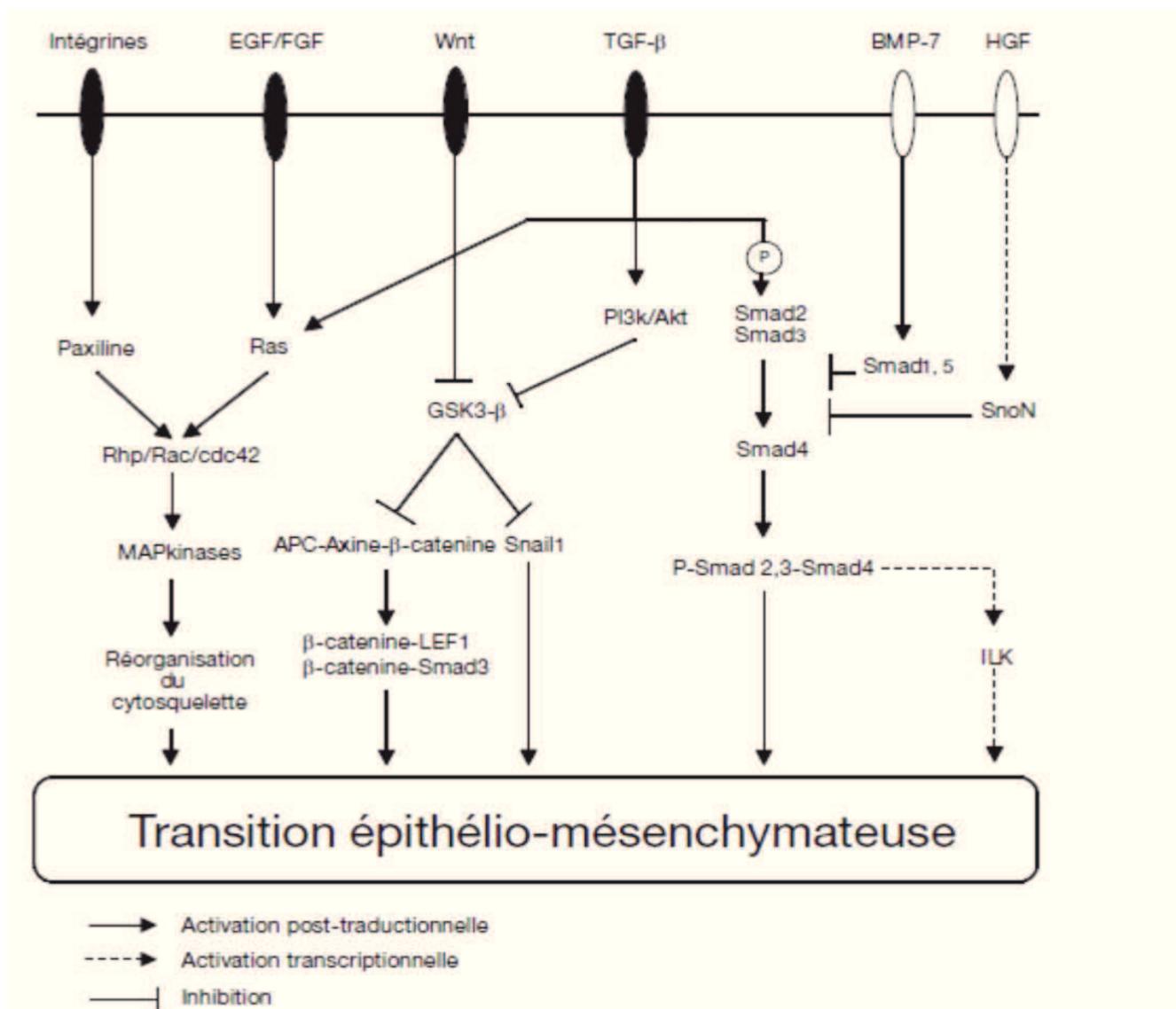
de TEM, capable d'induire à lui seul l'ensemble des altérations observées, l'EGF (Epidermal growth factor), l'IGF-2 (Insulin-like growth factor-2), et le FGF-2 (Fibroblast growth factor-2), agents qui favorisent la transition, et le *Bone Morphogenetic Protein 7* (BMP-7), qui s'y oppose [149] (Figure 17). « Ces cytokines sont naturellement présentes dans le milieu extracellulaire, mais à des concentrations qui sont dépendantes de l'infiltrat inflammatoire local, du degré d'ischémie tissulaire, ou encore de la présence d'agents toxiques. Elles sont de plus facilitées ou empêchées par des peptides extracellulaires qui modifient leur affinité pour leurs récepteurs spécifiques [159]. Par exemple, le peptide CTGF potentialise la fixation du TGF- $\beta$  sur son récepteur, et empêche le BMP-7 d'activer le sien [160]. À l'inverse la *Kielin/chordin like protein* (KCP) potentialise l'effet du BMP-7 [161]» [162].

Les récepteurs transmembranaires de ces cytokines sont couplés à des kinases qui vont réguler l'activité de facteurs de transcription. Ainsi la fixation du TGF- $\beta$  sur son récepteur active la phosphorylation de Smad2 et Smad3 (dans le rein le rôle de Smad3 est particulièrement important pour l'induction de la TEM), l'assemblage avec Smad4, la migration du complexe dans le noyau et l'induction de la transcription des gènes impliqués dans la TEM [163].

Le TGF- $\beta$  active aussi Snail, protéine « à doigt de zinc » capable de réprimer la transcription des gènes codant pour des protéines assurant les jonctions cellule-cellule tel que ZO-1, et E-cadhérine, une molécule d'adhésion engagée dans les jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Ceci a pour effet non seulement un relâchement de l'adhésion inter-cellulaire, mais aussi une libération d'autres protéines de ces liaisons, tel que la  $\beta$ -caténine, qui peuvent ensuite agir dans le cytoplasme comme co-facteur de transcription et participer à la promotion de la transcription de gènes « mésenchymateux», tels que la vimentine ou S100A4. Le TGF- $\beta$  active enfin des voies de signalisation Smad-indépendantes impliquées dans la TEM, tel que les petites protéines GTPases (Rho, Rac et cdc42), la voie des MAPKinases et notamment les c-jun-N terminal kinases, qui sont toutes deux impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et la plasticité cellulaire, ou bien la voie PI3K/Akt qui va inhiber la glycogène-synthase kinase 3 (GSK3 $\beta$ ) et activer la voie Wnt.

Les intégrines, composées d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ , sont des récepteurs localisés à la surface des cellules pouvant être activés par les molécules de la MEC. Ces récepteurs permettent une liaison et une communication entre les cellules et la MEC. En effet, suite à leur activation, ces récepteurs sont capables de transduire des signaux entre la MEC et l'intérieur de la cellule, avec en particulier l'activation par phosphorylation d'ILK (Integrin-linked kinase) et Src qui vont respectivement activer le facteur de transcription Snail et la protéine FAK (Focal adhesion kinase).

Un autre acteur de la TEM est la protéine liant le calcium S100A4. S100A4 est présente de manière sélective dans les fibroblastes produits au cours de la TEM [164] et son expression est corrélée à l'existence d'une TEM et d'une fibrose tissulaire. S100A4 a été observée dans l'épithélium tubulaire, dans un modèle de fibrose rénale induite par ligature unilatérale de l'uretère chez la souris [165]. La délétion de S100A4 inhibe la TEM induite par le TGF- $\beta$  et les niveaux d'expression des transcrits de S100A4 sont inversement corrélés à ceux de la E-cadhérine. S100A4 est impliquée dans l'acquisition de propriétés motiles et de la modification de la plasticité cellulaire en agissant sur la régulation du calcique intracellulaire et sur la réorganisation du cytosquelette d'actine.



**Figure 17 :** Voies de signalisation principales impliquées dans la TEM [151].

« Dans le noyau, c'est donc un véritable transcriptome qui engage le processus de TEM. Ce transcriptome est activé par des complexes protéiques capables de réprimer les gènes codant pour des protéines participant aux fonctions épithéliales, et d'en activer d'autres codant pour des protéines dont l'expression est plus caractéristique des fibroblastes. Très en aval, lorsque le complexe CBF-A/KAP-1 reconnaît sur de nombreux promoteurs les sites S100A4, il s'ensuit un remodelage de la chromatine qui facilite globalement le phénomène de TEM.

La durée de cette interruption, et sa réversibilité dans le temps, font probablement la différence entre un processus physiologique de réparation et un processus pathologique de fibrogenèse » [162].

### 1.7. Les myofibroblastes

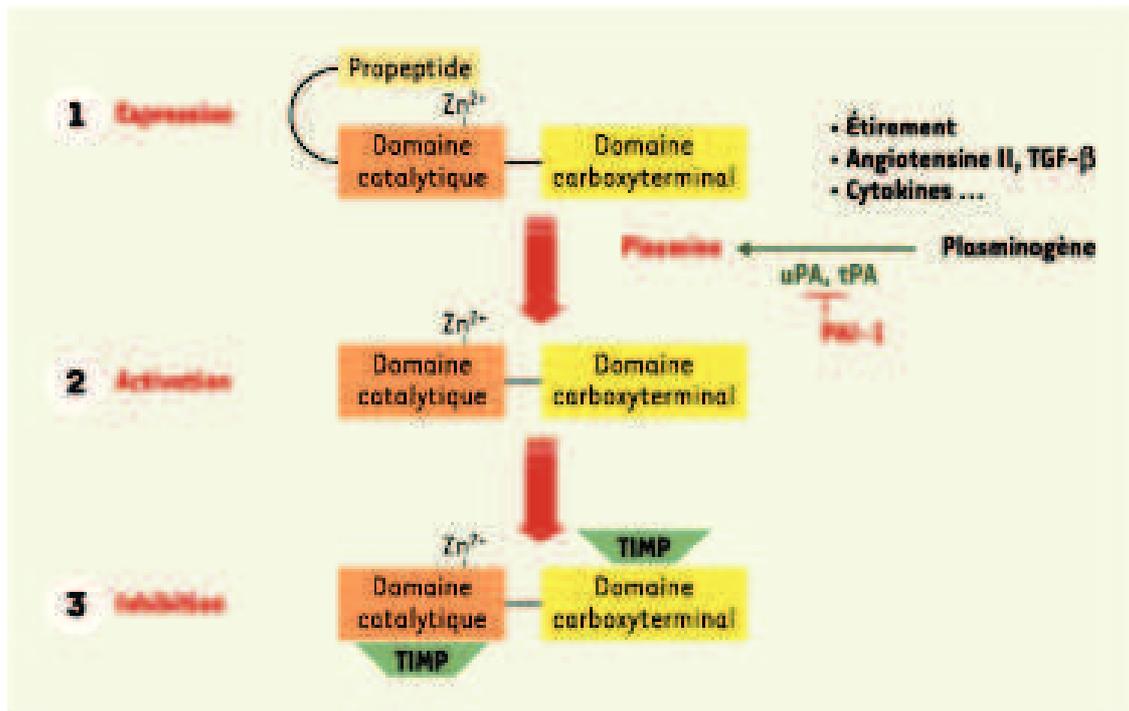
Les différentes cytokines libérées durant l'inflammation induisent la prolifération des fibroblastes interstitiels et l'apparition des myofibroblastes qui sont les acteurs majeurs dans le développement et le maintien du processus de cicatrisation impliquant la synthèse de composants de la MEC. Au niveau rénal, il est maintenant admis que la population de fibroblastes qui participe à la fibrose rénale est une population hétérogène constituée d'une proportion variable de fibroblastes résiduels activés, de fibroblastes issus de la TEM et de fibroblastes provenant de cellules médullaires pluripotentes.

Lors des processus de réparation et de cicatrisation suite à un traumatisme ou une lésion, les fibroblastes du tissu interstitiel s'activent, se multiplient et se transforment en myofibroblastes. Les myofibroblastes sont des cellules mésenchymateuses qui combinent les caractéristiques des fibroblastes et celles des cellules musculaires lisses; et expriment l'actine musculaire lisse- $\alpha$  [166]. Ce changement phénotypique se manifeste en particulier par le développement de capacités de sécrétion permettant la production abondante de diverses molécules de la MEC en reconstruction, qui va servir de substrat physique pour l'épithélium en régénération [167, 168]. La MEC est une structure complexe constituée de molécules de collagène, de glycoprotéines et de protéoglycanes. Les glycoprotéines sécrétées en majorité par les myofibroblastes sont des laminines telles que la fibronectine et la ténacine. Les myofibroblastes peuvent également sécréter des composants de la lame basale tels que le perlecan, le collagène de type IV, mais aussi des composés tels que l'acide hyaluronique ou l'élastine.

## 1.8. Contrôle de la TEM

Dans les tissus normaux, l'homéostasie de la MEC est fortement régulée grâce à un équilibre entre sa production par les myofibroblastes et sa dégradation. L'accumulation excessive de MEC, que l'on retrouve dans les reins fibrosés, est donc le résultat d'un déséquilibre qui met en jeu à la fois une surproduction des composants de la MEC, mais également un défaut de sa dégradation. En effet, la MEC et la lame basale peuvent être dégradés par des MMPs, une famille d'enzyme de la classe des peptidases, sécrétées en partie par les myofibroblastes [168, 169]. Les MMPs sont des endopeptidases zinc-dépendantes classées en 6 sous-groupes en fonction de leur substrat et de leur structure. Les MMPs interviennent dans le développement des tissus, et dans leur entretien ou leur réparation, en augmentant la biodisponibilité de certains facteurs de croissance qui sont soit emprisonnés dans la MEC soit qui nécessitent un clivage protéolytique pour être activés comme l'IGF. Ces protéines sont généralement sécrétées sous forme de pro-MMP et nécessitent pour être activées un clivage par la plasmine ou par d'autres MMPs (Figure 18) [170]. Elles peuvent également cliver des composants autres que ceux de la MEC, tels que des molécules d'adhérence cellulaire (cadhérines et intégrines) et certains facteurs de croissance et leurs récepteurs (TGF $\alpha$ , FGF-R1). Les inhibiteurs tissulaire des protéases de la matrice (TIMPs), également sécrétés pas les myofibroblastes, sont les inhibiteurs endogènes spécifiques qui lient et inhibent les MMPs, entraînant la diminution du taux de dégradation de la MEC. *In vitro*, TIMP-1 est inhibé par TGF- $\beta$ , alors que TIMP-2 est surexprimé en présence de TGF- $\beta$ , contribuant à l'accumulation de la MEC [171].

Lors du processus de réparation, des composants de la famille des sérines protéases, qui font partie des enzymes proétolityques, sont également impliquées dans le remodelage de la MEC. Effectivement, le tPA (Tissue-type plasminogen activator) et l'u-PA (Urokinase-type plasminogen activator) jouent des rôles importants dans le maintien de la balance entre la production et la dégradation de la MEC, par clivage du plasminogène en sa forme active, la plasmine [172], favorisant ainsi la fibrinolyse et la protéolyse ainsi que l'activation d'autres MMPs clivant la plupart des protéines de la MEC [173, 174]. La plasmine a pour propriété de dégrader les composants de la MEC, mais pourrait aussi amplifier le potentiel protéolytique par activation des MMPs. Les protéines PAI-1 et PAI-2 ont un rôle profibrotique [172]. En effet, elles régulent la génération de la plasmine, en inhibant spécifiquement les protéines tPA et u-PA impliquées dans les processus de fibrinolyse et de protéolyse, favorisant ainsi l'accumulation de MEC.



**Figure 18 :** Contrôle de l'activité des MMPs tissulaires effectif sur trois niveaux. 1. Leur expression est stimulée par l'étirement, des peptides ou certaines cytokines. 2. Leur activation est induite par d'autres MMPs ou par la plasmine. 3. Leur activité peut être inhibée par des TIMP [175].

### 1.9. Inhibiteur de la TEM

L'« hepatocyte growth factor », HGF, a des propriétés antifibrotiques reconnues *in vitro* et *in vivo*. L'HGF va bloquer l'induction de la TEM tubulaire induite par le TGF-β par l'induction transcriptionnelle de SnoN (*Sloan-Kettering Institute proto-oncogene (Ski)-related novel gene, non-Alu containing*). SnoN va interférer avec la signalisation du TGF-β en induisant avec Smad2 un complexe incapable d'induire la transcription des gènes Smad-dépendants impliqués dans la TEM.

BMP-7 (*Bone Morphogenic Protein 7*) peut également contrer la signalisation du TGF-β, son action profibrotique et inductrice de TEM. En effet, en se liant aux récepteurs ALK3/6, il active Smad1 et Smad5 qui appartiennent au groupe des Smads « inhibitrices ». Smad1 et 5 vont alors se lier à Smad4 puis le complexe va migrer dans le noyau de la cellule et induire l'expression transcriptionnelle de la E-cadhérine ainsi que la restauration d'un phénotype épithélial.

« L'activation de la voie phosphatidylinositol 3-kinase et Akt par le TGF-β induit l'activation de mTOR (*mamalian Target Of Rapamycin*) et la phosphorylation de la S6 kinase 1 et de *4E-binding protein 1*, induisant une augmentation de la taille des cellules et de leur contenu en protéines. La rapamycine, en inhibant mTOR, ne modifie pas le phénotype cellulaire induit par le TGF-β (diminution

d'expression de l'E-cadhérine, formation de fibres de stress d'actine et synthèse de fibronectine) mais réduit significativement le potentiel migratoire et d'invasion des cellules. » [151].

## **2. La fibrose tubulo-interstitielle**

La fibrose interstitielle est définie par l'accumulation en excès de la MEC, suite à une inflammation chronique, à l'activation prolongée de la TEM, ou à l'activation des fibroblastes de soutien présent dans le parenchyme au niveau des glomérules, du mésangium et de l'interstitium rénales. La fibrose est à l'origine d'une perte progressive de fonction de l'organe devenant à long terme non fonctionnel. La matrice fabriquée en excès y est déposée par des fibroblastes interstitiels activés ou «myofibroblastes», après une agression de nature par exemple toxique, infectieuse, ou encore inflammatoire au sens large [153, 176].

La fibrose associée aux atteintes rénales chroniques, notamment à la néphropathie chronique de l'allogreffe [177, 178], est corrélée à l'expression des protéines S100A4 [155, 177, 179],  $\alpha$ -SMA et vimentine.

Le développement de la fibrose étant le point final d'un grand nombre de voies lésionnelles pouvant prendre place pendant la phase chronique de la transplantation, elle est un marqueur de premier plan dans l'analyse du comportement à long terme des greffes, notamment pour évaluer la qualité des greffons et l'impact des conditions de préservation sur l'intégrité des tissus.

**Les lésions d'IR présentent ainsi un ensemble physiopathologique d'un haut niveau de complexité, regroupant des voies de signalisations allant de la cellule à l'organisme entier, certaines d'entre elles n'existant encore qu'à l'état d'hypothèse et nécessitant des études approfondies afin de déterminer leur place dans la chronologie des lésions.**

**De la cellule qui résiste aux stress en engageant des voies de survie et qui met en place, si celles-ci échouent, des signaux extracellulaires mobilisant les ressources de l'organe entier. Du réseau vasculaire de ce dernier qui va organiser la réponse immunitaire, normalement bénéfique pour son rôle de réparation et régénération, mais qui dans un contexte de lésion d'IR extrême va conduire à des voies destructrices pour le parenchyme, la physiopathologie de l'IR engage la totalité des ressources de l'organe ainsi que les défenses de l'organisme receveur. Dans un contexte de transplantation, où l'organe est reconnu comme non-soi, une activation trop importante du système immunitaire aura des conséquences désastreuses sur le devenir de**

**l'organe. Même dans un contexte de transplantation autologue, comme nous allons le voir lors des expériences menées au laboratoire dans notre modèle de transplantation rénale chez le porc, les lésions d'IR impactent le devenir du rein, soulignant le rôle de ces lésions dans l'altération de la tolérance.**

**Trouver de nouvelles méthodes de conservation, adaptées à l'état de fragilité de l'organe et permettant de diminuer au maximum les lésions d'IR afin de donner aux organes des fondations solides sur lesquelles construire son devenir à long terme, est un objectif de première importance pour l'amélioration du taux de réussite des transplantations, l'extension du pool des donneurs, et le bien être des patients.**

# IV. OBJECTIFS

La stratégie de conservation en hypoxie à 4°C paraissait suffisante, auparavant, lorsque les organes utilisés pour la transplantation étaient choisis selon des critères de qualité restreints. Cependant, cette méthode de conservation est actuellement remise en question du fait de l'utilisation de plus en plus fréquente d'organes « marginaux » (critères élargis) pour lesquels ce type de conservation ne semble pas adéquat du fait de leur sensibilité plus importante au syndrome d'IR.

Mon travail de thèse a consisté à identifier de nouvelles conditions de préservation des greffons, afin de limiter les lésions d'IR, en modulant la température de conservation ou par ajout d'un transporteur naturel d'oxygène. A cette fin, nous avons utilisé deux modèles. Un modèle *in vitro* de cellules endothéliales rénales soit porcines, pour la première partie de ce travail, soit humaines, pour la deuxième partie. Ce modèle est un modèle pertinent car les cellules endothéliales sont la première cible des lésions d'IR. Puis, un modèle *in vivo* d'autotransplantation rénale chez le porc qui permet de s'affranchir des réponses allo-immunes pour cibler uniquement les lésions liées aux syndromes d'IR. Nous nous sommes tournés vers un modèle porcine car c'est une espèce qui fournit un degré élevé de pertinence clinique à nos données puisque son génome est proche de celui de l'Homme, et en particulier car ses reins présentent un système élaboré d'artères segmentaires et inter lobulaires fournissant des lobes rénaux nombreux (multilobulaire)[66, 180, 181], une caractéristique partagée avec les humains et les mammifères supérieurs, mais absents chez les rongeurs et les chiens, ce qui rend les modèles porcins très proche de la condition humaine.

Le premier objectif de ce projet a consisté à étudier l'impact de différentes températures lors de la conservation de cellules endothéliales rénales porcine sur les lésions d'IR. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la mortalité et l'intégrité cellulaire, l'activité métabolique, le stress oxydant, les voies de l'hypoxie et l'inflammation. Nous avons également étudié deux de ces températures lors de la conservation *ex vivo* de reins de porc afin d'observer l'effet de celles-ci dans l'organe entier.

Le deuxième objectif de ce projet a consisté à évaluer les effets d'un nouveau transporteur d'oxygène, une hémoglobine extracellulaire de ver marin (M101), en tant qu'additif aux solutions de conservation dans la transplantation d'organe et notamment rénale. Pour cela nous avons tout d'abord caractérisé les propriétés de cette molécule. Puis, nous avons déterminé ses effets sur la viabilité et l'activité métabolique cellulaire dans un modèle *in vitro* de cellules épithéliales de tubes contournés proximaux de rein de porc (LLC-PK1). Enfin, nous avons évalué ces effets sur la conservation de rein de porc autogreffé par mesure de la fonction rénale et de l'intensité des lésions suite à une séquence d'IR.

Le troisième objectif a été de caractériser le mécanisme à l'origine de l'efficacité de M101 parmi les trois mécanismes de la molécule qui sont l'effet grosse molécule, l'activité anti-oxydante et l'activité transporteur d'oxygène; par une analyse de la viabilité et l'intégrité cellulaire, et de l'activité métabolique.

Les travaux sur la modulation des températures et sur l'ajout de M101 ont été divisés en deux parties pour faciliter la compréhension de ce mémoire. La première partie relate les effets entraînés par la modulation de la température pendant la conservation tandis que la deuxième partie est une analyse des effets de l'ajout de M101 lors de la conservation.

# V. MATERIELS ET METHODES

# A. METHODES RELATIVES A LA CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES ENDOTHELIALES

## 1. Modèles d'études

Pour les travaux de l'étude sur les températures, nous nous sommes orientés vers un modèle d'étude *in vitro* de culture primaire de cellules endothéliales microvasculaires, isolées au laboratoire à partir de rein de porc.

Tandis que pour l'étude sur la molécule M101, nous avons décidé de nous rapprocher de la clinique et nous avons choisi d'utiliser à cette fin un modèle *in vitro* de culture primaire de cellules endothéliales aortique humaine (HAEC) (Gibco, Invitrogen)

## 2. Isolement des cellules

Après prélèvement, les reins de porc sont lavés dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) à 5% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) puis coupé en morceaux d'un millimètre<sup>3</sup>. Des fragments de cortex rénal sont digérés avec de la collagénase type IA à 1 mg/mL pendant une heure dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

La suspension cellulaire est lavée par centrifugation avec du PBS à 5% de SVF. Les cellules sont remises en suspension dans 1mL d'une solution de BSA (Bovine Sérum Albumine) 0,1% diluée dans du PBS 1X. Les cellules endothéliales sont isolées de la suspension cellulaire par sélection positive à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD31 (système Dynabeads), le CD31 ou PECAM1, un antigène spécifique des cellules endothéliales.

Pour la sélection, 25 µL de billes Dynabeads CD31 sont lavées trois fois avec 1 mL de la solution BSA 0,1%. Les Dynabeads CD31 sont incubées avec les cellules pendant 20 minutes à 4°C sous agitation rotative. Les cellules sont ensuite lavées puis récupérées à l'aide de l'aimant. Les cellules endothéliales CD31 sont mises en culture dans une flasque 75 cm<sup>3</sup> gélatinée à 1% dans un milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complet contenant 10% SVF (sérum de veau fœtal) décomplémenté (chauffé 30 min à 56°C) + 10 mg/mL de pénicilline-streptomycine + 2 mM de glutamine à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine 0,5%. La trypsine, une endoprotéase, rompt la liaison lysine-arginine. Les cellules décollées sont remises en

suspension dans un milieu de culture et redistribuées dans de nouvelles flasques pour permettre l'amplification des cellules. Chaque étape de dilution des cultures constitue un passage, les cellules employées pour notre expérience se situent entre le 2<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> passage.

### **3. Milieu de culture**

Les cellules endothéliales porcines sont des cellules adhérentes. Elles sont cultivées en plaque ou en flasque dans un milieu de culture composé de milieu DMEM complet vu précédemment.

Les HAEC sont également des cellules adhérentes. Elles sont cultivées dans un milieu de culture composé de milieu M200 complété avec 2% de LSGS (Low Serum Growth Factor) et 10 mg/mL de pénicilline-streptomycine.

### **4. Repiquage des cellules**

Quand elles arrivent à pré-confluence, les cellules sont repiquées. Elles sont d'abord rincées au PBS puis maintenues 1 minute à 37°C en présence de trypsine et d'EDTA (trypsine 0,05%, 1 mM EDTA) pour les décoller. Elles sont ensuite mises en suspension avec du milieu de culture pour neutraliser la trypsine puis centrifugées (1000 g, 7 min, 4°C). Le culot cellulaire est repris en milieu de culture complet.

### **5. Numération et détermination de la viabilité cellulaire**

Les numérations cellulaires sont réalisées en hémacytomètre (cellule de Malassez). La viabilité cellulaire est évaluée par coloration au bleu trypan (colorant d'exclusion, Sigma).

### **6. Congélation/décongélation**

Après lavage au PBS, les cellules sont décollées comme préalablement décrit, dénombrées et, après centrifugation, le culot cellulaire est repris soit en SVF contenant 5% de DMSO (Sigma) pour les cellules endothéliales soit avec du synth-a-freeze (Gibco, Invitrogen) pour les HAEC. La concentration cellulaire est ajustée à  $5 \cdot 10^5$  cellules viables/mL et 1 mL de suspension cellulaire par cryotube est

congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant d'être transféré à  $-80^{\circ}\text{C}$  puis conservé dans de l'azote liquide. Les cellules peuvent être ainsi conservées plusieurs mois.

Pour la décongélation, le contenu cellulaire d'un cryotube est rapidement décongelé à  $37^{\circ}\text{C}$  puis repris dans du PBS contenant 10% de SVF. Après un lavage, les cellules sontensemencées en flasques 75 dans du milieu de culture contenant 10% de SVF pour les cellules endothéliales porcines ou 2% de LSGS + 8% de SVF pour les HAEC. Une fois que les cellules adhèrent, elles sont repiquées comme décrit précédemment.

## B. METHODES DE DOSAGES RELATIVES A L'ANALYSE CELLULAIRE

### 1. Tests métaboliques

#### 1.1. Dosage de la libération du lactate déshydrogénase (LDH)

La LDH libérée par les cellules est un marqueur de perte de l'intégrité membranaire. Le dosage de la LDH est basé sur la réduction du NAD par la LDH. Le NAD réduit résultant (NADH) est utilisé dans la conversion stœchiométrique d'un composé coloré, détectable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 490 nm. La densité optique détectée est directement proportionnelle à la quantité de LDH.

A la fin de la période d'hypoxie/réoxygénation des cellules en plaques 96 puits, nous avons dosé, dans un premier temps, la quantité de LDH libérée dans le surnageant. Pour ce faire, après avoir transféré 50 µL de surnageant, 100 µL de milieu réactionnel (solution de cofacteur, colorant et substrat de l'enzyme en quantité égal) ('TOX-7', Sigma) ont été ajoutés durant 30 minutes à température ambiante dans le noir. Puis, afin de bloquer la réaction, 15 µL d'HCl 1N ont été ajoutés. Dans un deuxième temps, nous avons dosé la quantité de LDH intracellulaire. Le reste de surnageant a été éliminé, 100 µL de PBS 1X ont été ajoutés au tapis cellulaire ainsi que 10 µL de solution de lyse durant 45 minutes à 37°C. 50 µL de surnageant ont été transférés et 100 µL de milieu réactionnel ont été ajoutés durant 30 minutes à température ambiante dans le noir. Puis, 15 µL d'HCl 1N ont été ajoutés.

Le pourcentage de libération de LDH est calculé selon le rapport :

$(\text{LDH surnageant de culture}) / (\text{LDH surnageant de culture} + \text{LDH tapis cellulaire}) \times 100$

La libération de LDH étant liée à la perte d'intégrité membranaire.

#### 1.2. Dosage du XTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide)

Le dosage est basé sur la réduction, par la succinate déshydrogénase mitochondriale, du XTT en composé de formazan coloré, détectable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm. La densité optique détectée est directement proportionnelle à l'activité métabolique du complexe II de la chaîne mitochondriale.

En effet, plus la quantité de cellules vivantes est élevée, plus elles vont métaboliser le XTT en cristaux de formazan, et plus la densité optique sera élevée.

Après la période d'hypoxie/réoxygénation des cellules en plaques 96 puits, 50 µL d'une solution de XTT à 0,5 mg/mL ont été ajoutés dans 100 µL de milieu durant 4 heures à 37°C (sous 5% CO<sub>2</sub> + 21% O<sub>2</sub>). Puis l'activité métabolique est détectée par photométrie à l'aide d'un lecteur de microplaques (Victor<sup>3</sup> Multilabel Plate Reader couplé au logiciel Wallac, PerkinElmer, Courtaboeuf, France). Les résultats sont exprimés en absorbance (Abs).

### 1.3. Quantification de l'activité du complexe IV

Le dosage est basé sur l'oxydation du cytochrome c réduit, suite à l'immunocapture de l'enzyme du complexe IV, détectable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 550 nm. La densité optique détectée est directement proportionnelle à l'activité métabolique du complexe IV de la chaîne mitochondriale.

Suite à une séquence d'hypoxie/réoxygénation, le surnageant de culture est éliminé et le tapis cellulaire est gratté avec 200 µL de PBS 1X puis centrifugé à 4 000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est aspiré et le culot sec est conservé à -80°C avant le dosage de l'activité du complexe IV.

La quantité de protéines totales de chaque échantillon est dosée par la méthode de l'acide bicinchoninique selon les instructions du fabricant ('Bicinchoninic Acid Kit', Sigma-Aldrich,). Ce dosage utilise la propriété des protéines à réduire les ions Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>+</sup>. A pH alcalin, les ions Cu<sup>+</sup> produits se complexent à l'acide bicinchoninique formant un composé stable violet détectable à une absorbance maximale à 562 nm. L'absorbance mesurée par photométrie (Victor<sup>3</sup> Multilabel Plate Reader couplé au logiciel Wallac) est directement proportionnelle à la concentration en protéine présente dans les échantillons. Une gamme étalon est réalisée en parallèle avec de l'albumine bovine sérique (BSA) permettant de calculer la quantité de protéines de chaque échantillon.

La concentration de chaque échantillon a ensuite été ajustée à 5 mg/mL de protéines totales. Puis, l'activité du complexe IV de chaque échantillon a été dosée selon les instructions données par le fabricant ('MS 443', MitoSciences)

Le taux d'activité de chaque échantillon a été déterminé par l'équation suivante :

$$\text{Taux} = (\text{Absorbance 1} - \text{Absorbance 2}) / \text{temps (min)}$$

Puis, il a été comparé à l'activité des cellules contrôles. Les résultats sont exprimés en absorbance (Abs).

#### 1.4. Dosage de l'ATP relatif à l'étude sur les températures de conservation

L'ATP est un marqueur de fonctionnalité du métabolisme mitochondrial et donc de viabilité cellulaire, sa concentration déclinant rapidement dans les cellules présentant un métabolisme mitochondrial altérée. Le dosage de l'ATP est basé sur la production de lumière apportée par la réaction de l'ATP avec la luciférase et la D-luciférol ajoutées.

Après la période d'hypoxie/réoxygénation des cellules en plaques 96 puits, 100 µL d'une solution d'ATP ('ATP Assay kit', Sigma) ont été ajoutées à 100 µL de suspension cellulaires pendant 2 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière et sous agitation.

La chimiluminescence, directement proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans l'échantillon, est détectée à l'aide d'un lecteur de microplaques (Victor<sup>3</sup> Multilabel Plate Reader couplé au logiciel Wallac). L'intensité de lumière est proportionnelle à la quantité d'ATP. Les résultats sont exprimés en coups par seconde.

#### 1.5. Dosage de l'ATP relatif à l'étude sur la molécule M101

Suite à une séquence d'hypoxie/réoxygénation des cellules en plaques 12 puits, le surnageant de culture a été éliminé et les cellules adhérentes ont été grattées et lysées dans 200 µL d'acide perchlorique 0,2N. La suspension obtenue a alors été centrifugée à 12 000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a ensuite été aliquoté et conservé à - 20°C. Les échantillons ont été décongelés à 4°C puis neutralisés à pH 7 avec une solution de carbonate de potassium (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 M) et centrifugée à 12 000 g pendant 2 min. Puis, ils ont été dosés selon les instructions données par le fabricant (ATP Bioluminescent Assay Kit, Sigma Aldrich).

La chimiluminescence, directement proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans l'échantillon, a été détectée à l'aide d'un lecteur de microplaques (Victor<sup>3</sup> Multilabel Plate Reader couplé au logiciel Wallac, PerkinElmer, Courtaboeuf, France).

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de la quantité d'ATP détectée dans les cellules conservées dans les différentes conditions comparée à celle détectée dans le lysat issu des cellules 'contrôles' qui n'ont pas été soumises à la conservation à froid.

## 1.6. Dosage du dihydroéthidium (DHE)

Le DHE sert de marqueur fluorescent dans la quantification de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), qui est une espèce oxygénée réactive, formé lors d'un stress oxydant. Le bromure d'éthidium, formé par l'oxydation du DHE par l'anion superoxyde, s'intercale dans l'ADN des cellules. Il colore sélectivement les cellules mortes en rouge fluorescent détectable par fluorimétrie, avec un lecteur de microplaque (Victor<sup>3</sup> Multilabel Plate Reader couplé au logiciel Wallac, PerkinElmer, Courtaboeuf, France), à une longueur d'onde de 610 nm. L'intensité de fluorescence est proportionnelle au stress oxydant subit par la cellule lié à la génération d' $O_2^{\cdot-}$ .

Après la période d'hypoxie/réoxygénation des cellules en plaques 96 puits, les cellules ont été rincées trois fois avec du PBS 1X. Puis, 100  $\mu$ L d'une solution de DHE à 10 $\mu$ M, dilué dans du PBS à 2% de SVF, ont été ajoutés aux cellules durant 4 heures à 37°C (sous 5%  $CO_2$  + 21%  $O_2$ ). Les cellules ont été rincées encore deux fois avec du PBS 1X et 100 $\mu$ L de PBS 1X ont été ajoutés aux cellules.

## 1.7. Dosage de l'activité de la caspase 9

Suite à une séquence d'hypoxie/réoxygénation, le surnageant de culture est éliminé et les cellules adhérentes sont lysées dans 50  $\mu$ L de tampon de lyse ('Caspase- 9 Fluorometric Assay Kit', Abcam, Paris, France) et sont incubées durant 10 min sur la glace. Le tapis cellulaire est gratté puis centrifugé à 4 000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est aliquoté et conservé à -80°C avant le dosage de l'activité de la caspase-9.

La quantité de protéines totales de chaque échantillon est dosée par la méthode de l'acide bicinchoninique puis la concentration est ajustée à 3 mg/mL de protéines totales/mL de tampon de lyse. Puis, la mesure de l'activité de la caspase-9 est effectuée en présence du substrat spécifique de la caspase-9 (LEHD) couplé au fluorochrome AFC (AFC: 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin), selon les instructions données par le fabricant. LEHD-AFC après clivage du substrat par la caspase-9 émet une lumière bleue, tandis que l'AFC libre émet une fluorescence jaune-vert. L'intensité de fluorescence, proportionnelle à la quantité de substrat clivé et donc à la quantité de caspase active dans la suspension, est détectée par fluorescence à l'aide d'un lecteur de microplaques (Victor<sup>3</sup>) et analysée par le logiciel Wallac.

Les résultats sont exprimés en taux de pourcentage d'augmentation ou de diminution de l'activité de la caspase-9 détectée dans les cellules conservées dans les différentes conditions testées par rapport à celle détectée dans les cellules contrôles.

## 1.8. Dosage du NO (Nitric Oxide)

L'oxyde nitrique est dosé dans les différents surnageants de culture. 50  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon sont déposés dans une plaque 96 puits et 50  $\mu\text{L}$  de réactif de Griess sont ajoutés. Après agitation la plaque est incubée à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 15 minutes. La mesure de l'absorbance se fait par spectrophotométrie à 540 nm. Cette méthode colorimétrique permet de quantifier indirectement la production d'oxyde nitrique (NO) par l'intermédiaire de la mesure de l'ion nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ). Cet ion est l'un des deux principaux produits de dégradation du NO, il est stable et non volatil. La technique utilise le réactif de Griess (acide sulfanilique et  $\alpha$  naphthyl amine) qui réagit pour former un diazo en présence de  $\text{NO}_2^-$ .

L'acide sulfanilique diazoté réagit avec l'acide nitrique pour former un diazo intermédiaire, l'acide diazobenzène-sulfonique-4. Ce dernier se condense avec l' $\alpha$  naphthyl amine et forme le colorant azoïque final qui absorbe à 540 nm en spectrophotométrie. L'absorbance est ensuite transformée en concentration grâce à une courbe étalon d'équation :  $x \text{ en } \mu\text{M} = (y \text{ DO} - 0,0032) / 0,006$ .

## 1.9. Modification de la molécule M101

### a) Fabrication de la cyanméthémoglobine M101

L'activité transporteur d'oxygène est portée par le site actif de l'hème. En transformant l'hémoglobine (Hb) en cyanméthémoglobine, le site actif n'est plus capable de fixer l'oxygène car un atome de cyanure est fixé à sa place sur l'hème et de façon irréversible. Par ailleurs le dérivé de cyanméthémoglobine est le dérivé le plus stable de l'Hb.

Après décongélation à température ambiante, la solution de M101 a été mélangée à une solution de Drabkin modifiée et a été incubée à température ambiante pendant 30 minutes. La transformation de l'hémoglobine en cyanméthémoglobine a été suivie par spectrophotométrie. Puis, la solution obtenue a été purifiée par chromatographie Sephacryl. La fraction de cyanméthémoglobine recueillie a été concentrée par ultracentrifugation à 4 500 g pendant 30 minutes à 4°C et a ensuite été filtrée avec un filtre à 0,2  $\mu\text{m}$ . Les échantillons de cyanméthémoglobine ont ensuite été conservés à -80°C avant leur utilisation.

## b) Fabrication du dodécamère M101

L'activité antioxydante serait portée par les linkers de la molécule. Le principe est donc de dissocier les chaînes de structures de la molécule M101 afin de récupérer les dodécamères fonctionnels.

Après décongélation à température ambiante, la molécule M101 a été dissociée à l'aide d'un tampon de dissociation jusqu'à ce que le pH soit compris entre 8,5 et 9. La dissociation a été suivie par spectrophotométrie. Puis, la solution obtenue a été stabilisée avec un tampon d'arrêt jusqu'à l'obtention d'un pH compris entre 6,5 et 7, et a été vérifiée par spectrophotométrie. La solution a ensuite été purifiée par chromatographie Sephacryl et la fraction contenant les dodécamères a été recueillie. Puis, la fraction a été concentrée par ultracentrifugation à 4 500 g pendant 30 minutes à 4°C et a ensuite été filtrée avec un filtre à 0,2 µm. Les échantillons de dodécamère ont ensuite été conservés à -80°C avant leur utilisation.

## **2. Méthode d'évaluation cellulaire des ARNm par pPCR quantitative en temps réel.**

La technique de PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) permet d'amplifier *in vitro* de manière exponentielle des fragments d'ADN complémentaire (ADNc) grâce à des amorces spécifiques de l'ARN à étudier.

### 2.1. Technique d'extraction de l'ARN total

La technique d'extraction utilisée est commercialisée par la société Macherey-Nagel, elle consiste en une extraction des ARNs sur colonne grâce au kit RNA II®. Contrairement à la technique d'extraction classique au Trizol cette technique a comme inconvénient d'avoir un moins bon rendement, en revanche l'ARN extrait est de très bonne qualité.

Le principe général de cette technique repose sur les propriétés de fixation sélective de l'ARN sur le filtre de la colonne et sur l'élution du solvant à travers le filtre par des centrifugations successives.

La première étape a consisté soit à récupérer le tapis cellulaire en le grattant avec 350 µL de buffer RA1 additionné de 6 µL de TCEP soit à broyer environ 30mg de tissu avec dans un tube contenant 350 µL de buffer RA1 additionné de 6 µL de TCEP. Ce mélange a ensuite été filtré sur une colonne fournie dans le kit d'extraction, de manière à réduire la viscosité et à retenir les contaminants sur le filtre de la colonne tandis que le lysat cellulaire passe à travers le filtre et est récupéré dans un eppendorf. L'ARN

a ensuite été précipité avec de l'éthanol à 70%. Ce mélange a été filtré dans une autre colonne, de manière à retenir l'ARN sur le filtre de la colonne tandis que les contaminants passent à travers et sont éliminés. Puis les sels ont été éliminés par utilisation de MDB (Membrane Desalting Buffer) sur le filtre de la colonne. L'ADN génomique et l'ADN contaminant a été digéré par de la rDNase déposée sur le filtre. Le filtre a ensuite été lavé trois fois : une fois avec du buffer RA2 et deux fois avec du buffer RA3. La dernière étape a consisté à éluer l'ARN de la colonne à l'aide de 40 µL d'eau sans RNase provenant du kit d'extraction. Après extraction, les éluats ont été conservés à -80°C.

## 2.2. Evaluation qualitative et quantitative de l'ARNm total extrait

Après l'extraction de l'ARNm total, il est important de vérifier la quantité et la qualité d'ARN extrait à partir de chaque échantillon. La quantification de l'ARN extrait a été déterminée à partir d'1 µL d'échantillon à l'aide d'un spectrophotomètre NanoVue™ (GE Healthcare). Il permet de faire une mesure exacte de la densité optique de l'ARN à 260 nm et de celle des protéines à 280 nm. Le rapport DO 260/ 280, qui représente la pureté de l'extrait, ne doit pas être inférieur à 1,7, signifiant un excès de protéines dans l'échantillon qui pourrait avoir une incidence négative sur les résultats obtenus. La qualité de l'ARN est déterminée par une électrophorèse en gel d'agarose. Cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques en fonction de leur charge (négative) et de leur taille sous l'effet d'un champ électrique permettant ainsi de séparer l'ADN, l'ARN ou les protéines. Cette séparation va s'effectuer dans l'épaisseur du gel poreux d'agarose : les fragments de plus petite taille vont se déplacer plus rapidement et migrer plus loin que les fragments de taille supérieure.

Dans un premier temps, on réalise un gel d'agarose (1%) auquel sont ajoutés un intercalant de l'ADN/ARN, le SYBR safe ajouté au 1/10000<sup>ème</sup>, puis il est coulé dans un bloc pour migration. Les échantillons sont chargés dans les puits avec du gel loading dye 6X qui est un colorant utilisé pour charger les échantillons d'ADN/ d'ARN dans les puits et suivre la migration durant l'électrophorèse. Les bandes d'ARN ainsi séparées sont alors visualisées en lumière UV.

Si l'ARN est de bonne qualité, on retrouve 2 bandes bien distinctes, correspondant à l'ARN ribosomale (ARN majoritaire). Les ribosomes sont constitués de deux sous unités : une grande composée en majorité d'ARN 28S (« S » pour Svedberg : unité de mesure du taux de sédimentation) et une petite composée d'ARN 18S. Cette répartition étant retrouvée chez tous les eucaryotes. Si l'ARN est partiellement dégradé, plusieurs bandes apparaissent de manière moins visible. Si l'extrait possède de l'ADN génomique contaminant, une 3ème bande apparaît. L'échantillon ne sera donc exploitable que dans le premier cas.

### 2.3. La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR

Cette méthode de biologie moléculaire a été mise au point en 1985 par le prix Nobel Kary Mullis. Ce procédé permet d'obtenir une amplification importante d'un fragment d'ADN donné, grâce à l'utilisation d'une enzyme : une ADN polymérase résistante aux températures élevées, la Taq polymérase.

#### a) La transcription inverse

La technique de PCR permet de réaliser une amplification à partir d'ADN. Une étape de transcription inverse est donc nécessaire afin de transformer l'ARN en ADNc grâce à l'utilisation d'une enzyme, la transcriptase inverse ou « reverse transcriptase » (RT).

A cette fin, le kit de RT High Capacity cDNA (Applied Biosystems) a été utilisé. Suite à la quantification d'ARN extrait, une quantité de 2 µg a été déposée dans chaque puits de barrette de PCR à laquelle a été ajouté un volume d'eau sans RNase (DEPC), de manière à arriver à un volume final de 13 µL. Puis 2 µL de « RT primers » 10X contenant des amorces aléatoires ont été ajoutés à chaque échantillon. Un blanc ne contenant pas d'échantillon a également été réalisé lors de chaque RT, afin de vérifier que l'eau DEPC utilisée soit pure ou que les réactifs du kit ne soient pas contaminés avec de l'ARN exogène. Après une brève centrifugation, la barrette a été placée dans le thermocycleur (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) pour une première étape de 10 minutes à 65°C permettant de déshybrider les doubles brins d'ARN et des amorces. Puis, 5 µL d'un mix composé de 2 µL de tampon de RT 10X, d'1 µL de dNTP (désoxynucléotides triphosphate) 25X, d'1µL de reverse transcriptase et d'1 µL d'inhibiteur de RNase ont été ajoutés dans chaque puits. La barrette a ensuite été replacée dans le thermocycleur pour une étape de 10 minutes à 25°C permettant d'hybrider les amorces sur les ARN. Puis une seconde étape de 120 minutes à 37°C, qui est la température optimale pour l'action de l'enzyme, a permis la synthèse de l'ADNc. Enfin, une dernière étape de 10 minutes à 85°C inactive l'enzyme permettant de stopper la réaction de transcription inverse. Les échantillons d'ADNc ont ensuite été maintenus à une température de 4°C puis ont été conservés à -20°C dans l'attente de leur analyse en PCR.

## b) Principe général de la réaction PCR

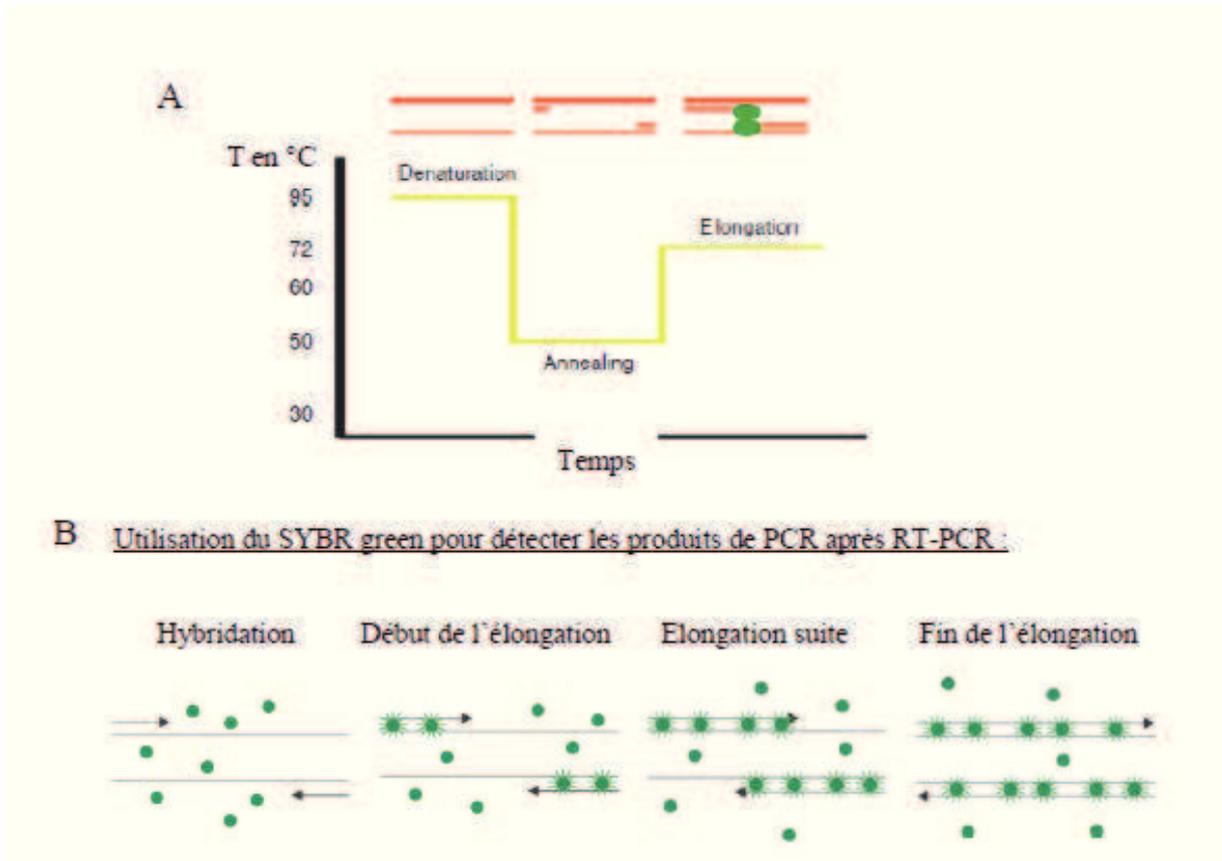
La Réaction par Polymérase en Chaîne (PCR) permet d'amplifier *in vitro* le nombre de copies d'une séquence spécifique d'ADN donné, afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une succession de réactions conduisant à la réplification d'une matrice d'ADN double brin, est répétée en boucle. Les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent alors de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle, elle est de l'ordre du million de copies en quelques heures.

Lors de chaque réaction, deux amorces oligonucléotidiques, dont les extrémités 3'OH pointent l'une vers l'autre, définissent la séquence à amplifier en la bornant.

Un cycle de PCR est composé de trois étapes (Figure 19):

- Une phase de **dénaturation** réalisée à une température de 95°C pendant 10 à 15 minutes. Cette étape permet de rompre les liaisons faibles qui assuraient la cohésion entre les deux brins d'ADN afin d'obtenir des matrices simple brin.
- Une phase d'**hybridation** réalisée entre 50 et 60°C en fonction des amorces utilisées, repose sur le principe de l'appariement des bases complémentaires. Cette étape permet aux amorces oligonucléotidiques sens et anti-sens spécifiques de la séquence à amplifier, de s'hybrider aux brins d'ADN matrice à une température thermodynamiquement favorable.
- Une phase d'**élongation** à 60°C pour les polymérases recombinantes. Cette étape permet à la polymérase de synthétiser des brins d'ADN complémentaires aux brins d'ADN matrice en ajoutant des nucléotides aux extrémités 3'OH libres des amorces hybridées. La polymérisation se fait à partir des dNTP libres présents dans le milieu réactionnel, composé de désoxy-adénosine triphosphate (dATP), de désoxy-cytosine triphosphate (dCTP), de désoxy-guanine triphosphate (dGTP) et de désoxy-thymidine triphosphate (dTTP).

Au cours de la PCR, la quantité d'ADN augmente et conduit à des modifications du milieu réactionnel qui devient de plus en plus défavorable à une bonne activité enzymatique, limitant le nombre de cycle (généralement compris entre 30 et 40 cycles).



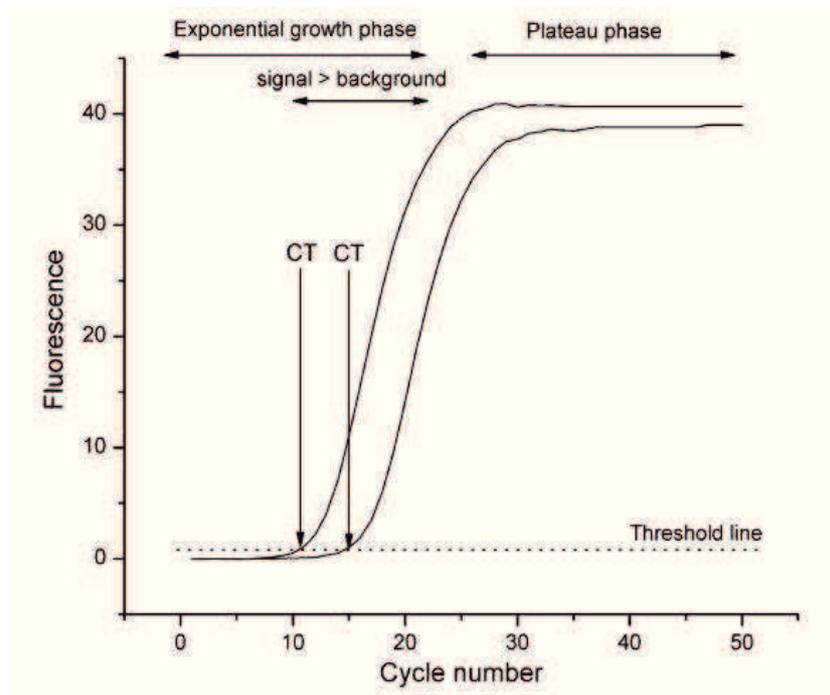
**Figure 19:** Représentation schématique des différentes phases d'une PCR (A)[182] et du principe de la technique de détection utilisant le SYBR green (B).

### c) La PCR en temps réel

La PCR quantitative en temps réel est utilisée pour la quantification de l'ARNm. La quantification relative permet d'observer le changement d'expression relative d'un gène d'intérêt dans un échantillon traité par rapport à un groupe de référence non traité. Cette quantification est réalisée par mesure d'un émetteur fluorescent : le SYBR green, qui est un agent se liant à l'ADN double brin au fur et à mesure de sa synthèse, pendant le processus d'amplification. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR (Figure).

Les valeurs de fluorescence sont enregistrées à chaque cycle et correspondent à la quantité d'amplicons produits en un point précis de la réaction. La PCR en temps réel est représentée sous la forme d'une courbe de réponse dont l'allure est celle d'une sigmoïde et où l'intensité de fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycle (Figure 20). Cette courbe est constituée de trois phases, la première phase dite de bruit de fond car, lors des premiers cycles, le signal est faible et se distingue donc peu du bruit de fond. Cette première phase est suivie d'une phase exponentielle d'amplification

puis d'une troisième phase en plateau qui marque la fin de la réaction, liée à un épuisement des différents réactifs du mélange réactionnel.



**Figure 20 :** Représentation graphique de la PCR en temps réel

La valeur de cycle correspondant au signal seuil c'est-à-dire le point où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond est appelée Ct (cycle threshold). La PCR quantitative en temps réel va permettre d'obtenir une grande précision de calcul (par la valeur décimale du Ct), une standardisation des expériences, une meilleure sensibilité que les techniques de PCR semi-quantitative.

Les niveaux relatifs d'expression des ARNm des échantillons ont été déterminés avec la méthode du  $2^{-\Delta\Delta CT}$  décrit par Livak et Schmittgen en 2001 [183]. En effet, l'ADNc est quantifié de manière relative en comparant le CT de chaque échantillon par rapport à un échantillon témoin. Pour cela, l'expression du gène cible a été normalisé par rapport à l'expression d'un gène rapporteur de référence (Ribosomal Protein L 19 (L19) ou Ribosomal Protein 18S (18S)), qui a priori ne varie pas dans nos différentes conditions expérimentales.

On calcule d'abord le  $\Delta CT$  pour l'échantillon 1 (E1) entre le gène à tester (X) et le gène de référence (R) :

$$\Delta CT_{E1} = CT_{X(E1)} - CT_{R(E1)}$$

Les résultats sont ensuite rapportés à un échantillon témoin en calculant le  $\Delta\Delta CT$  :

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{E1} - \Delta CT_{\text{témoin}}$$

Puis, la quantité relative d'ADN pour chaque échantillon par rapport au témoin a été déterminée d'après la formule  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Le résultat obtenu est un multiple de la quantité d'ADNc du témoin, ce qui permet de comparer les résultats entre eux.

#### d) Réalisation d'une plaque PCR

Après la reverse transcriptase, la quantité d'ADNc est de 2 µg dans 20 µL d'échantillon. Trois dilutions différentes ont été réalisées pour chaque échantillon, afin d'avoir comme concentrations finales : 0,1 ; 1 et 10 ng/µL d'ADNc. Après une dilution au ½ des échantillons, 2µL de ces solutions ont été chargés dans chaque puits de plaques 96 puits, correspondant à une quantité d'ADNc de 0,1, 1 et 10 ng. Un pool de l'ensemble des échantillons a été réalisé pour chaque dilution. Cette étape permet de tester l'efficacité des amorces utilisées lors de l'étude ainsi que de déterminer la concentration optimale d'échantillon à utiliser.

Une fois cette première étape de validation réalisée, la quantité optimale d'ADNc déterminée (généralement de 10 ng/puits) a été chargée en duplicat dans chaque puits à laquelle 18µL de mélange ont été ajouté. Ce mélange contient 2 µL d'amorce sens et anti-sens à une concentration finale de 500 nmol/L par puits ; 10 µL de mélange SYBR green (SYBR® green PCR Master Mix, Applied Biosystems), qui contient le marqueur fluorescent SYBR green, l'enzyme ADN polymérase et le dNTP dans un tampon approprié, et 6 µL d'eau DEPC. Les séquences des amorces utilisées dans ce travail sont détaillées dans le tableau. La PCR quantitative a été réalisée au moyen d'un thermocycleur couplé au système de détection ABI PRISM® 7300 (Applied Biosystems).

#### e) Conception des amorces spécifiques du génome porcin

« Afin d'être le plus spécifique possible, le choix des amorces permettant d'amplifier un fragment d'ADNc donné est primordial, en effet le couple d'amorces utilisé pour la RT-PCR ne doit pas reconnaître l'ADN génomique. Pour cela, nous avons utilisés le logiciel Primer Express (version 2.0) pour concevoir des amorces spécifiques du gène à étudier.

La première étape consiste à déterminer la limite entre les différents exons constituant l'ARNm d'intérêt. En effet, l'ARNm est uniquement composé d'exons et son ADNc suite à la transcription inverse, l'est également. En revanche, l'ADN génomique contaminant est composé d'introns et d'exons. En choisissant au moins une des amorces pour qu'elle s'hybride sur la jonction de deux exons dans l'ARNm, nous assurons une amplification spécifique de l'ADNc. En effet, l'amorce choisie ne

sera que partiellement complémentaire à la séquence de l'ADN génomique contaminant et elle n'aura pas assez d'affinité pour s'hybrider à la température d'hybridation choisie et elle se détachera.

De manière générale, plusieurs amorces (sens et anti-sens) obtenues pour un même gène ont été réalisées, puis leurs efficacités respectives ont été déterminées sur l'ADNc porcin. Le couple d'amorce ayant la plus grande efficacité a été retenu pour la suite des expériences.»

Voie	Gène	Amorce sens	Amorce Anti-sens
Stress oxydant	SOD1	GCAGGTCCTCACTTCAATCC	CAGAATCTTCGATGTACACAGTGG
Réponse à l'hypoxie	HIF1 $\alpha$	TGGCAGCAATGACACAGAAAC	GAGGCAGGCAATGGAGACAT
	VEGF	GCCCACTGAGGAGTTCAACATC	GGCCTTGGTGAGGTTTGATC
	Flt-1	TGACTACGTGGAAGTCATCG	CGGCCCTGAAGACACG
	EPO	TGGGCTGTGCCGAAA	TCCATGGCCTGCTGCT
Immunité innée	TLR4	GCTTTTTGTGGGCTGCAAA	GGAGTAGATAACAAAGGCGTCATAGG
	MCP1	TCTCCAGTCACCTGCTGCTAT	TGCTTCTTTAGGACACTTGCTG
Activation endothéliale	ICAM1	GGCTGTGCACTGCAACAAGA	TGTGGCAATGCCAAATCCT

**Tableau 1 :** Séquence des différentes amorces utilisées lors de l'évaluation tissulaire des ARNm par RT-qPCR

### 3. Méthode d'évaluation cellulaire par microscopie électronique

*Les analyses microscopiques ont été réalisées dans l'unité de pathologie ultrastructurale et expérimentale (responsable Pr Jean Michel Goujon) au sein du laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU de Poitiers dirigé par le Pr. Pierre Levillain.*

#### 3.1. Fixation

Le tapis cellulaire est préalablement rincé avec du PBS 1X puis les cellules sont fixées avec du glutaraldéhyde 3 % qui fixe en priorité les protéines. Les cellules sont raclées puis centrifugées 2 000

tr/min pendant 15 minutes. Les culots obtenus sont post fixés avec le tétr oxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ) à 1%, oxydant qui crée des pontages entre les doubles liaisons des lipides insaturées et crée des ponts.

### 3.2. Inclusion

L'inclusion a pour but de substituer l'eau du culot cellulaire par de la résine époxy : l'Araldite. Sa polymérisation contrôlée permet d'obtenir un bloc dur. L'Araldite étant une résine hydrophobe, une déshydratation préalable est donc indispensable pour qu'elle pénètre dans le culot de cellules. La déshydratation cellulaire a été réalisée grâce à un agent de déshydratation miscible à l'eau, l'acétone, en concentration croissante. Puis, les échantillons placés dans la résine sont ensuite mis à polymériser à  $60^\circ\text{C}$  pendant 24 heures ce qui permet d'obtenir des blocs suffisamment durs pour la coupe.

### 3.3. Coupes semi-fine et ultrafine

Après polymérisation, des coupes semi-fines d' $1\mu\text{m}$  d'épaisseur, colorées au bleu de Toluidine permettent de repérer les cellules.

On réalise ensuite des coupes ultrafines de 60 nm d'épaisseur que l'on récupère sur des grilles de cuivre.

### 3.4. Contraste

Le contraste, qui est dû à une différence de transmission des électrons dans l'échantillon, est réalisé à l'aide de l'association d'acétate d'uranyle et de sels de plomb. Les grilles portant les coupes sont déposées sur des gouttes d'acétate d'uranyle à 4% en solution alcoolique 70% durant une minute, puis elles sont placées sur une solution de Reynolds (citrate trisodique et nitrate de plomb) durant dix minutes. Ces gouttes sont déposées dans une boîte de Pétri contenant des pastilles de soude qui absorbent le  $\text{CO}_2$  afin d'éviter la précipitation du plomb en carbonate de plomb. Après séchage, les grilles sont observées grâce à un microscope électronique à transmission (MET), JEOL 1010, équipé d'une caméra GATAN pilotée par un logiciel de traitement d'images.

L'utilisation des électrons va permettre d'améliorer la résolution et de visualiser l'ultra structure cellulaire.

## 4. Statistiques

« Les valeurs moyennes ont été calculées pour chaque échantillon et exprimées en valeur moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM).

La significativité des différences de moyennes entre les groupes a été déterminé par une analyse de variance (ANOVA) à 1 facteur, suivie par un test de Student-Newman-Keuls pour l'analyse de comparaisons multiples. Le test T de Student non apparié a été utilisé pour comparer les résultats des différents tests métaboliques et de ceux obtenus en PCR quantitative en temps réel.

Des comparaisons par rapport au témoin ont été réalisées, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Des comparaisons inter-groupes ont aussi été réalisées et  $p < 0.05$  a été considéré comme significatif. »

# C. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX D'AUTO TRANSPLANTATION DANS UN MODELE DE PORC LARGE WHITE

## 1. Modèle animal

Mis en place en 1994, le modèle porcin (race *Large White*) de transplantation rénale est actuellement utilisé en routine au sein de la plate-forme IBiSA d'expérimentation préclinique labellisée en 2008, implantée sur le site de l'INRA de Surgères (Domaine du Magneraud).

Cette plate-forme est spécialisée dans le développement des modèles animaux porcins permettant de reproduire des situations physiopathologiques rencontrées lors de la transplantation rénale en clinique humaine. Tous les protocoles expérimentaux sont réalisés en conformité avec la législation émanant du Ministère de l'Agriculture.

Pour des raisons techniques, les porcs utilisés pour ces études sont des mâles âgés de trois mois et pesant entre 35 et 40 kg, qui ont la particularité de présenter des reins de taille et de poids similaires à l'homme [288].

Pour nos études, nous avons utilisé les modèles chirurgicaux d'auto transplantation développés et validés dans notre laboratoire depuis plusieurs années.

## 2. Protocole d'anesthésie

« Les animaux ont été placés en box individuel, soumis à une température ambiante constante de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , permettant ainsi un suivi des animaux pendant plusieurs mois post-greffe (jusqu'à 6 mois). Ils ont été nourris avec un régime standard (Société Arrive, Saint Fulgent, France) et ont eu un accès libre à l'eau. Ils ont été mis à jeun 24 heures avant l'intervention chirurgicale.

Les animaux ont été anesthésiés au masque de Hunter (Figure 23) par un mélange gazeux composé initialement de Sévoflurane (Sévorane®, Abbott, France) à 8% puis à 4% associé à du protoxyde d'azote et de l'oxygène en proportions égales. Le Sévoflurane a ensuite été remplacé par de l'isoflurane à 2% (Forène®, Abbott).

Un cathéter jugulaire externe gauche de 20-gauges en plastique (Becton Dickinson Vascular Access Inc. Sandy, UT, USA) a été posé par abord chirurgical, extériorisé après un trajet sous-cutané derrière l'oreille gauche. Ce cathéter a été laissé en place pendant les quinze jours post-transplantation

pour assurer l'administration intra-veineuse de solutés de réanimation, d'analgésiques et pour permettre les prélèvements sanguins.

Une sonde d'intubation oro-trachéale (n°6,5) a également été mise en place. Du sulfate d'atropine à 10 µg/kg a été injecté par voie intra-veineuse pour réduire les sécrétions pharyngées et trachéales et pour prévenir les bradycardies post-intubation.

La curarisation de l'animal a été effectuée par injection intraveineuse de bromure de pancuronium en *bolus* (0,15 mg/kg, Pavulon®, Organon, France).

Nous avons pratiqué une ventilation assistée avec une fréquence respiratoire de 16 cycles par minutes et un maintien du taux de CO<sub>2</sub> expiré entre 35 et 45 mmHg (Respirateur LKB medical, Engstrom System, Stockholm).

L'analgésie a été assurée par l'injection de 0,25 mL/kg de Xylocaïne adréalinée® à 1% (Astra Zeneca, France) par un cathéter péridural Portex® (16G) introduit par ponction percutanée en position sacro-coccygienne, une ré-injection de 0,125 mL/kg a eu lieu toutes les heures. Ce cathéter a été retiré en fin d'intervention.

Avant la transplantation, un cathéter carotidien droit a été mis en place par abord chirurgical, permettant un contrôle instantané et permanent de la pression artérielle. Ce cathéter a été retiré en fin d'intervention.

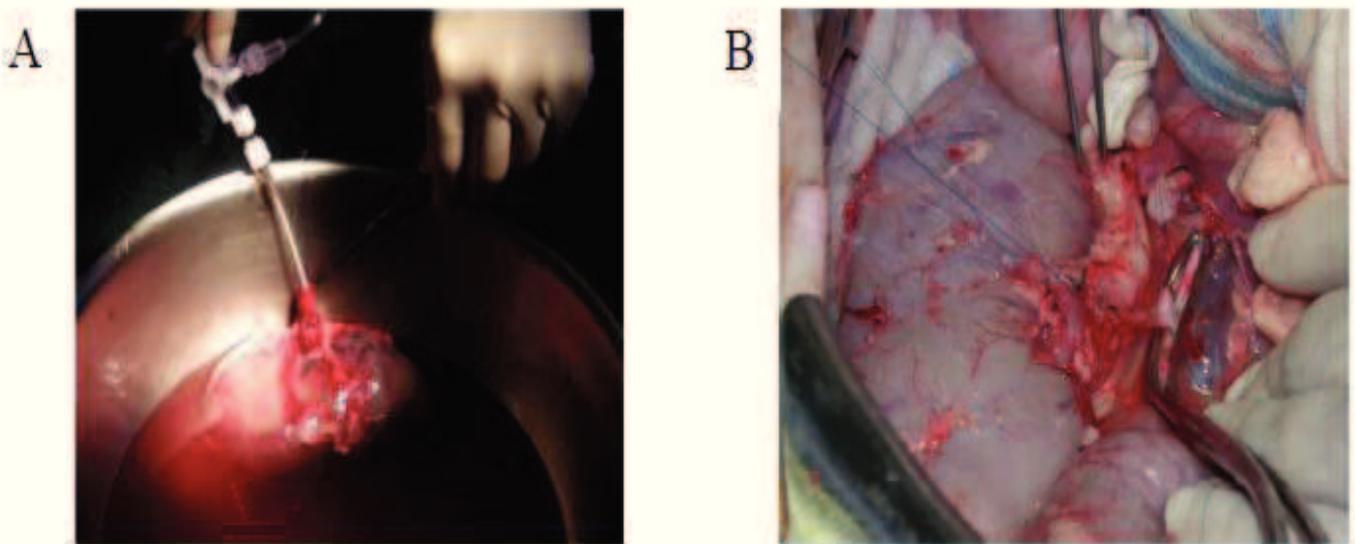
La surveillance per-opératoire a été assurée par le contrôle de la fréquence cardiaque et de la saturation en oxygène. Les pertes sanguines ont été compensées par 10 mL/kg/h de gelofusine 4%. Après l'intervention chirurgicale (prélèvement et greffe), les animaux ont été placés en cages métaboliques dans des stalles d'observation post-opératoires pendant plusieurs jours selon la récupération de l'animal. »

### **3. Modèles chirurgicaux**

« Les opérations chirurgicales ont été réalisées par les équipes des services de chirurgie viscérale et vasculaire, ainsi que du service de chirurgie cardio-thoracique du CHU de Poitiers. Ces opérations ont été assistées par une équipe de techniciens INRA compétents en anesthésie porcine et dans l'entretien et la surveillance de ces animaux. De plus, les conditions utilisées sont identiques et reproduisent les conditions existantes en clinique humaine. En effet, cette plateforme est dotée d'un équipement permettant la ventilation assistée et le monitoring cardiaque ainsi que tous les outils nécessaires à la réalisation de la greffe dans les conditions optimales jusqu'à la surveillance en salle de réveil thermostatée.

Une fois que l'animal a été anesthésié et après désinfection de la zone cutanée d'intérêt à la polyvidone iodée, le rein gauche a été dégagé du tissu qui l'entoure et le pédicule a été disséqué avec individualisation de l'artère et de la veine rénale gauche. L'uretère a ensuite été disséqué sur dix centimètres et sectionné après ligature à son extrémité distale.

Le rein gauche a été prélevé et plongé dans du liquide physiologique à 4°C, pour permettre un refroidissement rapide de l'organe. Un cathéter de 14 gauges a été introduit dans l'artère rénale, pour permettre le lavage du rein par 300 à 500 mL de solution de conservation (Figure 21A). Le rein a alors été pesé et placé dans un conteneur stérile rempli avec de la solution de conservation déjà à 4°C, et conservé *ex vivo* à la même température pendant 24h. La cavité abdominale de l'animal a été suturée. »



**Figure 21 :** Photos représentant: (A) le lavage du rein par l'artère rénale après son prélèvement et avant sa conservation, (B) la greffe rénale.

« Le modèle d'auto-transplantation consiste à transplanter au même animal le rein prélevé et conservé. Après le prélèvement du rein gauche mentionné plus haut, nous avons laissé les animaux réveillés dans des cages métaboliques, et nous les avons gardé à jeun et hydraté par deux litres de sérum physiologique. A la fin des 24h de conservation *ex vivo* du rein gauche, les animaux ont été ré-anesthésiés et auto transplantés avec leur rein (Figure 21B). La durée d'anastomose a été d'environ 30±5 minutes. Elle correspond au temps mis par les chirurgiens pour raccorder l'artère et la veine rénale de l'animal à celles du rein conservé, par suture vasculaire. Une anastomose urétéro-vésicale a été réalisée sur une sonde simple J par deux hémi-surjets de Maxon® 4/0, pour permettre d'évacuer l'urine produite vers la vessie. Puis en fin d'intervention le rein a été placé dans une loge sous-

péritonéale qui a été fermée pour éviter que le rein se déplace dans l'abdomen de l'animal après la greffe.

La transplantation a été suivie d'une néphrectomie controlatérale du rein droit, afin de se rapprocher de la masse néphronique présente en clinique humaine. »

#### **4. Suivi post-greffe des animaux**

« Suite à l'opération, l'animal encore anesthésié a été placé dans une cage métabolique de contention dans une salle de réveil thermostatée et de suivi post-opératoire, pendant plusieurs jours selon la récupération de l'animal. Grâce au cathéter jugulaire externe gauche posé derrière l'oreille de l'animal, des prélèvements de sang ont été régulièrement effectués (à J0, J1, J3, J7, J14, 1 et 3 mois) notamment pour suivre l'évolution du taux de créatinine. Grâce aux cages métaboliques, les urines ont également été récupérées dès 24h et aux mêmes temps post-greffe que les prélèvements sanguins. Ces prélèvements sanguins et urinaires ont permis de suivre l'évolution de la fonction rénale de l'animal. »

#### **5. Sacrifice des animaux**

« De façon à respecter les règles d'éthique, les animaux opérés ont été sacrifiés s'ils présentaient une anurie supérieure à cinq jours après le déclampage ou s'ils présentaient un état de souffrance généralisé.

Dans notre projet, les animaux ont été sacrifiés à plus ou moins long terme selon les conditions définies dans le protocole expérimental. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à des temps de reperfusion post-greffe courts : 3h (**H3** : Hour 3), 3 jours (**D3** : Day 3) et 7 jours (**D7** : Day 7) et longs : 3 mois (**M3** : Month 3). Au terme de l'expérience, l'animal a été anesthésié afin de prélever son rein, qui a été immédiatement sectionné en tranches fines, incluant de la zone corticale et de la médullaire rénale. Ces échantillons de tissu ont été placés dans du formol tamponné à 10%, pour permettre la réalisation de l'analyse histologique.

De plus, des morceaux de zone corticale (cubes de quelques millimètres pesant de 50 à 100 mg) ont également été prélevés et disposés dans des tubes eppendorf RNase free de 1,5 mL préalablement identifiés. Ces tubes ont été directement plongés dans de l'azote liquide afin de congeler rapidement et profondément le tissu, permettant de le conserver à -80°C pendant plusieurs mois en vue des analyses transcriptomiques et protéomiques. »

## D. METHODES RELATIVES AU MODELE *IN VIVO*

### 1. Analyse des paramètres biochimiques fonctionnels

*Le dosage des paramètres biochimiques a été réalisé sur l'automate Modular automatic analyser (Roche Diagnostics, France) situé dans le service de Biochimie du CHU de Poitiers, dirigé par le Pr. Gérard Mauco.*

« La reprise de fonction des reins qui ont été soumis aux différentes conditions d'IR, a été évaluée par le dosage de la créatinine plasmatique et urinaire, la clairance de la créatinine, la fraction d'excrétion du sodium (FeNa<sup>+</sup>), la protéinurie et l'osmolarité.

La créatinine est une molécule hydrosoluble issue du métabolisme musculaire. Elle est principalement éliminée par filtration glomérulaire mais aussi par sécrétion tubulaire, et n'est pas réabsorbée au niveau du tubule. Cette molécule va donc se retrouver complètement excrétée dans les urines, ce qui en fait un bon reflet de la filtration glomérulaire. Le dosage de la créatinine a été réalisé dans les échantillons de sérum et d'urine. Cette méthode de dosage fait appel à la méthode de Jaffé décrite par Seelig, puis modifiée par Bartels et coll. en 1969 [184-186]. En milieu alcalin, la créatinine forme avec l'acide picrique un complexe jaune orangé, qui pourra être dosé par colorimétrie. La vitesse de formation de la coloration est proportionnelle à la concentration en créatinine (μmol/L) dans l'échantillon.

La clairance rénale représente le volume de sang ou de plasma complètement épuré d'une substance par le rein, par unité de temps. La clairance de la créatinine, qui est une substance complètement filtrée et non réabsorbée reflète exactement le débit de filtration glomérulaire. La clairance de la créatinine (CCR) est calculée comme suit :

PCR= Concentration plasmatique de la créatinine en mmol/mL

UCR= Concentration urinaire de la créatinine en mmol/mL

V = Débit urinaire en mL/min

$CCR \text{ (mL/min)} = UCR \times V / PCR$

La fraction d'excrétion du sodium (FeNa<sup>+</sup>) est une mesure du pourcentage de sodium excrété dans les urines par rapport au sodium réabsorbé par le rein. En effet, le sodium est normalement réabsorbé au niveau de différents segments du tubule rénal. Lorsque le tubule est lésé, la valeur de la fraction d'excrétion du sodium augmente signifiant que sa capacité normale de réabsorption est altérée. La fraction d'excrétion du sodium se calcule en fonction de la créatininémie, de la créatinurie, de la natrémie et de la natriurèse.

PCR= Concentration plasmatique de la créatinine en mmol/mL

UCR= Concentration urinaire de la créatinine en mmol/mL

P<sub>Na</sub>= Concentration plasmatique du sodium en mmol/mL

U<sub>Na</sub>= Concentration urinaire du sodium en mmol/mL

$$\text{FeNa+ (\%)} = (\text{U}_{\text{Na}} \times \text{PCR}) / (\text{P}_{\text{Na}} \times \text{UCR}) \times 100\text{v}$$

La quantité de protéines urinaires ne doit normalement pas être supérieure à 0,15 g/24h. Une protéinurie élevée est le reflet de lésions de la barrière de filtration glomérulaire et/ou tubulaire, qui ne laissent normalement passer qu'une quantité limitée de protéines. Les protéines urinaires sont dosées par la méthode colorimétrique au rouge de pyrogallol. L'action du complexe rouge de pyrogallol-molybdate se traduit par une réaction colorée. Le maximum d'absorption passe alors de 467 nm à 598 nm. La densité optique mesurée à 598 nm est proportionnelle à la concentration de la solution en protéines.

L'osmolarité de l'urine et du plasma ont été déterminées par la mesure du point de congélation, avec un osmomètre (Hermann Roebling Messtechnik, Berlin, Allemagne). Le ratio de l'osmolarité du plasma sur l'urine est déterminé pour évaluer la capacité de concentration du rein. La mesure de l'osmolarité en osmol dans les urines permet une évaluation de la filtration glomérulaire et de la réabsorption des électrolytes. »

## 2. Analyse des paramètres histologiques

### 2.1. Préparation des tissus

*Les analyses histologiques ont été réalisées au sein du laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU de Poitiers dirigé par le Pr. Pierre Levillain et en lien avec le Pr. Jean Michel Goujon.*

Les techniques histologiques sont utilisées dans le but de quantifier les modifications histologiques rénales, suite aux différentes séquences d'IR utilisées dans nos protocoles expérimentaux.

Les échantillons de rein destinés à une étude histologique ont préalablement été fixés dans du formaldéhyde à 4%, dès son prélèvement à la fin du protocole expérimental. Les échantillons ont ensuite été déshydratés toute une nuit par passage dans des bains d'éthanol de concentration croissante, avant d'être inclus en paraffine. Des coupes de 3 µm d'épaisseur ont ensuite été réalisées au microtome et collées sur des lames. Juste avant les colorations ou les immunomarquages, les lames ont été déparaffinées par passage dans des bains d'histosol (Fisher HealthCare, Thermo Fischer Scientific, France) et réhydratées par des bains d'éthanol, dans l'eau distillée, de concentrations décroissantes.

### **3. Evaluation des lésions histologiques du rein**

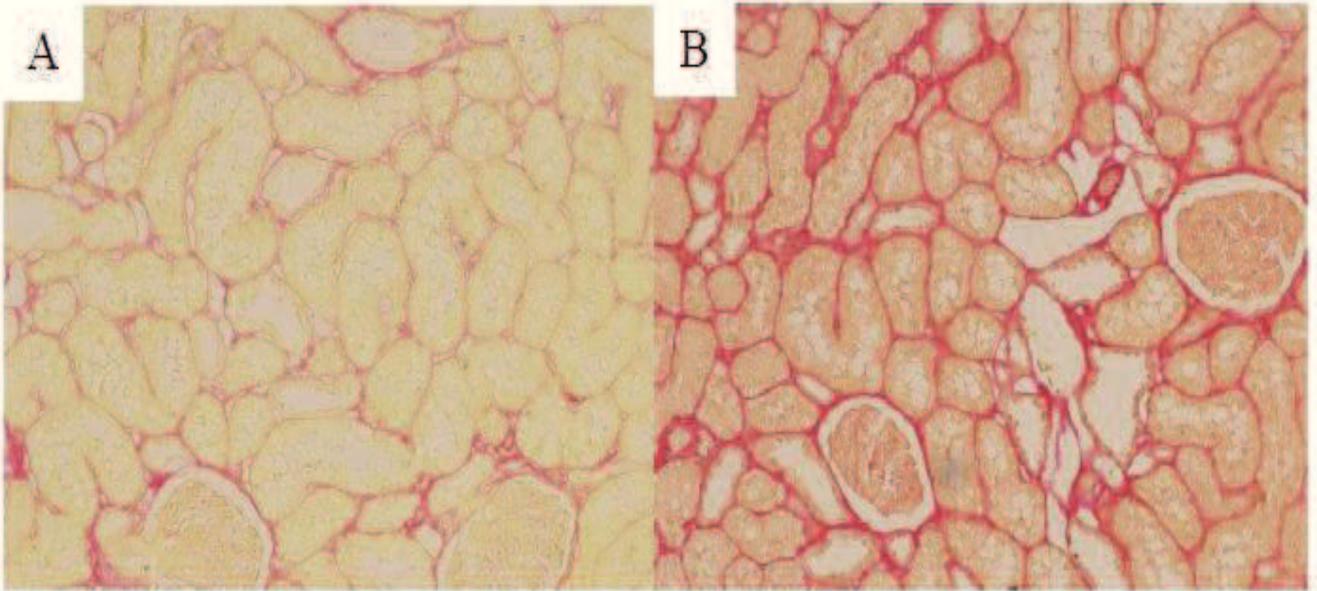
Les lames ont été colorées par coloration standard à l'Acide périodique de Schiff (PAS). La coloration PAS met en évidence les mucines (épithélium à bordures en brosse), les membranes basales et le glycogène. La réaction à l'acide périodique de Schiff correspond à l'oxydation de certains polysaccharides par l'acide périodique, révélée par une coloration rouge (fixation de la leucofuchsine de Schiff). Cette coloration a permis d'évaluer certains critères morphologiques comme la perte de bordure en brosse et le détachement endoluminal des cellules épithéliales des tubules rénaux proximaux mais également l'atrophie tubulaire à 3 mois.

L'interprétation histologique a été réalisée en aveugle, par le Pr Jean-Michel Goujon, anatomopathologiste. L'intensité des lésions a été évaluée de manière semi-quantitative grâce à une échelle allant de 0 à 5 selon une méthode déjà validée au laboratoire [187]:

- 0 : aucunes lésions ;
- 1 : <10% de lésions ;
- 2 : 10-25% de lésions ;
- 3 : 25-50% de lésions ;
- 4 : 50-75% de lésions ;
- 5 : plus de 75% de lésions.

### **4. Evaluation de la fibrose interstitielle**

Les lames ont été colorées par coloration au Rouge Sirius ou Picrosirius. « Cette technique, décrite par Sweat en 1964, utilise le colorant Rouge Sirius F3B dilué dans de l'acide picrique pour colorer en rouge les fibres de collagène qui sont caractéristiques de la fibrose interstitielle (Figure 22) [188]. Une évaluation de la fibrose a été réalisée grâce au logiciel d'analyse d'images Visilog. Un seuillage de l'image permet d'isoler les zones rouges (fibrose) du fond de la préparation. Le logiciel quantifie les surfaces fibrosées par rapport à la surface de chaque champ (10 champs sont observés par prélèvement). Les résultats sont exprimés en pourcentage.



**Figure 22 :** Marquage de la fibrose tubulo-interstitielle par coloration au Rouge Sirius (A) d'un rein de porc présentant moins de 5% de fibrose contrairement à (B) un rein ischémié contenant 25 % de fibrose (objectif x100).

# VI. PREMIERE PARTIE : LES TEMPERATURES

# A. INTRODUCTION

Dans cette première partie, nous nous sommes intéressés aux effets de la modulation de la température lors de la conservation sur les lésions d'IR.

## 1. Les effets délétères de la conservation hypothermique à 4°C

Actuellement, la majorité des centres utilisent la conservation à 4°C pour préserver les reins. Toutefois, cette méthode de préservation est, aujourd'hui, remise en question. En effet, la conservation à froid a trois limites fondamentales. La première correspond aux dommages causés par l'hypothermie elle-même, la seconde est la difficulté à évaluer la fonction et à prédire la viabilité durant la conservation et la troisième est que les lésions d'IR sont inévitables [189]. L'hypothermie, mise en place dans les années 1950 à 1960, au cours des premières transplantations, reposait sur le principe d'inhibition métabolique par le froid. Effectivement, le métabolisme est réduit de moitié par diminution de la température de 10°C. Ainsi à 4°C, il subsiste donc un métabolisme de 10-12% ne permettant pas de mettre complètement la cellule au repos. Ajouté à cela, cette diminution du métabolisme la rend difficilement capable de mettre en place des systèmes de défense. Il a été démontré que l'hypothermie et l'hypoxie suivie de la réoxygénation et du réchauffement conduisent à la dégradation de l'intégrité cellulaire [2, 3], à l'acidose, à la perte d'ATP [4], à une réaction inflammatoire [5], à l'apoptose liée à la perméabilisation de la membrane mitochondriale [6], et à la génération d'EOR qui vont directement endommager les tissus [7]. Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles conditions de préservation des greffons, afin de limiter les lésions d'IR. L'utilisation de l'hypothermie apparaît comme un facteur limitant dans l'indication d'expansion des donneurs, notamment concernant l'utilisation des organes ayant subi une ischémie chaude (donneur DDAC) avant la conservation à froid [190, 191].

## 2. Nouvelles conservations envisagées

Afin de permettre la survie à court et long terme des greffons et l'utilisation des donneurs marginaux, de nouveaux modes de conservation ont donc été envisagés tels que la conservation normothermique (37°C), subnormothermique (27°C à 32°C) et la conservation à des températures intermédiaires (15°C à 27°C).

Concernant la subnormothermie, Hamamoto et coll. [192] ont démontré chez des moutons soumis à 60 min d'occlusion de l'artère coronaire que la taille de l'infarctus a été progressivement réduite lorsque la température cardiaque au cours de l'ischémie et de la reperfusion a été abaissée par décrets de 1°C de 39,5 à 35,5°C. Décrémenter la température au cours de l'ischémie dans une gamme légère d'hypothermie a démontré un puissant effet anti-infarctus dans de nombreuses études. Chien et al. [193] ont également rapporté que, pour chaque degré décrets de la température corporelle (l'hypothermie a été appliquée au corps entier) chez le lapin soumis à 30 min d'ischémie suivie d'une reperfusion, la taille de l'infarctus a été réduite en moyenne de 8% de la zone à risque.

L'hypothermie légère corporelle atténue également le phénomène de « no reflow », la dysfonction ventriculaire post-ischémique, et le remodelage du cœur. Comme l'ont souligné deux revues récentes, la preuve d'un effet cardioprotecteur de l'hypothermie légère thérapeutique contre les lésions ischémiques est très forte [194]

Le mécanisme par lequel une légère hypothermie produit ses effets cardioprotecteurs est probablement multifactoriel. Elle a été associée à un large éventail de mécanismes de protection qui pourraient diminuer les lésions d'IR. Ces derniers comprennent l'induction de protéines de choc thermique, la réduction de l'apoptose, la diminution de l'activation du complément et la réduction de la dégranulation des neutrophiles. Une légère hypothermie a également été observée [195, 196] pour limiter la lésion microvasculaire associée à des lésions de reperfusion myocardique [192].

Cet effet cardioprotecteur de l'hypothermie légère (32-35°C) au cours de l'ischémie aiguë du myocarde a été confirmé dans différents modèles animaux : chez le lapin [195, 197-200], le chien [201], le porc [202-204], le rat [205] et le mouton [196]. Dans un modèle d'ischémie cardiaque chez le porc, l'hypothermie légère a démontré qu'elle pouvait réduire la mortalité aiguë, améliorer les paramètres hémodynamiques et réduire l'acidose métabolique [206].

Une hypothermie légère (> 30°C) diminue également le taux de phosphate à haute énergie et l'utilisation du glucose ainsi que l'accumulation du lactate mais dans une moindre mesure qu'une hypothermie plus profonde (17°C). Une hypothermie plus profonde peut modifier l'échange d'ions car elle inhibe les échangeurs sarcoplasmiques  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , même si elle active, paradoxalement, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . De façon intéressante, il a été observé que les grenouilles en hibernation augmentent leur résistance à l'hypoxie par une diminution de la demande en ATP grâce à la réduction de l'activité  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase [207]. La protection offerte par l'hypothermie légère n'impliquerait pas seulement la préservation énergétique et métabolique mais aussi l'activation des voies de signalisation

de la survie. La réduction des lésions pendant l'ischémie semble réduire la prédisposition à la formation du mPTP (mitochondrial permeability transition pore) durant la reperfusion [206]

Ning et al. ont démontré qu'une cardioplégie froide (30°C) préserve l'expression de gènes de protéines mitochondriales durant l'hypoxie, y compris les gènes codant pour HSP70, ANT1 et b F1 -ATPase [208, 209].

De plus, ils ont également montré que l'hypothermie modérée (30°C) préserve l'intégrité structurelle et les voies métaboliques et favorise l'expression des protéines impliquées dans la survie cellulaire ainsi que l'inhibition de la protéine p53 [210]. Il est donc raisonnable de penser qu'une légère hypothermie pourrait déclencher cette protection grâce à des capteurs thermiques. Cette hypothèse est étayée par des études du groupe d'Halestrap, qui a indiqué qu'une courte période de perfusion à 26°C dans des cœurs isolés de rat induit une protection qui augmente la translocation de la protéine kinase C- $\epsilon$  à la fraction particulaire et phosphoryle la protéine kinase activée par l'AMP [207].

Une autre étude dans un modèle de cœurs de lapins isolés perfusé selon la méthode Langendorff a également démontré que l'hypothermie à 30°C préservait l'intégrité structurelle et fonctionnelle cardiaque pendant plusieurs heures après un accident ischémique. De plus, ils ont observé que l'hypothermie diminue l'utilisation de l'énergie qui est au moins partiellement responsable du maintien de la fonction mitochondriale post-ischémique et la préservation relative de l'ATP, déjà observé chez le lapin [210]. De plus, elle favorise l'expression de HIF 1 $\alpha$ , HO-1, PPAR  $\beta$  (peroxisome proliferator-activated receptors  $\beta$ ) et Akt-1. Ceci a étayé l'hypothèse d'un rôle attractif pour la transduction du signal dans l'action de l'hypothermie [206].

Yang et al. ont démontré, quant à eux, dans un modèle *in vitro* de cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC) soumises à une IR que l'hypothermie à 33°C réduit nettement l'apoptose des cellules endothéliales suite à l'IR par l'atténuation à la fois des voies extrinsèques et intrinsèques, la modulation de JNK1 / 2 et l'amélioration de l'expression MKP-1 [211]. Ces résultats ont également été démontrés dans un modèle de cardiomyocyte de rat, dans lequel, il a été observé que l'hypothermie à 33°C inhibait le stress oxydatif induit par l'IR et l'apoptose par le renforcement de l'expression de l'anti-apoptotique Bcl-x et réprimait l'expression de p53 [212].

Enfin, dans une analyse de microarrays également réalisé sur des HUVEC soumises à une ischémie, il a été montré que l'hypothermie à 33°C modifie significativement l'expression d'un grand nombre de gènes liés à des processus et des fonctions biologiques importantes. Le cycle cellulaire, l'apoptose et la prolifération cellulaire semble être impliqué dans les plus importants processus surexprimés. Les chimiokines et l'adhérence cellulaire ont été parmi les processus inflammatoires les plus significativement sous-exprimés ainsi que les transporteurs transmembranaires et l'activité lipase.

Tous ces résultats sont proposés pour jouer un rôle de premier plan dans les effets induits par l'hypothermie légère [213].

La conservation à une température intermédiaire semble aussi être une judicieuse alternative. Effectivement, l'équipe de Biberthaler, qui a réalisé la seule analyse systématique en faisant varier les températures au cours de l'ischémie dans un modèle hépatique murin, a constaté que l'effet dit de protection de l'hypothermie dans le foie est déjà rencontrés à 26°C. Une réduction supplémentaire de la température n'a pas induit une protection supplémentaire contre les lésions d'IR. Ces résultats sont appuyés par Imakita et al., qui ont rapporté un effet bénéfique du refroidissement (23°C) local intra ischémique de foies canin et humain lors de la résection [214]. L'effet protecteur a été démontré par l'amélioration de la microcirculation, la réduction de la réponse inflammatoire, et l'amélioration de l'intégrité structurelle hépatocellulaire visualisé par microscopie électronique [215].

Khandoga et al. ont observé un impact protecteur de l'hypothermie légère, 15°C à 26°C, sur les lésions tissulaires induit par le stress oxydatif durant l'IR. De plus, ils ont démontré que cette hypothermie réduisait la production de EOR intracellulaire initial grâce à la prévention de la dégradation de l'AMP avec l'accumulation de l'hypoxanthine [216].

Enfin, Gowing et Dexter ont démontré que l'abaissement de la température corporelle à 22°C lors d'une occlusion des artères rénales durant 60 min chez le rat prévient presque totalement la nécrose tubulaire. Il a également été observé qu'une légère hypothermie continu (pendant et après l'ischémie) à 32°C, produit par refroidissement externe, confère une protection fonctionnelle et morphologique presque totale pendant 25 minutes d'occlusion de l'artère rénale [217].

Des effets bénéfiques sont également observés lors de la conservation des organes à une température intermédiaire contrairement à des températures de conservation plus faible dans la machine de perfusion. En effet, dans un modèle hépatique d'ischémie chaude d'une durée de 60 minutes induite par un arrêt cardiaque chez le rat, Olschewski et al. ont montré que la machine de perfusion oxygénée améliore la viabilité du foie suite à une ischémie chaude prolongée. Contrairement à la conservation à 4°C ou 12°C, la conservation à 21 °C en machine de perfusion a un effet bénéfique sur la fonction de l'organe et l'intégrité structurelle de l'endothélium sinusoidal [218].

Ces données ouvrent des voies intéressantes pour faire évoluer les conditions de conservation.

## B. RESULTAT: EVALUATION DES EFFETS DE DIFFERENTS DEGRES D'HYPOTHERMIE LORS DE L'ISCHEMIE REPERFUSION RENALE

Mallet V, Giraud S, Goujon J-M, Quellard N, Fernandez B, Thuillier R et Hauet T

### 1. Objectifs de l'étude

Actuellement, la majorité des centres de transplantation, conservent les greffons avec la solution de préservation UW à 4°C. Toutefois, cette condition de préservation est aujourd'hui remise en question. En effet, la conservation en hypothermie sévère a trois limites fondamentales : la première concerne les dommages causés par l'hypothermie elle-même, la seconde est la difficulté à évaluer la fonction et prédire la viabilité durant la conservation et la troisième est que les lésions d'IR sont inévitables et potentiellement irréversibles [189]. Il a été démontré que l'hypothermie aggrave les lésions d'IR notamment la surconsommation d'ATP, la diminution de synthèse la dégradation de l'intégrité cellulaire, la mortalité cellulaire et la génération d'EOR à la reperfusion. L'utilisation de l'hypothermie sévère apparaît donc comme un facteur limitant dans la conservation des greffons, notamment concernant l'utilisation des organes ayant subi une ischémie chaude avant la conservation en hypothermie, c'est-à-dire ceux provenant de DDAC [190, 191].

La présente étude a consisté à étudier, dans un premier temps, l'impact de différentes températures de conservation sur les lésions d'IR, dans un modèle *in vitro* de cellules endothéliales rénales porcines. L'objectif principal ce travail a été d'évaluer la conservation du métabolisme mitochondrial et de ses principaux complexes enzymatiques afin de déterminer la conservation de l'intégrité de la mitochondrie par mesure indirect de la fuite du cytochrome c (caspase 9) et par évaluation de l'aspect morphologique par microscopie électronique. En effet, la mitochondrie étant une des principales cibles des lésions d'IR, la conservation du métabolisme et de l'intégrité de cette organelle est donc une priorité dans le maintien des fonctions cellulaires. Dans un deuxième temps, nous avons également étudié deux de ces températures lors de la conservation *ex vivo* de reins de porc afin d'observer l'effet de celles-ci dans l'organe entier.

## 2. Protocoles utilisés

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons utilisé, dans la première partie de l'étude, une culture primaire de cellules endothéliales microvasculaires, isolées au laboratoire à partir de rein de porc *Large White*. Ce modèle est particulièrement intéressant car il permet des études très reproductibles et rapides. L'atout majeur de notre étude cellulaire est de cibler une population d'intérêt et d'en étudier ses fonctions, les cellules endothéliales étant les premières cibles des lésions d'IR. Ce modèle *in vitro* a été mis en place au laboratoire en 2008 et il est maintenant utilisé en routine. L'étude sur le modèle cellulaire a été effectuée en reproduisant les conditions cliniques de greffe. Actuellement, en clinique, le greffon rénal est conservé de façon statique durant 20-24h en hypoxie dans une solution de conservation à 4°C, qui constitue l'ischémie froide. Au moment de la reperfusion, le greffon est connecté au réseau vasculaire du receveur, et donc reperfusé par le sang oxygéné à 37°C.

Pour reproduire ces conditions, nos cellules ont été conservées 24h en hypoxie dans la solution UW (considérée actuellement comme la solution de référence) et dans le cadre de notre étude visant à explorer les effets de la température, nous avons soumis ces cellules à 5 températures différentes (4°C, 19°C, 27°C, 32°C et 37°C). La reperfusion est simulée par une réoxygénation avec 20% d'oxygène à 37°C soit durant 24h avec du milieu de culture DMEM soit pendant 2h en présence de sang de porc autologue, permettant de mettre les cellules endothéliales en présence des cellules immunitaires et des éléments du complément qu'elles rencontreraient *in vivo*. Les cellules contrôles (ctrl) ont été conservées dans leur condition normale de culture, c'est-à-dire en DMEM dans une étuve à 37°C, pendant 26h ou 48h en fonction du temps d'hypoxie/réoxygénation des cellules soumises aux différentes conditions. Des évaluations de la mortalité et de l'intégrité cellulaire, de l'activité métabolique ainsi que du stress oxydant, des voies de l'hypoxie et de l'inflammation ont été réalisées.

La seconde partie de ce travail a été réalisée sur un modèle *ex vivo* de reins de porc conservés à deux températures différentes et comparés à des reins conservés à 4°C. Des évaluations de l'intégrité tissulaire, des voies de l'hypoxie et de l'apoptose ont été réalisées.

## 3. Résultats obtenus

### 3.1. Impact de différentes températures lors de la conservation de cellules endothéliales sur les lésions d'IR

Notre premier test a consisté à mesurer l'impact de la température de conservation sur la nécrose cellulaire, une des deux voies possibles de mort cellulaire. Pour ce faire, nous avons mesuré le ratio

entre la quantité de lactate déshydrogénase (LDH) libérée dans le milieu par rapport à la quantité totale présente dans la culture cellulaire, cette enzyme exclusivement intracellulaire est relarguée lors de la perte d'intégrité membranaire, une des étapes du processus de nécrose, qui n'est pas observée lors de l'apoptose. L'analyse de ce test montre que la préservation à 4°C entraîne une nécrose importante (Figure 24A,  $37 \pm 2\%$  de libération de LDH par rapport aux cellules ctrl), phénomène exacerbé à la réoxygénation (Figure 24B,  $70 \pm 1\%$  de libération de LDH par rapport aux cellules ctrl). La conservation à 19°C entraîne des résultats similaires à la conservation à 4°C relatée avec une mortalité cellulaire par nécrose importante après l'hypoxie ainsi qu'après la réoxygénation comme le démontre les taux élevés de libération de LDH. A 27°C, on observe une mortalité cellulaire significativement plus réduite qu'à 4°C après 24h d'hypoxie (Figure 24A,  $12 \pm 1\%$ ,  $p < 0,001$ ) cependant suite à la réoxygénation on observe une augmentation de la libération de LDH à un niveau identique à la conservation à 4°C (Figure 24B,  $74 \pm 1\%$ ). En outre, la préservation à 32°C permet une diminution de la mortalité cellulaire suite à l'hypoxie et surtout suite à la reperfusion où elle conduit à une libération de LDH significativement plus réduite qu'à 4°C (Figure 24B,  $40 \pm 2\%$ ,  $p < 0,001$ ). Enfin, les cellules conservées à 37°C présentent une mortalité cellulaire significativement moins importante qu'à 4°C après 24h de conservation hypoxique mais lorsqu'elles sont réoxygénées, on assiste à une amplification de la nécrose (Figure 24B,  $63 \pm 2\%$ ).

Nous avons ensuite évalué la mortalité cellulaire mais cette fois par apoptose. Pour cela, nous avons mesuré l'activité de la caspase 9. La caspase 9 est une protéine initiateur activée par l'apoptosome qui va conduire à la mise en place de l'apoptose par l'activation des caspases effectrices. Ce test nous a permis de constater que lors de la conservation à 4°C l'activité de la caspase 9 était réduite par rapport aux cellules contrôles (Figure 24C,  $17 \pm 10\%$  d'activité par rapport au ctrl). Au contraire, la conservation à 19°C entraîne l'augmentation la plus significative par rapport à 4°C ( $187 \pm 42\%$  par rapport au ctrl,  $p < 0,001$ ). A 27°C, on note une augmentation de l'activité par rapport à 4°C cependant elle n'est pas significative ( $88 \pm 47\%$  par rapport au ctrl). La préservation à 32°C conduit à une légère augmentation de l'activité apoptotique par rapport à 4°C ( $37 \pm 16\%$  par rapport au ctrl). Quant à la conservation à 37°C, elle provoque une augmentation significative de l'activité de caspase 9 par rapport à 4°C ( $158 \pm 43\%$  par rapport au ctrl,  $p < 0,001$ ) mais de façon moins élevée qu'à 19°C.

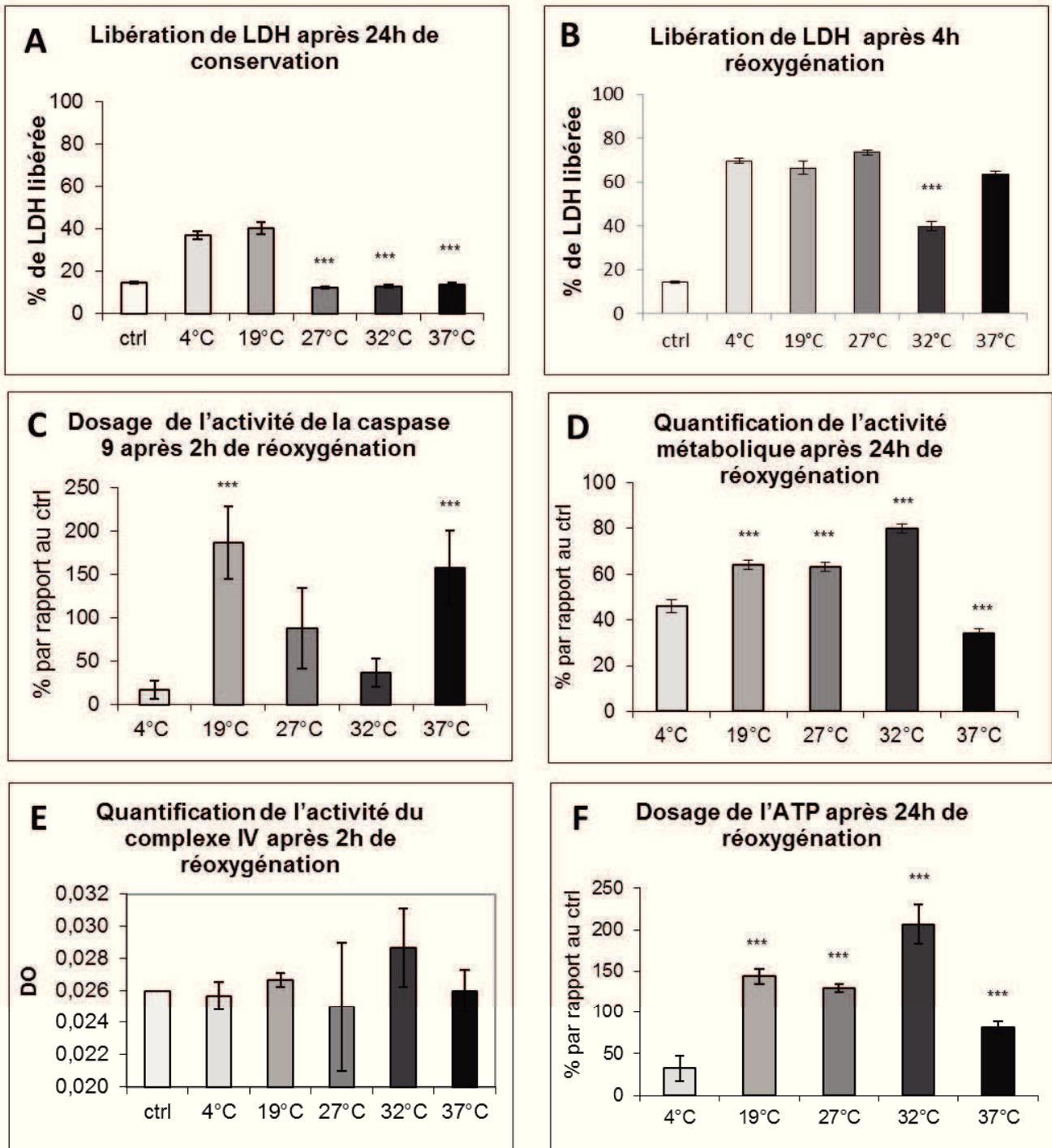
Nous avons ensuite effectué un test XTT (sel de tétrazolium) permettant d'observer l'activité du complexe II mitochondriale par réduction du XTT par la succinate déshydrogénase. L'analyse de ce test montre que la conservation à 4°C conduit à une diminution de l'activité du complexe II (Figure 18D,  $46 \pm 3\%$  par rapport aux cellules ctrl). Au contraire, les cellules conservées à 19°C et 27°C présentent une augmentation significative de leur activité métabolique par rapport aux cellules

conservées à 4°C (respectivement,  $64 \pm 2\%$  et  $63 \pm 2\%$  par rapport aux cellules ctrl,  $p < 0,001$ ). La préservation à 32°C permet quant à elle une meilleure conservation de l'activité métabolique ( $80 \pm 2\%$  par rapport au ctrl,  $p < 0,001$ ) tandis que la conservation à 37°C entraîne la diminution métabolique la plus importante de toutes les conditions ( $34 \pm 2\%$  par rapport au contrôle).

Toujours dans le but d'évaluer la préservation du métabolisme mitochondriale, nous avons quantifié l'activité du complexe IV. Pour ce test, nous n'avons pas observé de différence significative entre les différentes températures (Figure 24E). Néanmoins, on observe, lors des conservations à 4°C et 37°C, une activité du complexe IV mitochondrial similaire à l'activité des cellules contrôles tandis que, pour les conservations à 19°C et 32°C, on note une tendance à l'augmentation de cette activité.

Pour finir, nous avons réalisé un dosage de l'ATP, qui représente la principale source énergétique de la cellule et qui implique un fonctionnement correct de la chaîne respiratoire mitochondriale, notamment le complexe V de la chaîne mitochondriale (ATP synthase). L'analyse de ce test nous montre que la conservation à 4°C conduit à une baisse importante de la quantité d'ATP (Figure 24E,  $33 \pm 15\%$  par rapport au ctrl). Les conservations à 19°C, 27°C et surtout 32°C permettent une augmentation significative de la quantité d'ATP intracellulaire, dépassant même la quantité trouvée dans les cellules contrôles (respectivement,  $144 \pm 9\%$ ,  $130 \pm 5\%$  et  $207 \pm 9\%$  par rapport au ctrl,  $p < 0,001$ ). La conservation à 37°C entraîne une augmentation de la quantité d'ATP produite par rapport à 4°C mais reste inférieur à celle retrouvée dans les cellules contrôles ( $81 \pm 7\%$  par rapport au contrôle).

Au vu de l'ensemble de ces résultats, la conservation en hypoxie des cellules endothéliales porcines à 4°C représente donc la condition la plus délétère, 32°C permettent une meilleure conservation cellulaire.



**Figure 23 :** (A) Libération de LDH par les cellules endothéliales microvasculaires rénales conservées pendant 24 h en UW à différentes températures en hypoxie (B) puis réoxygénées pendant 4h en milieu de culture DMEM à 37°C.

(C) Dosage de l'activité de la caspase 9 détectées dans les cellules endothéliales conservées pendant 24h en UW à différentes températures en hypoxie puis réoxygénées en sang de porc autologue pendant 2h à 37°C.

- (D)** Quantification de l'activité métabolique des cellules endothéliales conservées pendant 24h en UW à différentes températures en hypoxie puis réoxygénées en sang de porc autologue pendant 2h à 37°C.
- (E)** Quantification de l'activité du complexe IV des cellules endothéliales conservées pendant 24h en UW à différentes températures en hypoxie puis réoxygénées en sang de porc autologue pendant 2h à 37°C.
- (F)** Dosage de l'ATP contenu dans les cellules endothéliales conservées pendant 24h en UW à différentes températures en hypoxie puis réoxygénées en sang de porc autologue pendant 2h à 37°C  
n=8, moyenne ±SEM, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 températures versus 4°C.

### 3.2. Effet des différentes températures de conservation sur l'intégrité cellulaire

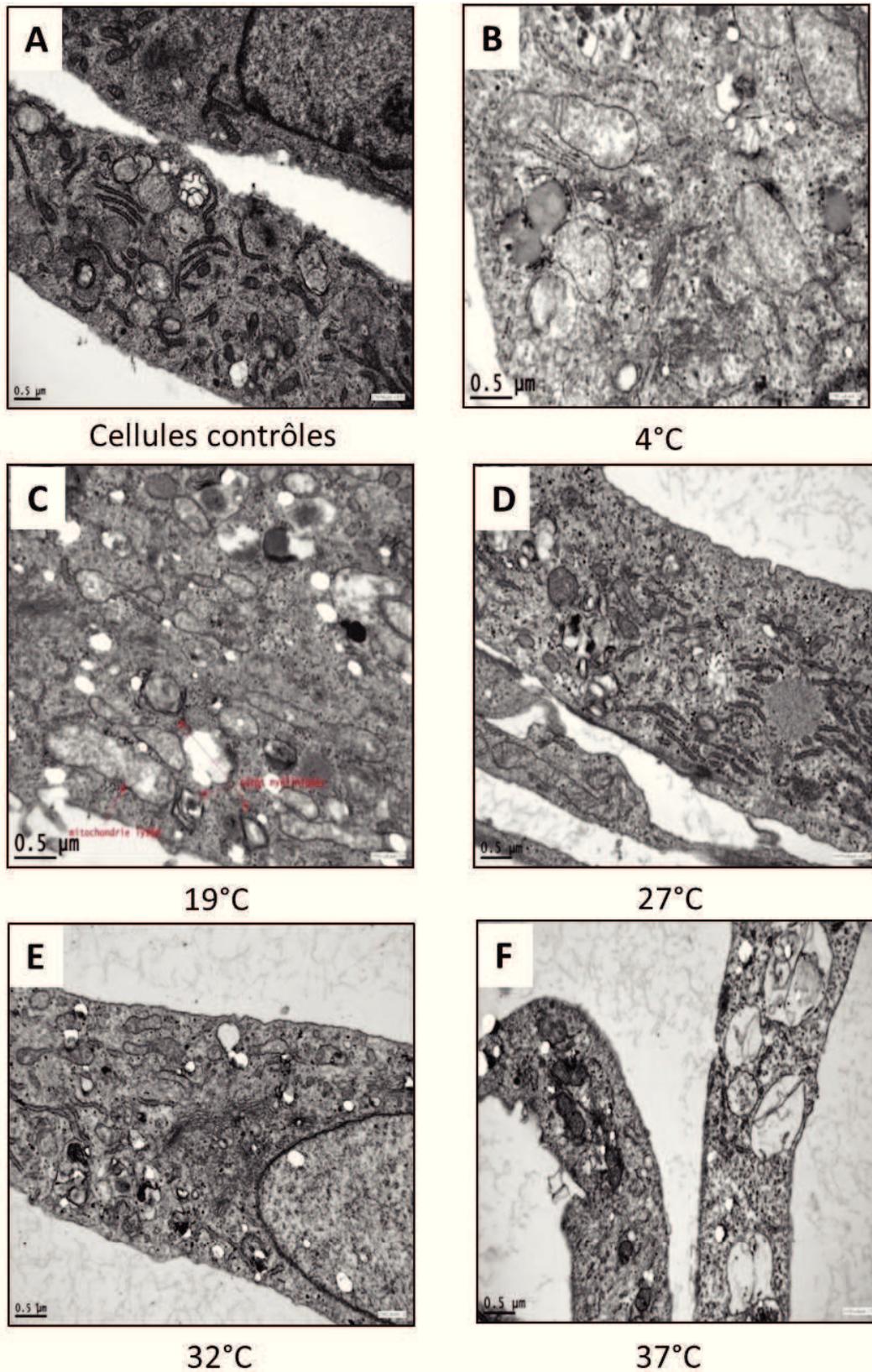
Suite à une hypoxie de 24h en UW aux différentes températures suivie d'une réoxygénation de 24h à 37°C en milieu de culture DMEM + 5% de SVF, les cellules endothéliales ont été analysées en microscopie électronique avec l'aide de deux ingénieurs de microscopie du CHU, Mmes Fernandez B et Quellard N, du service d'anatomopathologie.

Les cellules ont été comparées à des cellules contrôles (Figure 25A) conservées en O<sub>2</sub> à 37°C en milieu de culture DMEM + 5% de SVF pendant 24h et pour lesquelles l'intégrité cellulaire est parfaitement préservée.

Les cellules conservées à 4°C (Figure 25B) présentent des mitochondries plus petites que la normale (diamètre d'environ 0,5 µm) avec des crêtes effacées en majorité qui semblent souligner une souffrance cellulaire. Dans les cellules conservées à 19°C (Figure 25C), on observe également des mitochondries lysées ou de taille réduite (diamètre compris entre 0,5 et 1 µm) ainsi que la présence de figures myéliniques qui sont le résultat de l'altération membranaire. Ces phospholipoprotéines constituant habituellement ces membranes apparaîtront comme résidus contenus dans les lysosomes. Leur apparition dépend de la quantité d'enzymes contenues dans le lysosome. Les protéases existent en très grande quantité; en revanche, les lipases sont toujours peu abondantes. La fraction protéique des phospholipoprotéines est digérée, tandis que la fraction lipidique ne l'est que partiellement. Or, les molécules lipidiques, qui possèdent un groupement polaire hydrophile, ont toujours tendance à former des couches monomoléculaires d'où l'appellation de « figures pseudomyéliniques ». Les conservations à 27°C (Figure 25D) et à 32°C (Figure 25E) semblent être des conditions plus protectrices comme le souligne la présence de mitochondries plus nombreuses et plus grandes avec des crêtes bien visibles. A l'opposé, les cellules conservées à 37°C (Figure 25F) semblent très endommagées. Les mitochondries

sont soit plus petites que la normale avec des crêtes complètement effacées, soit lysées. On note une altération des membranes plasmiques et des organelles ainsi que la présence de vacuoles d'autophagie.

Ces analyses confirment les observations des tests métaboliques, avec un effet à double tranchant de la température, les niveaux intermédiaires permettant une protection accrue par rapport à 4°C mais une température trop élevée provoquant à nouveau des dégâts importants.



**Figure 24** : Observation morphologique par microscopie électronique des cellules endothéliales microvasculaires rénales porcines conservées en hypoxie pendant 24h en UW à 4°C (B), à 19°C (C),

à 27°C (**D**), à 32°C (**E**) et à 37°C (**F**). Les cellules contrôles ont été conservées pendant 24h en milieu de culture DMEM à l'étuve à 37°C.

Grossissement: 30 000X.

### 3.3. Evaluation des différentes températures de conservation sur le stress oxydant et les voies de l'hypoxie *in vitro*

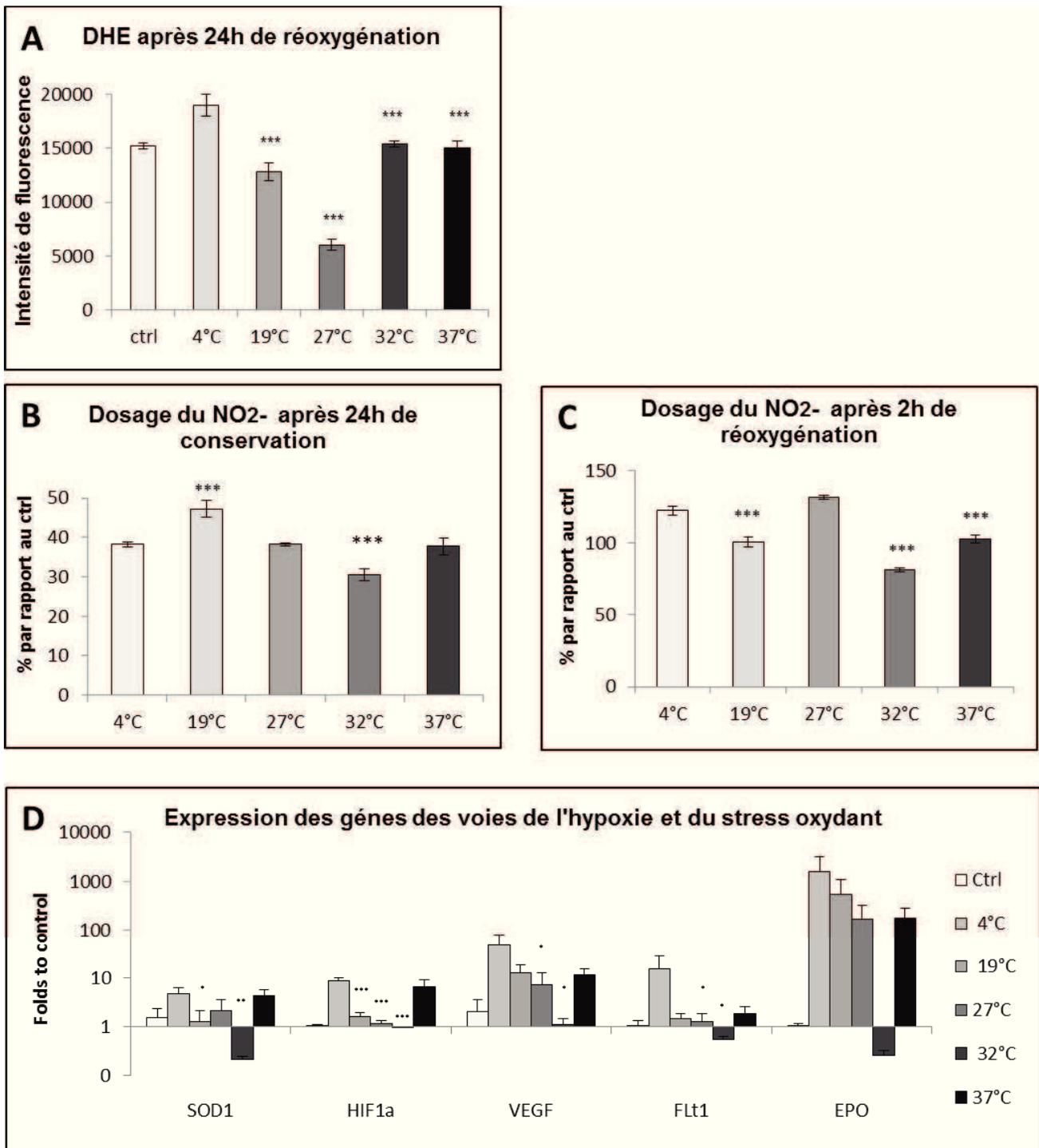
Nous avons tout d'abord évalué le stress oxydant, après 24h d'hypoxie et 24h de réoxygénation, par un test DHE (dihydroéthidium) permettant de doser la quantité d'anions superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), espèce réactive de l'oxygène. Ce test nous a permis de constater que la conservation à 4°C conduisait à une augmentation de la production d' $O_2^{\cdot-}$  par rapport aux cellules contrôles (Figure 26A,  $18\,993 \pm 1001 I_f$  (Intensité de fluorescence)). Au contraire, les cellules conservées à 32°C et 37°C présentent une quantité d' $O_2^{\cdot-}$  significativement inférieure comparé à celles conservées à 4°C avec un niveau similaire aux cellules contrôles (respectivement,  $15\,041 \pm 255$ ,  $15\,074 \pm 599 I_f$ ,  $p < 0,001$ ). Etonnamment, les cellules conservées à 19°C et particulièrement à 27°C sont significativement moins touchées par le stress oxydant qu'à 4°C (respectivement,  $12\,820 \pm 793$ ,  $6\,036 \pm 483 I_f$ ,  $p < 0,001$ ) et montrent un niveau d' $O_2^{\cdot-}$  plus faible que dans les cellules contrôles.

Le stress oxydant a également été évalué par dosage du  $NO_2^-$  dans le surnageant de culture, reflétant la génération de NO qui a un rôle négatif dans le cadre de l'IR par l'activation de lésions induites par les radicaux oxygénés. Suite à une hypoxie de 24h, on observe une augmentation significative de la production de  $NO_2^-$  par les cellules conservées à 19°C comparées aux cellules conservées à 4°C (Figure 26B,  $47 \pm 2\%$  par rapport au ctrl,  $p < 0,001$ ). Tandis que la conservation à 32°C entraîne une diminution significative de la production de  $NO_2^-$  par rapport à 4°C ( $30 \pm 2\%$  comparé au ctrl,  $p < 0,001$ ). Les cellules conservées à 27°C et 37°C montrent une quantité de  $NO_2^-$  produite identique à celles conservées à 4°C. Après une réoxygénation en sang, cette production est potentialisée dans toutes les conditions (Figure 26C). Néanmoins, lors d'une conservation à 19°C et 37°C, la quantité de  $NO_2^-$  devient significativement plus réduite comparée à la conservation à 4°C (respectivement,  $101 \pm 4\%$  et  $103 \pm 3\%$  comparé au ctrl,  $p < 0,001$ ); alors que la conservation à 27°C conduit à un niveau de  $NO_2^-$  identique à celui observé à 4°C. Les cellules conservées à 32°C présentant toujours une production plus réduite par rapport à toutes les autres conditions ( $81 \pm 1\%$  comparé au ctrl,  $p < 0,001$ ).

Enfin, nous avons effectué une analyse par RT-qPCR, après une hypoxie de 24h suivie d'une réoxygénation de 2h en sang, afin d'observer l'expression de la SOD1, qui est une métalloprotéine possédant un rôle important dans les systèmes de défense contre les radicaux libres en catalysant la

dismutation de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> en oxygène et peroxyde d'hydrogène. L'expression de ce gène est augmentée lors de la conservation à 4°C par rapport aux cellules contrôles (Figure 26D). De plus, l'expression de la SOD1 est diminuée de façon significative dans les cellules conservées à 19°C et surtout 32°C contrairement aux cellules conservées à 4°C (respectivement, p<0,01 et p<0,05), tandis que celles conservées à 27°C et 37°C ne montrent pas de diminution significative.

Concernant l'analyse transcriptomique des voies de l'hypoxie (Figure 26D), nous avons évalué l'expression d'HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ), qui est un facteur de transcription impliqué dans l'adaptation cellulaire à un stress hypoxique qui va conduire à l'activation des gènes suivants : (i) l'érythropoïétine (EPO), qui est un facteur de croissance activé par les fibroblastes interstitiels lors d'une hypoxie, (ii) le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), qui est un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire entraînant la perméabilisation vasculaire, la prolifération et la survie cellulaire dans des conditions hypoxiques, et (iii) son récepteur Flt1. L'analyse de ce test montre que l'expression de HIF-1 $\alpha$  est augmentée dans les cellules conservées à 4°C comparée aux cellules contrôles (Figure 26D). Les conservations à 19°C, 27°C et 32°C conduisent à une diminution significative de son expression (p<0,001) alors que la conservation à 37°C n'apporte pas de différence significative. Concernant l'expression de VEGF et Flt1, on note également une augmentation de l'expression lors de la conservation à 4°C par rapport au contrôle. Pour ces deux gènes seules les conservations à 27°C et 32°C entraînent une baisse significative de leur expression par rapport à 4°C (p<0,05) tandis que, pour les conservations à 19°C et 37°C, on observe seulement une tendance à la diminution. Enfin, l'expression d'EPO est là aussi augmentée lors de la conservation à 4°C. De plus, on note une diminution de son expression lors de conservations à 19°C, 27°C, 37°C et surtout 32°C mais de façon non significative. De manière étonnante on remarque lors de l'analyse de ces gènes que plus la température de conservation des cellules diminue plus leur expression est augmentée mais ceci jusqu'à une certaine température car lorsqu'elles sont conservées à 37°C les cellules montrent un profil d'expression augmenté.



**Figure 25 :** (A) Dosage de l'anion superoxyde par un test DHE dans les cellules microvasculaires rénales après une séquence d'hypoxie, pendant 24h en UW à différentes températures, et de réoxygénation, durant 24h en DMEM à 37°C.

(B) Dosage du  $\text{NO}_2^-$  dans les cellules endothéliales microvasculaires rénales conservées pendant 24 h en UW à différentes températures en hypoxie (C) puis réoxygénées pendant 2h en sang de porc à 37°C.

(D) Expression des ARNm de SOD1, HIF1 $\alpha$ , VEGF, Flt-1 et EPO par RT-qPCR dans des cellules endothéliales rénales suite à une hypoxie de 24h en UW à différentes températures et une réoxygénation de 2h en sang de porc à 37°C.

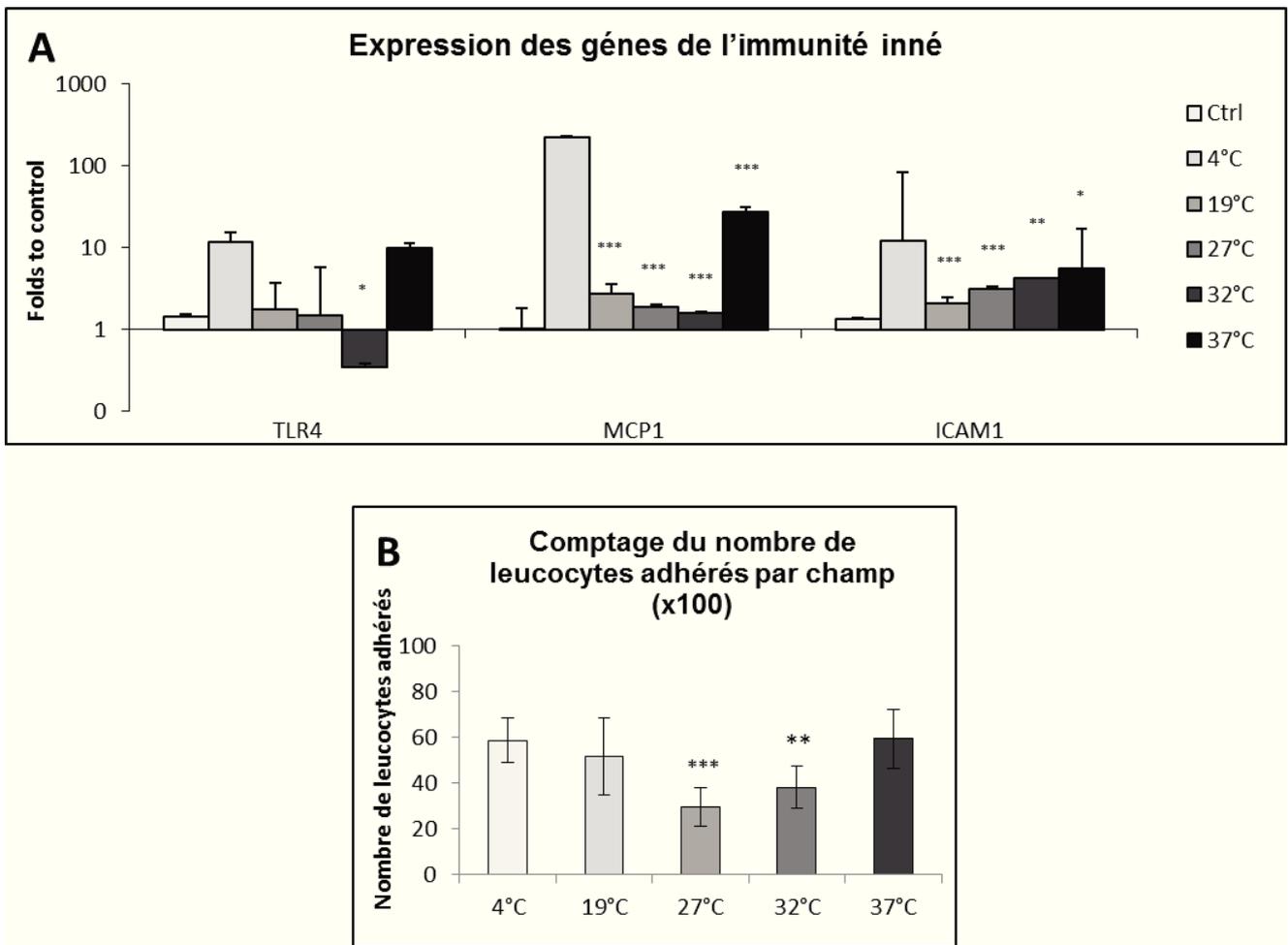
n=8, moyenne  $\pm$ SEM, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  températures versus 4°C

### 3.4. Impact des différentes températures sur l'inflammation *in vitro*

Suite à une hypoxie de 24h suivie d'une réoxygénation de 2h en sang et après lavage des cellules, le nombre de leucocytes adhérents sur le tapis cellulaire a été compté. L'adhésion des leucocytes est le signe d'une activation endothéliale. On observe une adhésion leucocytaire significativement plus réduite à 32°C et surtout 27°C comparée à 4°C (Figure 27B, respectivement  $p<0,01$  et  $p<0,001$ ). Tandis que les cellules conservées à 19°C et 37°C présente une adhésion leucocytaire similaire à celles observées à 4°C.

Puis une analyse transcriptomique des gènes de l'inflammation (MCP-1 et TLR4) et de l'activation endothéliale (ICAM1) a été réalisée à la suite d'un protocole identique (Figure 27A). MCP-1 est une cytokine pro-inflammatoire de type chimiokine qui va conduire au recrutement de certaines cellules immunitaires, TLR4 est un « Tolls-Like » récepteur conduisant à l'activation des voies de signalisation du NF- $\kappa$ B, des MAPK et de l'interféron de type 1, l'activation cellulaire et la production de cytokines proinflammatoire; et ICAM1 est une immunoglobuline présente à la surface de l'endothélium qui va permettre la diapédèse lors de l'activation endothéliale. Pour TLR4, on note une augmentation de son expression lors d'une conservation 4°C ainsi qu'à 37°C. Les conservations à 19°C et 27°C montrent une tendance à la baisse de l'expression de TLR4 alors que la conservation à 32°C permet une diminution significative ( $p<0,05$ ). En ce qui concerne l'expression de MCP-1, elle est également augmentée à 4°C tandis que les autres températures permettent une diminution significative de son expression notamment à 19°C, 27°C et 32°C ( $p<0,001$ ). Pour finir, on observe là aussi une baisse de l'expression d'ICAM1 à 37°C et 32°C (respectivement,  $p<0,05$  et  $p<0,01$ ), et surtout à 27°C et 19°C ( $p<0,001$ ). Concernant MCP-1 et TLR4, on remarque également que plus la température de conservation diminue plus leur expression augmente sauf à 37°C qui présente une expression élevée pour ces deux gènes mais moins importante qu'à 4°C. Tandis que pour ICAM1, son expression

augmente en fonction de la température de conservation sauf à 4°C, température pour laquelle l'expression est la plus élevée.



**Figure 26 :** (A) Expression des ARNm de TLR4, MCP1 et ICAM1 par RT-qPCR dans des cellules endothéliales rénales suite à une hypoxie de 24h en UW à différentes températures et une réoxygénation de 2h en sang de porc à 37°C

(B) Comptage du nombre de leucocytes adhérents sur les cellules endothéliales microvasculaires rénales après une conservation en hypoxie de 24 h en UW à différentes températures et une réoxygénation pendant 2h en sang de porc à 37°C.

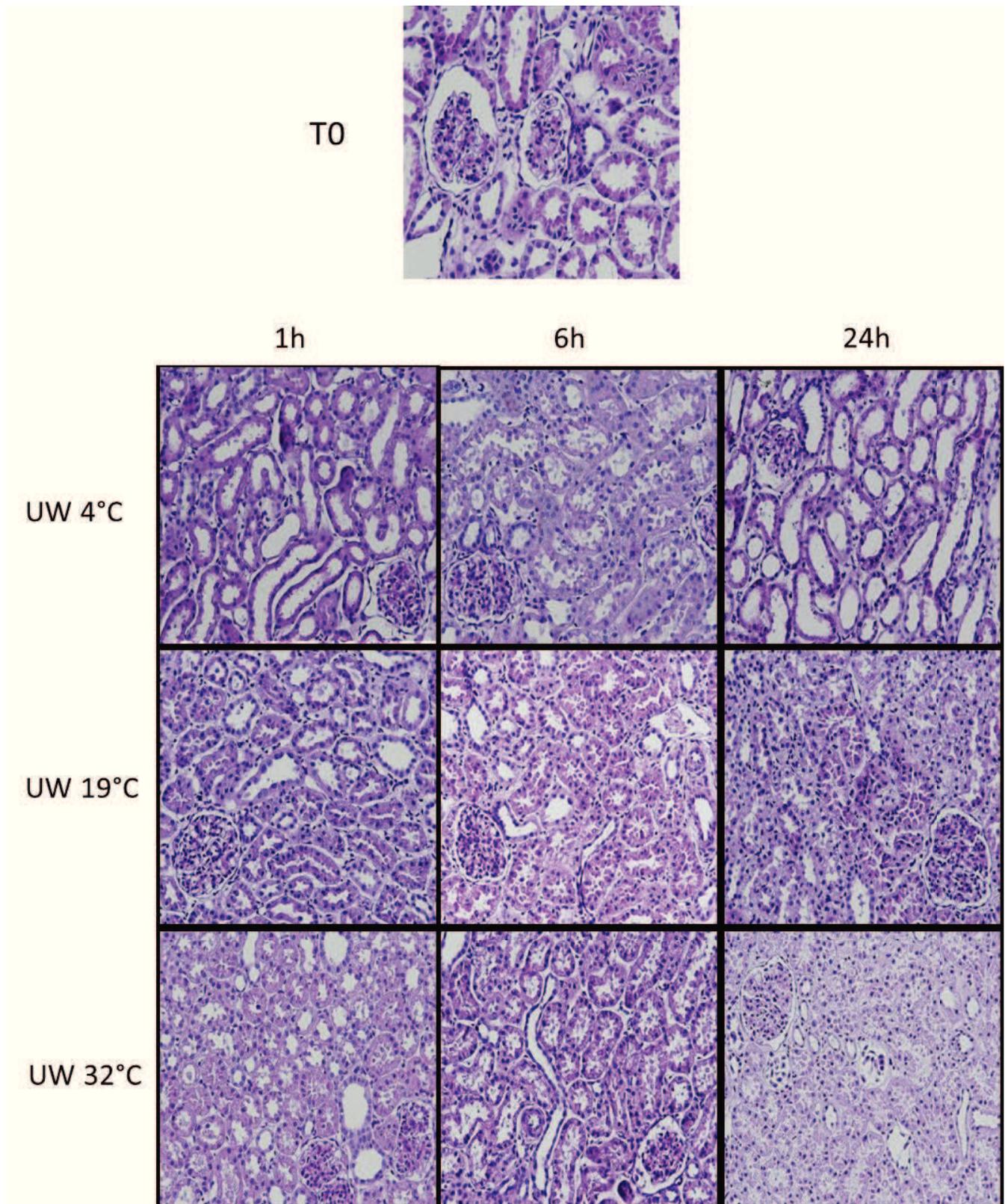
n=8, moyenne  $\pm$ SEM, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  températures versus 4°C.

### 3.5. Détermination de l'effet des différentes températures sur les lésions d'IR dans un modèle rénal *ex vivo*

Pour faire suite à ces résultats, nous avons voulu évaluer la conservation à 32°C et 19°C, qui représente respectivement la meilleure condition de conservation et l'une des deux températures intermédiaires apportant également de bons résultats, par rapport à 4°C dans un modèle rénale de porc *ex vivo*. Pour ce faire, nous avons conservé des reins de porc en UW à différentes températures pendant 24h après lavage préalable du rein avec la solution à la température adéquate.

Nous avons tout d'abord effectué une évaluation de la perte de la bordure en brosse et du détachement cellulaire, lésions tubulaires typiques des lésions de l'IR. Concernant la perte de la bordure en brosse, on n'observe aucune différence significative entre les différentes conditions (Figure 28 et tableau 3). Néanmoins, il semblerait que la perte de la bordure en brosse soit moins importante à 1h quand les reins sont conservés à 19°C ou 32°C; mais paraît être potentialisée pour des durées de conservation plus longues pour ces deux températures contrairement aux reins conservés à 4°C. De plus, en ce qui concerne le détachement endoluminal, on ne note pas non plus de différence significative entre les différentes températures au temps précoce (1h et 6h) par contre à 24h il semblerait qu'il y ait un détachement cellulaire plus important mais non significatif à 19°C et 32°C comparée à 4°C.

Nous avons ensuite réalisé une analyse transcriptomique (données non montrées) qui n'a montré aucune différence significative entre les différentes températures de conservation aux mêmes temps.



**Figure 27 :** Marquage à l'acide périodique de Schiff (PAS) représentatif après 1h, 6h ou 24h de conservation de reins de porc en UW à 4°C, 19°C ou 32°C. Grossissement: 100X.

### Score histologique

Score perte de bordure en brosse					Score détachement cellulaire				
	T0	1h	6h	24h		T0	1h	6h	24h
UW 4°C	1±0	3,3±0,8	2,3±1,1	2,6±0,8	UW 4°C	1±0	1±0	1±0	1±0
UW 19°C	1±0	1,3±0,4	2,3±0,4	2,6±0,4	UW 19°C	1±0	1±0	1,3±0,4	2±0
UW 32°C	1±0	1,6±0,4	2±0	3,3±0,8	UW 32°C	1±0	1,6±0,4	1,3±0,4	3,3±0,8

**Tableau 2 :** Evaluation des lésions histologiques des reins après conservation *ex vivo* à 4°C, 19°C ou 32°C.

#### 4. Conclusions

Les résultats obtenus soutiennent un effet délétère de la conservation à 4°C déjà décrit dans la littérature. En effet, la conservation à 4°C conduit à une mortalité cellulaire par nécrose élevée mais pas par apoptose et à une diminution de l'activité métabolique et de la quantité d'ATP corrélées avec une perte de l'intégrité cellulaire. La conservation des cellules à 4°C entraîne également une augmentation du stress oxydant, une activation des transcrits des voies de l'hypoxie, de l'inflammation et de l'activation endothéliale.

La conservation à 37°C en hypoxie n'apporte pas une préservation adéquate aux cellules conduisant à une nette diminution de la survie cellulaire, une baisse de l'activité métabolique mitochondriale ainsi qu'une perte de l'intégrité cellulaire et mitochondriale. De plus, l'analyse transcriptomique montre une activation des marqueurs de l'inflammation (MCP-1 et TLR4), de l'activation endothéliale (ICAM1), des voies de l'hypoxie (HIF-1 $\alpha$ , VEGF, Flt-1 et EPO) et du stress oxydant (SOD1).

Tandis que la conservation *in vitro* à des températures intermédiaires (19°C et 27°C) et surtout subnormothermiques (32°C) permet une meilleure préservation des cellules avec une conservation de l'activité mitochondriale, une survie et une intégrité cellulaire supérieure à celles observées à 4°C. De plus, ces données sont corrélées avec une diminution de l'activation des voies de l'hypoxie, du stress oxydant, de l'inflammation et de l'activation endothéliale.

Cependant, l'évaluation sur le modèle *ex vivo* n'a pas confirmé ces données du fait du protocole non adapté à ces conditions de conservation.

## C. DISCUSSION GENERALE

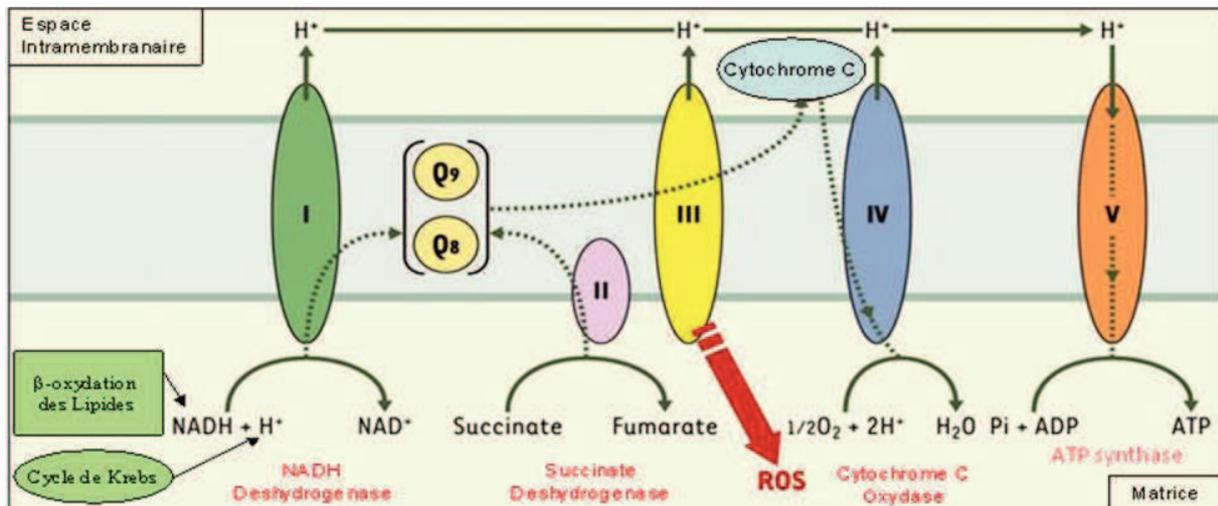
Dans cette étude, nous avons cherché à étudier l'impact de différentes températures lors de la conservation en hypoxie sur les lésions d'IR dans un modèle *in vitro* de cellules endothéliales rénales porcines et dans un modèle *ex vivo* de rein de porc.

Nous avons choisi un modèle de culture primaire de cellules endothéliales rénales microvasculaires car c'est le premier type cellulaire touché par les lésions d'IR. De plus, afin de nous rapprocher le plus possible du contexte clinique, nous avons mimé dans notre modèle *in vitro* les périodes de conservation et de réoxygénation inhérentes à la greffe d'organe. Pour se faire, les cellules ont été conservées en hypoxie pendant 24h en UW, qui est la solution la plus utilisée en conservation d'organe, puis réoxygénées à 37°C soit pendant 24h en milieu de culture DMEM soit durant 2h en sang de porc, qui nous a permis d'être au plus près des conditions physiologiques et de juger, par exemple, l'interaction de l'endothélium activé avec les leucocytes.

Les résultats obtenus soutiennent un effet délétère de la conservation à 4°C déjà décrit dans la littérature [2-7, 189]. En effet, la conservation à 4°C, qui est la température actuellement utilisée lors de la conservation statique des organes, conduit à une mortalité cellulaire élevée liée à la nécrose et non à l'apoptose et à une diminution de l'activité métabolique mitochondriale conduisant à une diminution des capacités de synthèse de l'ATP associées avec une perte de l'intégrité cellulaire et mitochondriale que nous avons pu constater grâce à l'utilisation de la microscopie électronique.

De façon intéressante, on observe une différence entre le test XTT et le dosage de l'ATP intracellulaire, ce dernier présentant un niveau plus réduit. Cette différence souligne que lors de la conservation à 4°C en hypoxie la phosphorylation oxydative ne fonctionne pas correctement. En effet, le XTT permet de mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale intervenant au niveau du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale, tandis que l'ATP est synthétisée au niveau du dernier complexe de la chaîne lors de la phosphorylation oxydative : le complexe V (ATP synthase) (Figure 29). Ces deux tests sont donc associés néanmoins le dosage de l'ATP est plus représentatif du bon fonctionnement de l'activité mitochondriale car s'il y a une production d'ATP cela signifie que la chaîne respiratoire mitochondriale et la phosphorylation oxydative sont entièrement fonctionnelles. Nous avons également complété cette analyse de l'activité mitochondriale par la quantification du complexe IV mitochondrial malheureusement nous n'avons pas obtenu de différences significatives entre les différentes conditions. Cependant, il est à prendre en considération que la

quantification du complexe IV a été réalisée avec la concentration protéique minimale, ce test nécessitant une quantité importante de matériel, la quantité de protéines récupérée dans nos cellules après une séquence d'hypoxie/réoxygénation à différentes températures n'étant peut être pas assez suffisante.



**Figure 28 :** Organisation fonctionnelle des composants de la chaîne respiratoire

Nous avons également démontré que la préservation des cellules à 37°C n'est pas adaptée à la conservation statique en hypoxie. Effectivement, cette conservation induit une perte de viabilité cellulaire par nécrose et par apoptose ainsi qu'une diminution de l'activité métabolique mitochondriale et de la concentration en ATP associées avec une altération de l'intégrité cellulaire.

Les températures intermédiaires (19°C et 27°C) permettent une meilleure conservation de l'activité métabolique mitochondriale et de la quantité d'ATP même si elles entraînent aussi une perte de viabilité cellulaire par nécrose, et par apoptose pour 19°C. Concernant l'intégrité cellulaire, elle est préservée à 27°C tandis qu'à 19°C elle semble altérée. Ces résultats sont en accord avec les observations d'autres équipes travaillant sur la protection de l'hypothermie, montrant que cette protection est déjà présente à partir de 26°C et qu'une réduction supplémentaire de la température n'induit pas une protection supplémentaire des lésions d'IR [214, 215]. De plus, il a été observé un impact protecteur de l'hypothermie légère, 15°C à 26°C, sur les lésions tissulaires induites par le stress oxydatif durant l'IR; ainsi qu'une réduction de la production d'EOR intracellulaires [216].

Quant à la conservation à 32°C, elle permet la meilleure préservation avec une faible mortalité cellulaire par nécrose et par apoptose ainsi qu'une activité métabolique mitochondriale et une quantité d'ATP plus importante que les autres conditions, ces résultats étant associés à une préservation de

l'intégrité cellulaire et mitochondriale. Ces résultats concordent avec les données de la littérature qui associent la subnormothermie à un large éventail de mécanismes de protection qui pourraient diminuer les lésions d'IR dans un grand nombre de modèles *in vivo* et *in vitro*. Ces mécanismes comprennent l'induction de protéines de choc thermique, la réduction de l'apoptose par atténuation des voies intrinsèques et extrinsèques [211], la préservation énergétique et métabolique mais aussi l'activation des voies de signalisation de la survie et la réduction de l'ouverture du mPTP durant la reperfusion [206]. De plus, il a été montré que l'hypothermie modérée à 30°C diminue l'utilisation de l'énergie qui est au moins partiellement responsable du maintien de la fonction mitochondriale post-ischémique et la préservation relative de l'ATP, entraînant une préservation de l'intégrité structurale [210]. De plus, une analyse de microarrays réalisée sur des HUVEC a montré que l'hypothermie à 33°C modifie significativement l'expression d'un grand nombre de gènes liés à des processus et des fonctions biologiques importantes, tels que le cycle cellulaire, l'apoptose et la prolifération cellulaire qui sont surexprimés; tandis que les chimiokines et l'adhérence cellulaire ont été sous-exprimés [213].

Les résultats concernant la nécrose et l'apoptose suite à une conservation à 4°C semblent assez pertinents lorsqu'ils sont associés avec la quantité d'ATP qui représente pour cette condition la quantité la plus faible. Dans la littérature, il a été décrit que le mécanisme exact du type de mort cellulaire activé semblait être dépendant des taux d'ATP cellulaire résiduels. En effet, la formation de l'apoptosome est un processus ATP-dépendant alors qu'une déplétion complète en ATP a plutôt tendance à mener à la nécrose [95]. Le niveau bas d'ATP explique donc pourquoi, alors que l'on observe une mortalité importante par nécrose, la quantification de l'activité de la caspase 9 est la plus réduite dans cette condition.

Les résultats d'ATP intracellulaires doivent tout de même être étudiés avec précaution au vu des concentrations en ATP très élevées à 19°C, 27°C et 32°C en comparaison aux cellules contrôles. Il n'y a en effet pas de raison claire pouvant expliquer le fait qu'une cellule conservée en hypoxie puisse contenir des quantités d'ATP plus importantes qu'une cellule cultivée normalement. Il est possible que la cellule stressée sur-active la respiration mitochondriale, ayant besoin d'une plus grande quantité d'énergie pour faire face aux stress.

La supériorité des températures intermédiaires et subnormothermiques par rapport à 4°C ou 37°C est appuyée par les résultats du stress oxydant démontrant là encore un effet plus délétère de la conservation à 4°C comparée aux autres températures de conservation. L'analyse transcriptomique

montre une augmentation de l'expression du gène SOD1 à 4°C ainsi qu'à 37°C qui souligne la mise en place de système de défense par les cellules contre les radicaux libres.

En outre, la perte d'activité observée lors de la conservation à 4°C en hypoxie pourrait être due à l'inhibition du métabolisme cellulaire à 4°C, les cellules ne pouvant plus métaboliser l'O<sub>2</sub>, ce dernier deviendrait alors toxique. Ceci est en corrélation avec les résultats du test DHE qui conduit, suite à la conservation à 4°C en hypoxie, au niveau le plus important d'anion superoxyde généré.

Cependant, la production importante de DHE dans les cellules contrôles met en lumière une des limites du modèle cellulaire. Le choc de l'isolement à partir de l'organe entier, ou de la mise en culture dans des conditions différentes de celles présentes physiologiquement semble trop important pour les cellules microvasculaires.

L'analyse du dosage des nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) montre que ceux-ci sont augmentés après 24h d'hypoxie lors d'une conservation à 4°C comparée aux cellules contrôles. Néanmoins, la seule condition qui génère moins de nitrite qu'à 4°C lors de l'hypoxie est la conservation à 32°C. Suite à la réoxygénation, on note une exacerbation de la quantité de nitrites dans toutes les températures de conservation; cependant, pour 19°C, 37°C et surtout 32°C, cette augmentation reste plus faible qu'à 4°C. De plus, il serait pertinent de corréler le dosage des nitrites à un dosage des nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) qui sont les produits de dégradation du NO et qui permettent d'évaluer indirectement la formation de NO. En effet, le NO réagit rapidement avec des molécules telles que l'oxygène ou l'anion superoxyde pour donner des nitrites et des nitrates, ainsi le dosage du NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pourrait ne pas donner une image parfaite de la situation de la production de NO dans la cellule.

Nous avons ensuite étudié les voies de signalisation protectrices, déclenchées suite à des conditions extrêmes d'oxydo-réduction tel que l'hypoxie, qui permettent aux cellules de survivre. HIF-1 est l'un des facteurs de transcription impliqué dans cette adaptation cellulaire à un stress hypoxique. En effet, HIF-1 et HIF-2 sont des médiateurs clés dans l'homéostasie de l'oxygène et facilitent l'apport d'oxygène et l'adaptation des tissus à la privation en oxygène, en régulant l'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans le métabolisme énergétique cellulaire et le transport du glucose, l'angiogénèse, l'érythropoïèse et le métabolisme du fer, la régulation du pH, la prolifération cellulaire, l'apoptose ainsi que les interactions cellules-cellules et cellules-matrice, participant à la protection du rein durant l'ischémie [219, 220].

Le facteur de transcription HIF est une protéine hétérodimérique constituée d'une sous-unité régulatrice  $\alpha$  et d'une sous-unité constitutive  $\beta$ . Ces deux sous-unités sont constituées d'un motif basique de type hélice boucle hélice et d'un domaine d'homologie PAS (Period protein : PER ; Aryl

hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator : ARNT ; Single Minded protein : SIM) permettant leur dimérisation et la liaison à l'ADN au niveau de séquences consensus (5'-CGTGC-3') nommées séquence Hypoxia Response Element (HRE), qui sont présents dans les régions régulatrices des gènes sensibles à l'hypoxie. HIF-1 est exprimé dans pratiquement tous les organes et sert de régulateur maître dans l'adaptation à l'hypoxie. Au contraire, l'expression de HIF-2 est limitée aux cellules endothéliales vasculaires, aux hépatocytes et aux cellules interstitielles rénales et semble avoir des rôles qui chevauchent partiellement ceux de HIF-1, mais sont en grande partie non redondants [219].

Dans les conditions physiologiques, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont constitutivement produites par la cellule. Cependant, lors d'une pression partielle normale en oxygène ou normoxie, la sous-unité  $\alpha$  est très labile avec une durée de vie de moins de 5 minutes. En effet, elle est hydroxylée par des prolyl hydroxylases au niveau de deux résidus proline par des enzymes spécifiques dont l'activité est dépendante de la présence d'oxygène, de fer et de 2- $\alpha$ -cétoglutarate. Cette hydroxylation renforcée par l'acétylation d'une lysine, conduit à la fixation de la sous unité  $\alpha$  à la protéine suppresseur de tumeur von Hippel- Lindau (vHL)[221]. Cette protéine est un composant du complexe E3-ubiquitine ligase qui va induire l'ubiquitination puis la dégradation finale de la sous unité  $\alpha$  par le protéasome.

Lors d'une diminution de la pression partielle en oxygène ou hypoxie, les prolyl hydroxylases (PHD) sont inactivées et la dégradation de la sous unité  $\alpha$  est donc inhibée entraînant son accumulation intracellulaire. La sous unité  $\alpha$  stabilisée rejoint alors le noyau, pour former un complexe avec la sous unité  $\beta$  et les cofacteurs de transcription CBP et p300. Ce complexe pourra alors se fixer au niveau des séquences HRE et induire l'expression de gènes cibles.

L'activation de HIF peut également être modulée par les EOR produites au niveau de la mitochondrie [222, 223]. En effet, il a été démontré que les EOR étaient capables d'inhiber l'activité des PHD, probablement par modification de leur statut oxydo-réducteur entraînant la stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  et l'activation du facteur de transcription HIF.

Les principaux gènes induits par HIF sont le VEGF (Vascular endothelial growth factor), le récepteur au VEGF Flt-1 et l'érythropoïétine (EPO) [220].

Le VEGF est un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, c'est une protéine dont le rôle est de déclencher la formation de nouveaux vaisseaux ou angiogénèse, afin de rétablir l'apport d'oxygène aux zones tissulaires ischémiées. La fixation du VEGF sur son récepteur va conduire à la dimérisation de ce dernier qui va entraîner l'activation de voies de signalisation résultant en la perméabilité vasculaire, la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales, qui sont responsables du remodelage de l'endothélium vasculaire.

Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase-1*, VEGFR-1) est un récepteur du VEGF à activité tyrosine kinase de type III appartenant à la superfamille du récepteur au PDGF [224, 225]. Il est retrouvé de façon prédominante sur les cellules endothéliales. Ce récepteur est une protéine transmembranaire constituée d'une région extracellulaire impliquée dans la reconnaissance et la fixation du ligand, et d'un domaine intracytoplasmique à activité tyrosine kinase (TK), reliés entre eux par une région transmembranaire, composée d'une séquence hydrophobe permettant l'ancrage du récepteur dans la membrane. Suite à la fixation du ligand (dimère) au niveau d'un ou plusieurs des sept domaines immunoglobuline (Ig)-like constituant le domaine extracellulaire de deux récepteurs monomères, le récepteur est dimérisé. La protéine kinase de chaque monomère du récepteur phosphoryle des résidus tyrosine du monomère de l'autre récepteur, au niveau du domaine intracytoplasmique, résultant en une activation du récepteur et en une cascade de transduction du signal. Leur stimulation conduit à une augmentation de l'activité mitogène des cellules endothéliales et favorise leur migration [226]. Le Flt-1 est également impliqué dans la migration des monocytes et macrophages [227]. Il a aussi été suggéré que le Flt-1 servait à capturer le VEGF en excès afin de limiter la signalisation *via* le VEGFR-2. L'expression Flt-1 peut également être régulée par HIF-1 $\alpha$ .

L'EPO est une hormone de nature glycoprotéique principalement produite par le rein. Cette hormone est un facteur de croissance qui stimule la production des globules rouges en se fixant à la surface des cellules érythroblastiques de la moelle osseuse, par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Une hypoxie tissulaire entraîne une stimulation de la production d'EPO par les reins à partir des fibroblastes interstitiels présents dans le rein, conduisant à une augmentation de la production des hématies [219], [228].

Bien que l'activation précoce de la voie de signalisation HIF ait été décrite comme ayant des effets cytoprotecteurs [229], par induction de la survie cellulaire dans des lésions d'IR, au niveau de plusieurs organes comme le cœur ou le rein, le rôle de HIF dans l'activation chronique n'est pas totalement élucidé [219, 230, 231]. Haase a émis l'hypothèse que l'activation de HIF-1 lors d'une hypoxie chronique pourrait favoriser le développement de la fibrose rénale par trois processus au minimum [219]. Tout d'abord, par la régulation directe des facteurs pro-fibrosants, en synergie avec le TGF- $\beta$ . Effectivement, HIF a la capacité d'induire l'expression du collagène de type I, d'augmenter l'expression des protéines TIMP-1 et PAI-1, ainsi que de diminuer l'expression de la MMP2 [230, 232, 233]. Deuxièmement, par son rôle potentiel dans la TEM, Haase et ses collaborateurs ont prouvé que HIF était capable d'augmenter ce processus aussi bien dans un modèle *in vitro* qu'*in vivo* ainsi que chez des patients atteints de néphropathie chronique [234]. Enfin, il a montré que la régulation des réponses inflammatoires avait un rôle direct dans la fibrose tubulo-interstitielle. En effet, les

changements dans le microenvironnement cellulaire, tels que l'hypoxie, influent fortement sur le recrutement des cellules inflammatoires ainsi que sur leur fonction [235, 236].

Concernant les gènes des voies de l'hypoxie dans notre étude, la conservation à 4°C démontre le profil d'expression le plus élevé comparé aux températures intermédiaires et notamment subnormothermiques. En effet, les cellules conservées à 19°C, 27°C et surtout 32°C semblent moins souffrir de l'hypoxie comme le souligne la faible régulation de ces gènes. On observe également une corrélation entre l'expression d'HIF-1 $\alpha$  et l'expression des gènes qu'il induit, c'est-à-dire VEGF, son récepteur Flt-1 et EPO car ils sont tous régulés de la même façon que HIF-1 $\alpha$ . Cependant, on observe des différences entre les expressions de HIF-1 $\alpha$  et Flt-1 par rapport à celle de VEGF et EPO. En effet, l'expression des premiers est augmentée lors des conservations à 4°C et 37°C comparées aux cellules contrôles tandis que les conservations à 19°C, 27°C et 32°C n'induisent pas d'augmentation des ces gènes. Or, l'expression de HIF-1 $\alpha$  n'est pas augmentée sans un stress important, ce qui signifie que les cellules conservées à 19°, 27°C et 32°C n'ont pas souffert d'un stress aussi important que celles conservées à 4°C et 37°C. Au contraire, les expressions de VEGF et EPO, régulées notamment par HIF-1 $\alpha$ , sont augmentées dans toutes les conditions hormis à 32°C qui représente dans les tests précédents la condition la moins délétère. Ces résultats conduisent à l'hypothèse que contrairement à HIF, l'expression des transcrits EPO et VEGF peuvent être modulés par un stress moins important. En effet, HIF devient facteur de transcription et active en premier lieu les gènes EPO et VEGF, puis dans un second temps HIF active sa propre transcription.

L'analyse des marqueurs de l'inflammation (MCP-1 et TLR4) et de l'activation endothéliale (ICAM1) a permis d'évaluer par RT-qPCR l'impact des différentes températures lors de la conservation. Cette analyse met aussi en évidence une activation plus importante lors d'une conservation à 4°C ainsi que lors d'une conservation à 37°C mais de manière moins importante que la première. En effet, l'expression de MCP-1, une cytokine pro-inflammatoire permettant le recrutement de certaines cellules immunitaires, est augmentée dans les conditions les plus néfastes, qui sont les conservations à 4°C et 37°C, tandis qu'il n'est pas observé d'expression de ce gène lors des conservations à 19°C, 27°C et surtout à 32°C. Nous avons ensuite démontré la sur-expression du gène TLR4 dans les cellules conservées à 4°C confirmant la mise en place d'une inflammation et de dommage cellulaire. Les TLR sont des récepteurs dont les ligands endogènes sont produits lors d'un dommage cellulaire et qui constitue des éléments clés dans la réponse immunitaire. De plus, l'activation de TLR4 peut être renforcée par le stress oxydatif qui est généré par l'IR. L'expression de

MCP-1 est diminuée dans les autres conditions notamment à 19°C, 27°C et 32°C. L'expression d'ICAM1, une immunoglobuline permettant la fixation des leucocytes et leur diapédèse lors de l'activation endothéliale, met en évidence une augmentation de l'activation endothéliale à 4°C par rapport au contrôle. Au contraire, la conservation à 37°C entraîne une baisse légèrement significative de son expression tandis que les conservations à 32°C et surtout à 27°C et 19°C conduisent à une diminution plus significative. Cette expression d'ICAM1 est en corrélation (sauf pour 19°C) avec la quantité de leucocytes adhérents sur le tapis de cellules endothéliales activées par l'IR.

Les résultats du modèle *ex vivo* ne sont malheureusement pas en accord avec les résultats obtenus dans le modèle *in vitro*. En effet, nous n'avons observé aucune différence significative entre la conservation à 4°C, 19°C et 32°C au niveau de l'intégrité tissulaire et de la régulation de l'expression des gènes des voies de l'hypoxie et de l'apoptose.

Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence de résultat. Tout d'abord, nous n'étions pas dans des conditions de conservation parfaitement stériles au laboratoire (n'étant pas dans un environnement aseptisé comme dans le bloc chirurgical de la plateforme IbiSA) ce qui a peut être entraîné des problèmes de contamination accentués par la température de conservation des organes (19°C et 32°C). Les résultats obtenus auraient donc pu être dus à des éléments extérieurs au cadre de notre étude.

Néanmoins, lors d'une étude, il est essentiel de pouvoir s'appuyer sur différents types de modèles. De plus, il est primordial d'effectuer des tests dans un modèle *in vivo* afin de vérifier les résultats obtenus lors des études *in vitro*. Chaque type de modèle présente des avantages différents et complémentaires. Les modèles cellulaires *in vitro* présentent l'intérêt d'être reproductibles, moins coûteux et permettent d'effectuer un nombre plus important de tests. Ils offrent également la possibilité de travailler sur un seul type cellulaire pouvant être modulé à façon. Les organes isolés *ex vivo* et les modèles animaux *in vivo* sont des systèmes intégrés physiologiques permettant de conserver l'architecture tissulaire et l'intégrité cellulaire et de fournir des interactions entre les différentes cellules d'un tissu et, pour le modèle *in vivo*, de lier les différentes composantes rentrant en interaction avec le tissu comme le passage du sang dans les vaisseaux.

## D. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était de confirmer l'effet délétère de la conservation à 4°C et de déterminer une température de conservation permettant de mieux préserver les cellules lors de l'ischémie. A l'échelle cellulaire, les résultats que nous avons obtenus soulignent une différence du comportement des cellules endothéliales microvasculaires de porc en fonction de la température (4°C, 19°C, 27°C, 32°C ou 37°C).

Nous avons démontré dans cette étude que la conservation *in vitro* à des températures intermédiaires (19°C et 27°C) et surtout subnormothermiques (32°C) permet une diminution des lésions d'IR rencontrées lors d'une conservation en hypoxie et en hypothermie. Ces données montrent une meilleure préservation des cellules avec une activité mitochondriale, une survie, une intégrité cellulaire et mitochondriale supérieures à 4°C, résultats corrélés à une diminution de l'activation des voies de l'hypoxie, du stress oxydant, de l'inflammation et de l'activation endothéliale.

Tandis que la conservation à 37°C en hypoxie n'apporte pas une préservation adéquate aux cellules conduisant à une diminution de la survie cellulaire, une baisse de l'activité métabolique ainsi qu'une perte de l'intégrité cellulaire. De plus, l'analyse transcriptomique montre une activation des marqueurs de l'inflammation (MCP-1 et TLR4), de l'activation endothéliale (ICAM1), des voies de l'hypoxie (HIF-1 $\alpha$ , VEGF, Flt1 et EPO) et du stress oxydant (SOD1). Cette température nécessitant peut être des conditions physiologiques totales comme un milieu de conservation très proche du sang oxygéné.

Au vu de nos résultats et dans notre modèle, la conservation actuelle à 4°C ne semble pas être la meilleure condition de conservation car elle entraîne des effets délétères. En effet, la conservation à 4°C conduit à une mortalité cellulaire par nécrose élevée et à une diminution de l'activité métabolique et de la quantité d'ATP qui sont corrélées à une perte de l'intégrité cellulaire. La conservation des cellules à 4°C entraîne également une augmentation du stress oxydant, des voies de l'hypoxie, de l'inflammation et de l'activation endothéliale.

Cependant, le passage au modèle *ex vivo* de conservation statique de reins de porc à différentes températures (4°C, 19°C et 32°C) n'a pas confirmé ces données du fait du protocole non adapté à ces conditions de conservation.

Ce travail a permis d'apporter de nouvelles pistes de conservation afin de limiter les lésions d'IR dans le but d'améliorer la fonction et la survie des greffons rénaux.

A ce moment de mon travail de thèse, j'ai changé de thématique de recherche car mon travail sur les températures de conservation mettait en évidence les limites du modèle et des moyens actuels de conservation.

En effet, bien que le travail sur les cellules ait apporté des données importantes en termes d'impact de la température sur la survie des cellules, les premiers essais de passage vers l'organe entier ont révélé les limites du modèle cellulaire. En effet, une monocouche de cellules sur un support plastique, cultivées en conditions stériles, ne peut modéliser le degré de complexité d'un organe entier. Ce dernier a des besoins métaboliques plus importants, particulièrement si la température de conservation est plus élevée, et présente des contraintes vis-à-vis de la stérilité plus complexes que lors d'une culture cellulaire.

Le passage vers l'*in vivo* fait envisager une complexité de la conservation beaucoup plus importante. Plusieurs pistes peuvent être discutées :

- l'utilisation d'une solution de préservation mieux adaptée aux besoins d'un organe au métabolisme encore actif. Une telle solution devra apporter des nutriments, probablement de l'oxygène, et devra sans doute être utilisée dans un contexte de conservation dynamique afin d'apporter de façon constante l'énergie, et d'assurer un flux pour débarrasser les déchets de l'activité métabolique. Un tel dispositif étant possible, le laboratoire disposant de machine de préservation des greffons qui permettent ce flux continu, mais le choix de la solution reste entier. Ces dernières années, de nouvelles solutions de préservation contenant des nutriments ont été développées, par exemple le PolySol, offrant un cocktail complexe de nutriment et d'antioxydants, qui pourrait être utilisé en conjonction avec une oxygénation active du liquide de perfusion, possibilité offerte par de nouvelles machines telles que la KidneyAssist de la compagnie OrganAssit ou la Wave du groupe IGL1. La solution Lifor est également disponible, cette fois-ci offrant, en plus des nutriments, un transporteur d'oxygène non protéique. Cette dernière a, du reste, été créée pour la préservation normothermique, nous offrant donc un certain nombre de possibilités dans la poursuite de notre projet. Enfin, une autre solution consiste à utiliser le sang autologue, pour permettre le maintien de la viabilité à des températures normothermiques.

- une autre voie consiste à changer de perspective et à étudier la prise en charge du donneur. En effet, particulièrement dans le contexte des DDAC, la CRN a été mise en place. Il s'agit d'un système par lequel le sang du patient est oxygéné et circule dans le territoire abdominal par l'intermédiaire d'une adaptation du système de circulation extracorporelle utilisé en clinique. Cette technique pose évidemment la question de la température : le circuit pouvant être thermostaté, existe-t-il une température à laquelle les organes seront mieux préservés ? Ce système a depuis peu été adapté chez le porc au laboratoire, et mon travail sur les températures pourra peut-être, à terme, être utilisé

comme base de travail pour l'amélioration des conditions de la CRN dans le but d'augmenter la qualité des organes.

Cependant malgré l'attrait que représentent ces travaux, les conditions n'étaient pas réunies au laboratoire pour me permettre de faire évoluer mon programme de thèse. Ainsi j'ai opéré un changement de thématique vers un autre aspect de la conservation des organes qui est celui de l'hypoxie.

VII. DEUXIEME  
PARTIE: BENEFICE DE  
LA  
SUPPLEMENTATION  
PAR UN  
TRANSPORTEUR  
D'OXYGENE AU  
COURS DE LA  
CONSERVATION  
D'ORGANES

## A. INTRODUCTION

Dans cette deuxième partie, nous avons évalué l'impact de l'addition d'un transporteur d'oxygène naturel lors de la conservation sur les lésions d'IR.

Malgré le principe de diminution métabolique par le froid, mis en place grâce à la préservation statique à froid, un métabolisme ralenti nécessite de l'oxygène. De plus, de grandes quantités de radicaux libres sont également générées par la perte de la respiration cellulaire conduisant à d'autres lésions. Les solutions de conservation sont conçues pour prévenir ces processus, principalement par la prévention des gonflements et des altérations de la membrane cellulaire. Cependant, l'absence d'oxygène peut être la raison pour laquelle la viabilité diminue au cours du temps. Fournir de l'oxygène durant la conservation pourrait soutenir la resynthèse de l'ATP mitochondrial et retarder le processus lésionnel.

Par conséquent, le principe d'introduction de l'oxygène durant la conservation statique émerge de plus en plus. Différentes approches ont été développées : la persufflation par application veineuse rétrograde de l'oxygène, la TLM (two-layer method) avec PFC (perfluorocarbures ou hydrocarbures perfluorés), la solution Lifor® constituée de transporteurs d'O<sub>2</sub> non protéiques (nanoparticules liposomales), les transporteurs basés sur les hémoglobines (Hemoglobin-Based Oxygen Carrier ou HBOCs) tels que la molécule M101 qui est une hémoglobine extracellulaire issue d'un ver marin, *Arenicola marina*. Toutes ces approches s'avèrent très efficaces dans l'amélioration de la conservation d'organes.

### 1. La persufflation

La persufflation de l'oxygène rétrograde est une technique simple, au moyen de laquelle l'oxygène humidifié et filtré est bullé directement à travers la vascularisation rénale. Le gaz peut ensuite s'échapper par les petits pores à la surface de l'organe. Sa première application remonte aux années 1970. La technique a été un succès quand 100% de l'oxygène a été appliqué soit à des pressions élevées (50-60 mmHg) soit à des pressions plus faibles (11 mmHg). C'est un moyen simple et polyvalent pour régénérer les voies dépendantes de l'énergie cellulaire dans des conditions de travail métabolique relativement faible.

Les expériences montrent que la persufflation pourrait effectivement fournir de l'oxygène à l'organe et soutenir le métabolisme anaérobie, ceci étant attesté par la production d'adénosine lors de la conservation. En 1989, après une série d'expériences réussies sur des reins de chien endommagés par l'ischémie chaude et basé sur des travaux antérieurs de Fischer et al. et de Ross et Escot, Rôles et al. ont adapté la technique à la pratique clinique. L'étude pilote appliquée sur 10 reins a montré que la fonction du greffon pourrait être améliorée après une lésion d'ischémie chaude significative. Cependant, suite à cette étude, il n'y a pas eu d'autres données générées sur la base de cette application dans la pratique clinique, probablement du fait de l'introduction des solutions de préservation moderne et des approches plus simples dans la conservation rénale.

La technique de persufflation a ensuite été revisitée et une étude réalisée par Yin et al., dans les années 1990, a montré que bien que la persufflation pouvait réduire la perte d'adénosine dans les reins de rat après une conservation hypothermique de 24h, elle n'avait pas amélioré la fonction des greffons. Puis, la technique s'est plus fortement développée pour la conservation hépatique, ce qui a conduit à son application dans une étude clinique à petite échelle en 2008. Par ailleurs, les mêmes auteurs ont récemment appliqué cette technique au rein. Dans un modèle porcin, Treckmann et al. ont observé que la persufflation avait un effet bénéfique sur la fonction des greffons comparé aux techniques de conservation statique à froid et de machine de perfusion hypothermique. Ils ont utilisé une technique similaire à celle de Rolles et al. en administrant l'oxygène à une pression de 18 mmHg dans les reins ayant subi 30 min d'ischémie chaude mais en modifiant les conditions par adjonction de pièges à oxygène pour prévenir la peroxydation lipidique, basé sur les résultats qu'ils avaient obtenu dans leur travaux précédent sur le foie [237].

La technique de persufflation d'oxygène vasculaire non seulement maintient l'intégrité des cellules et des organes et leurs fonctions, mais permet aussi, dans une certaine mesure, la réparation des structures endommagées et la restauration de l'homéostasie cellulaire énergétique et de la transduction du signal moléculaire [238]. De plus, la persufflation permettrait d'inverser l'autophagie cellulaire induite par l'ischémie [239], rétablissant ainsi la capacité de régénération de la cellule lors de la reperfusion pour enlever les organelles endommagées et recycler les protéines dénaturée [240, 241]. Minor et al. ont montré, dans un modèle d'ischémie prolongée hépatique de porc, l'effet bénéfique de la persufflation d'oxygène particulièrement sur la fonction endothéliale vasculaire et l'ultrastructure des tissus [242, 243].

La persufflation d'oxygène représente un outil intéressant pour améliorer la viabilité des greffons, notamment hépatiques, et la survie prolongée. Cependant, cette technique pourrait être

difficile à mettre en place en clinique et elle fournit également de l'oxygène en excès ce qui pourrait induire un stress oxydant.

## **2. Les perfluorocarbures (PFC)**

En 1966, une solution étonnante a été rapportée dans la revue *Science*, dans laquelle des souris pouvaient respirer dans un liquide et survivre. Les PFC sont des hydrocarbures, dans lequel la totalité ou la plupart des atomes d'hydrogène ont été remplacés par du fluor, dont certains ont une propriété de solubilité élevée pour les gaz respiratoires tels que O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>. Ce sont des solutions inertes qui ont un haut potentiel de dissolution de l'oxygène. Les PFC libèrent de l'oxygène sous un gradient de concentration en créant un environnement fortement oxygéné qui n'est pas affecté par la température. La solubilité de l'oxygène dans les PFC liquides est d'environ 20 à 25 fois supérieure à ce qu'elle est dans l'eau ou le plasma sanguin dans les mêmes conditions. De plus, la faible affinité pour l'O<sub>2</sub> des PFC leur permet de libérer l'O<sub>2</sub> plus efficacement que l'hémoglobine dans les tissus environnants.

Ils peuvent être ajoutés durant la conservation statique à froid avec une technique appelée TLM (Two Layer Method) qui a été rapportée pour la première en 1988 à l'Université de Kobe en tant que méthode de conservation à froid des pancréas. La première TLM se composait de PFC et initialement de la solution Euro-Collins (CE), qui a ensuite été remplacée par la solution UW. La densité du PFC permet de former deux couches, le PFC se trouvant au fond, son poids spécifique étant plus élevé et la solution de conservation en haut. L'organe est en suspension à l'interface des deux couches. L'oxygène peut être ajouté de façon continue permettant la diffusion adéquate à travers l'organe [244].

La TLM réduit les lésions d'ischémie froide [245] et chaude [246] et de reperfusion [247] du pancréas et des îlots. Pendant la conservation avec la TLM, le pancréas est directement oxygéné par les PFC et maintient une pression partielle d'oxygène d'environ 60% du niveau physiologique normal [248].

La TLM a été particulièrement bénéfique pour la conservation du pancréas, permettant de générer une quantité suffisante d'ATP pour améliorer la viabilité des organes [249, 250]. Au cours de la conservation par la TLM, les greffons pancréatiques continuent de générer de l'ATP jusqu'à 96 h. L'ATP généré est utilisée pour actionner la pompe sodium/potassium pour maintenir l'intégrité cellulaire; ainsi, la TLM empêche le gonflement du pancréas de façon plus efficace que la solution UW. En outre, la TLM améliore la viabilité de l'endothélium vasculaire et la microcirculation [244]. Kuroda et al. ont montré que la TLM pouvait ressusciter les pancréas endommagés suite à une ischémie chaude inférieure à 60 minutes.

La fonction des îlots canins conservés avec la TLM a été améliorée par rapport à ceux conservés en dans seulement après 3h de conservation ainsi que leur rendement et leur fonction après 24h de conservation [251]. La TLM pourrait améliorer le rendement des îlots dans les pancréas ayant subi des lésions d'ischémie chaude chez le chien [252], le primate et l'homme [253]. Des données sur les primates suggèrent qu'une préservation supplémentaire de 5 heures à l'aide de la TLM augmente considérablement les rendements des îlots sans affecter la fonctionnalité [254]. [255]

L'utilisation de la TLM a également démontré un potentiel pour d'autres organes, mais n'a pas montré la capacité de l'oxygène à pénétrer profondément dans les tissus des organes possédant une capsule dense [250].

Dans le rein, son effet bénéfique a été montré dans un modèle de rat, mais, lorsqu'il est appliqué dans un modèle porcin, les résultats n'ont montré aucun avantage [237].

Au niveau clinique, la TLM a été utilisée pour la transplantation du pancréas à l'Université du Minnesota pour la première fois en 1999. Dans ce premier essai portant sur 10 cas, la TLM n'a eu aucun effet négatif sur les bénéficiaires après la transplantation. De plus, la qualité morphologique des greffons pancréatiques chez l'Homme après la reperfusion était excellente par rapport aux pancréas conservés avec la solution UW [244].

Le groupe de l'Université de Miami s'est penché sur la question de l'avantage de la TLM pour le donneur marginal. Ils ont isolé des îlots dans des pancréas de donneurs âgés (>50 ans) et ils ont clairement démontré que la TLM améliorait les rendements des îlots et le taux de succès de la transplantation avec donneurs marginaux comparés à la conservation statique à froid en UW [255].

Même après une ischémie chaude de 60 minutes, le rendement des îlots isolés à partir de pancréas conservés avec la TLM durant 24 heures atteint des niveaux similaires au rendement des îlots de pancréas n'ayant pas subi d'ischémie chaude [256].

Le PFC peut également être formulée comme une émulsion pour perfusion continue et a été appliqué au cours des premières tentatives de la machine de perfusion. Cependant, l'instabilité et les effets indésirables des émulsions à empêcher leur application continue [250].

Toutefois, les PFC ont l'inconvénient d'être hydrophobes, lipophiles et difficiles à stériliser [257]. De plus, la fixation de l'oxygène par les PFC nécessite des pressions partielles en oxygène importantes qui impliquent une alimentation en oxygène continue durant la période de préservation ce qui soulève le problème d'hyperoxie et de stress oxydatif [258] et qui pourrait éventuellement compliquer leur utilisation en clinique. De plus, on ne connaît pas les effets à long terme de la rétention de ces produits dans l'organisme. Dans les années 1960, lorsque ces produits ont été utilisés pour la

première fois comme substitut sanguin chez la souris [259-261], les effets secondaires ont été très importants. En effet, les PFC n'étaient pas éliminés de la circulation de façon satisfaisante et s'accumulaient donc dans les tissus de l'organisme, provoquant des œdèmes. Puis, dans les années 1980, une nouvelle version de PFC a été testée en phase clinique. Mais les problèmes de stockage, de coût financier, d'effets secondaires non négligeables et la faible efficacité de ce composé ont empêché l'extension de sa commercialisation [262, 263].

Récemment, il a été mis au point une nouvelle génération de PFC (PFBO : perfluorooctylbromide) qui ont également la capacité de transporter et délivrer l'oxygène aux tissus. Cependant, il a déjà été constaté qu'une augmentation de la quantité d'oxygène dans le sang pouvait engendrer une accumulation d'oxygène dans les tissus ce qui pourrait conduire à la formation d'oxygène radicalaire de type superoxyde.

### **3. Les transporteurs d'oxygène basés sur des hémoglobines (HBOCs)**

Les HBOCs ont été développées comme alternatives à la transfusion sanguine et en tant qu'oxygène thérapeutique dans des conditions ischémiques. Les premiers efforts de développement se sont axés sur la préparation de l'hémoglobine native (Hb) à partir de globules rouges comme solution de transporteur d'oxygène universellement transfusable. En effet, lorsque l'Hb est soustraite des globules rouges, elle reste capable de transporter l'oxygène et n'induit pas de modification antigénique du fait de l'absence de la membrane cellulaire du globule rouge. « Cependant, cette hémoglobine libre présente deux inconvénients majeurs :

- lors de l'extraction des globules rouges, le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG) est libéré et n'est plus disponible pour la molécule d'hémoglobine ce qui provoque un déplacement vers la gauche de la courbe de dissociation, avec comme conséquence une diminution de la pression partielle en oxygène pour laquelle 50 % de l'hémoglobine est saturée (P50). Cette P50 est inversement proportionnelle à l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Cette trop forte affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène devient alors un facteur limitant pour l'oxygénation tissulaire;
- sa structure tétramérique n'est pas modifiée lors de son extraction du globule rouge, mais l'absence de la membrane de celui-ci soumet la molécule à différentes attaques chimiques, enzymatiques et mécaniques qui peuvent l'altérer. Elle est ensuite rapidement dissociée en dimères qui sont alors éliminés de la circulation par extravasation et filtration rénale. Il en résulte une néphrotoxicité ou des œdèmes tissulaires.

Les hémoglobines utilisées actuellement pour la fabrication des HBOCs sont d'origine différente : humaine et bovine ou recombinante.

L'hémoglobine humaine est obtenue après la lyse des globules rouges du sang. Sa structure tétramérique physiologique au sein de globule rouge ne peut être conservée hors de celui-ci et elle se scinde en deux dimères alpha-bêta, ce qui réduit son poids moléculaire à environ 32 kDa. Elle exerce alors une pression oncotique plus forte, ce qui limite sa concentration d'utilisation. En solution, cette hémoglobine a plus d'affinité pour l'oxygène, puisque le 2,3-DPG n'est plus disponible, réduisant ainsi sa P50 de 27 mmHg à 12-14 mmHg. Administrée dans la circulation, elle la quitte rapidement pour être éliminée par les reins et produire une diurèse osmotique dans l'heure suivant son administration intraveineuse. Des effets indésirables ont été observés en présence de l'hémoglobine en solution. Parmi ces effets, nous trouvons: des effets vasomoteurs; une néphrotoxicité [264]; l'interférence avec la fonction des macrophages; le dépôt de fer ; l'histamino libération; des effets antigéniques et l'activation du complément, des kinines et de la coagulation. Par ailleurs, en solution, cette hémoglobine est capable de s'autoxyder en méthémoglobine et doit de ce fait être stockée dans un milieu dépourvu d'oxygène. De par son origine humaine, elle n'est disponible qu'en quantité limitée et comporte un risque important de transmission virale.

L'hémoglobine bovine offre l'avantage de ne pas nécessiter le 2,3-DPG et de ce fait la P50 est d'environ 30 mmHg, et ceci que l'hémoglobine soit située dans le globule rouge ou non. Cette P50 favorise la cession de l'oxygène aux tissus. Aussi, l'hémoglobine bovine est apparue comme une alternative intéressante à l'hémoglobine humaine, d'autant plus qu'elle est disponible en grande quantité et à un coût avantageux. Cependant, d'autres problèmes limitent actuellement son utilisation tels que :

- le risque de transmission d'agent pathogène de nature protéique à l'homme ;
- la difficulté de purification avec persistance de déchets membranaires, donc la possibilité de production d'anticorps antibovins après infusion de grandes quantités de protéines bovines.

L'hémoglobine humaine recombinante a, tout d'abord, été produite chez *Escherichia coli*, dont le génome a été modifié pour contenir les gènes codant à la fois pour les chaînes alpha et bêta de la globine [265]. Ces mêmes modifications génétiques ont été produites ultérieurement par la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et le porc transgénique.

Mais l'apparition de risques typiques à la présence d'endotoxines, après l'infusion chez 12 sujets, ont imposé une amélioration dans les étapes de purification, ce qui a permis de faire disparaître

ces effets indésirables. De plus, des modèles d'hémoglobine recombinante exprimée par les végétaux sont également à l'étude. Toutefois, la quantité d'hémoglobine synthétisée demeure actuellement trop réduite pour un transfert à l'échelle industrielle. » [266]

Les fabricants de HBOCs ont donc dû procéder à une variété de stratégies visant à modifier la molécule d'hémoglobine native pour la stabiliser et augmenter sa taille afin d'empêcher son élimination par les reins, prolonger sa demi-vie plasmatique, et retrouver ses propriétés de distribution de l'oxygène de la même façon que l'hémoglobine dans les érythrocytes : des modifications chimiques (stabilisation, polymérisation et conjugaison), l'encapsulation et des modifications génétiques de l'hémoglobine ont été réalisées [267, 268].

Concernant les modifications chimiques, l'Hb peut être stabilisée par pontages intramoléculaires qui sont des liaisons entre différentes sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  à l'aide de « cross-linker » tel que la diasparin. Ce type de liaison permet de stabiliser la structure tétramérique, sans modification de la masse moléculaire, de maintenir une affinité physiologique pour l'oxygène, et d'augmenter le temps de rétention dans la circulation sanguine.

La polymérisation s'effectue via des liaisons intermoléculaires des tétramères avec un linker comme le glutaraldéhyde. Ce type de pontage permet d'accroître la masse moléculaire et ainsi augmenter très fortement le temps de rétention vasculaire. La polymérisation est utilisée pour la préparation de deux Hb : PolyHeme et Hemopure. PolyHeme est préparée à partir d'hémoglobine humaine pyridoxylée pour augmenter la P50, polymérisée avec du glutaraldéhyde et purifiée afin d'enlever les résidus des tétramères. Cette solution d'Hb possède une P50 de 26 mmHg et une demi-vie chez l'Homme de 24 heures pour une dose injectée d'environ 300 g [269]. PolyHeme est en phase III d'essais cliniques pour des indications de traumatismes. Hemopure (HBOC-201) est préparé à partir de l'hémoglobine bovine qui possède naturellement une affinité réduite pour l'oxygène par rapport à l'hémoglobine humaine. Hemopure a obtenu une autorisation de mise sur le marché en Afrique du Sud limitée à une utilisation dans le traitement d'anémies sévères et la transfusion en raison des ravages faits par le SIDA et a été commercialisée courant 2001. Des études sur les HBOC-201 ont montré qu'elles pouvaient maintenir la tension en oxygène des tissus et pouvaient améliorer l'homogénéité de l'oxygénation tissulaire locale dans des modèles animaux d'ischémie du muscle squelettique, qu'elles permettaient de réduire la taille de l'infarctus du myocarde dans l'ischémie expérimentale chez le rat [270] et qu'elles réduisaient les lésions d'IR du myocarde dans un modèle canin d'IR myocardique [271].

« La conjugaison à des macromolécules, comme par exemple le polyéthylène glycol ou le dextran, a pour but d'augmenter la masse moléculaire afin d'accroître la demi-vie plasmatique, en réduisant notamment les phénomènes d'extravasation et de fuite rénale, de diminuer la reconnaissance par le système immunitaire et d'augmenter la viscosité et la pression oncotique des protéines. Les agents utilisés pour ce type de modification jouent de plus le rôle d'effecteur allostérique pour se substituer à la fonction du 2,3-DPG et augmenter la P50. Quatre hémoglobines conjuguées ont été développées, une seule est actuellement en essai clinique.

De plus, la préparation de certains HBOCs peut s'effectuer par une combinaison de plusieurs des modifications chimiques décrites ci-dessus comme la solution d'hémoglobine humaine pontée et polymérisée, HemoLink. Une autre combinaison est une polymérisation de l'hémoglobine associée à la conjugaison de molécules protectrices telles que la catalase et la SOD permettant de réduire les effets toxiques dus à l'oxydation de la protéine et à la production de radicaux libres qui en résulte.

Une autre approche consiste à encapsuler l'hémoglobine naturelle dans une structure de type nanocapsule ou liposome par une membrane artificielle fine composée de phosphatidylcholine afin de réduire l'élimination rénale et l'extravasation de l'hémoglobine et donc d'accroître sa persistance vasculaire. Le développement de ces produits est encore au stade préclinique. Leur évaluation chez l'animal a montré que certains problèmes restent à résoudre, tels que la viscosité élevée, la faible quantité d'hémoglobine encapsulée ou l'activation du complément suite à leur administration [272]. Mais le principal inconvénient de ces suspensions est leur capture par les macrophages spléniques et hépatiques.

La production d'hémoglobine recombinante par génie génétique est une approche plus récente motivée par la raréfaction de la matière première dans les établissements de transfusion sanguine. Par ailleurs, des modifications appliquées au niveau génique permettent d'aboutir à la synthèse d'hémoglobine acellulaire présentant des propriétés fonctionnelles proches de celles de l'hémoglobine érythrocytaire. L'avantage potentiel de cette approche est d'utiliser des structures moléculaires homogènes et d'avoir des sources d'hémoglobine non humaines et non animales [273]. Ce type d'hémoglobine peut être synthétisé chez différents hôtes tels que les bactéries et les levures, systèmes permettant d'éliminer virtuellement tout risque de transmission virale. Une hémoglobine humaine recombinante exprimée chez *E. coli* a fait l'objet d'essais cliniques initiés en 1991 mais ce projet est aujourd'hui abandonné. La production d'hémoglobine humaine recombinante chez des porcs transgéniques fut une voie envisagée, mais elle souleva le problème de transmissions virales de l'animal à l'Homme, ainsi que des difficultés d'ordre bioéthique et religieux, si bien que le développement du produit dut être interrompu. » [266]

Toutes ces modifications de structure stabilisent la structure tétramérique de la molécule et affectent la taille moléculaire, la filtration rénale, la P50, l'affinité de la fixation du NO et la demi-vie de circulation (de l'ordre de 12 à 36 heures).

Cependant, il y a un dilemme dans le compromis entre les propriétés souhaitables: les grandes hémoglobines et les liposomes peuvent avoir des demi-vies plus longues et sont moins actifs dans le captage de l'oxyde nitrique (NO) de l'endothélium (ce qui limite leurs propriétés hypertensives). Malheureusement, ils subissent également une auto-oxydation accélérée, une peroxydation des taux d'Hb et la perte de l'hème. D'autre part, les espèces plus petites sont moins antigéniques, sont filtrées par les reins, sont plus oncotiquement actives, et ont des temps de séjour vasculaire plus courts [267].

Actuellement, des solutions d'une nouvelle génération sont à l'étude : elles ont été développées dans le but spécifique d'améliorer l'oxygénation des tissus ischémiques ou hypoxiques. Certaines d'entre elles présentent des propriétés physiologiques qui vont à l'encontre de ce qui est habituellement appréhendé (augmentation de la viscosité et de la taille de la molécule, accroissement de l'affinité pour l'O<sub>2</sub> et production chimiquement plus homogène).

« De nombreux effets indésirables ont été observés avec ces HBOCs et expliquent l'abandon du développement de certains d'entre eux. Parmi les effets secondaires les plus fréquents, il existe les effets hémodynamiques et les effets oxydatifs.

L'administration systémique des HBOCs *in vivo* induit des effets secondaires d'ordre hémodynamique tels qu'une vasoconstriction qui provoque une augmentation de la pression artérielle systémique [274]. Cet effet a été constaté dans les études précliniques et cliniques avec la plupart de ces solutions [275]. Les mécanismes par lesquels l'Hb aurait cet effet impliquent une libération de radicaux libres tel que l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> [276], une pénétration de l'Hb dans la paroi vasculaire [277], un captage du NO [275], une libération d'endothéline-1 [278] et une stimulation des récepteurs alpha adrénergiques périphériques [279].

Par ailleurs, les HBOC s'autoxydent rapidement dans la circulation sanguine et induisent la libération des EOR responsables de dommages tissulaires et cellulaires et influencent le tonus vasculaire [276, 280]» [266]. De plus, la présence d'hydroperoxydes lipidiques dans des compartiments tissulaires influencerait la toxicité oxydative des HBOC [281] .

Un grand progrès dans le développement des HBOCs a été réalisé au cours des dernières années, mais aucun n'a atteint le stade de l'utilisation clinique aux États-Unis, ni au Canada, ni même en Europe. « Les HBOCs se heurtent aux difficultés de compréhension des effets secondaires d'ordre

hémodynamique et oxydatif, ainsi qu'aux problèmes de mise au point des procédés de production de grande quantité, tant pour l'Hb d'extraction que pour l'Hb de recombinaison génétique, et à l'optimisation des technologies de purification assurant l'innocuité des produits » [266]. « Plus inquiétant, une méta-analyse récente [282] rapportant un excès d'infarctus du myocarde et de mortalité liée à l'utilisation des solutions d'Hb, certains auteurs [283] ont recommandé un moratoire dans le développement de ces solutions. » [284].

#### **4. La solution Lifor®**

La solution Lifor® est une nouvelle solution de conservation d'organe entièrement artificielle contenant des nutriments, des facteurs de croissances et un transporteur (nanoparticules) de nutriments et d'oxygène non protéique, ainsi que des amino-acides et des sucres. Cette solution est utilisée en normothermie.

Les résultats indiquent que Lifor® fournit une protection supérieure contre les lésions d'IR rénale *in vivo* après 45 minutes d'ischémie chaude. Bien que le mécanisme par lequel Lifor® offre une protection contre les lésions d'IR ne soit pas clair, les résultats des expériences d'hypoxie-réoxygénation *ex vivo* et de conservation à froid suggèrent que Lifor peut limiter l'activation des voies apoptotiques [285].

L'efficacité de Lifor® comme solution de conservation d'organe a été évalué dans différentes études de cœurs isolés perfusés. Stowe et al. ont été les premiers à évaluer la solution Lifor® dans un modèle de cœur de cobaye perfusé avec un flux lent. En condition de température et d'air ambiant, la perfusion avec la solution Lifor® pendant 10h a assuré une meilleure protection contre les lésions cardiaques comparées à une perfusion en UW. Tandis que les cœurs perfusés en UW ne sont pas fonctionnels lors de la reperfusion, les cœurs conservés avec la solution Lifor® montrent une récupération presque complète des fonctions cardiaques. Dans une autre étude, Stowe et al. ont perfusé des cœurs de cobayes isolés pendant 20h avec du Lifor® ou de la solution cardioplégique. Les cœurs perfusés avec la solution cardioplégique étaient non fonctionnels lors de la reperfusion. La perfusion réalisée avec du Lifor® a fourni une protection marquée contre les lésions cardiaques comme indiquées par le retour presque complet de la contractilité cardiaque. Récemment, Gage et al. ont évalué la solution Lifor® chez un modèle porcin de perfusion rénale à température ambiante. Ils ont montré que pendant la perfusion, les reins de porc perfusés avec Lifor® avaient des débits plus élevés et de faibles niveaux de résistance par rapport aux reins perfusés avec l'UW à température ambiante ou à 4 °C. Cependant, les effets du Lifor® sur le taux de filtration glomérulaire et les lésions tubulaires n'ont pas

été explorés. Dans ces études, Lifor® fournit une protection contre les lésions cardiaques et les altérations hémodynamiques rénales lorsqu'il est utilisé à température ambiante. La preuve de l'efficacité de Lifor® dans l'ischémie chaude a été apportée dans un modèle d'IR chaude de rein de rat ainsi que de nouvelles preuves de cette efficacité dans l'ischémie froide [286].

## 5. La molécule M101 (HEMO2Life®)

Un certain nombre d'Hb d'Invertébrés sont acellulaires, circulent et fonctionnent comme des transporteurs d'oxygène sans donner lieu à un stress oxydatif. Ceci a conduit à l'hypothèse selon laquelle ces Hb naturelles acellulaires pouvaient servir de modèles d'HBOCs thérapeutiques puis comme composantes de perfusion dans la préservation des organes avant la transplantation.

M101 est un pigment respiratoire de haut poids moléculaire (environ 3,6 MDa) provenant d'un Invertébré marin, *Arenicola marina* (*Am*). L'hémoglobine M101 est développée par la société HEMARINA (Morlaix, France) comme additif aux solutions de préservations d'organes en attente de greffe et est formulée dans le produit HEMO2Life®.

A la différence des Vertébrés, l'Hb de l'Arénicole est extracellulaire, c'est à dire non incluse dans des globules rouges. Elle possède une structure quaternaire organisée en bicouche hexagonale, d'où le nom de structure quaternaire en bicouche hexagonale (Hexagonal Bilayer hemoglobin ou HBL-Hb). Elle est formée de chaînes de globine et de chaînes de linkers non globine. Chaque globine est composée d'une protéine et un groupement prosthétique non protéique, l'hème. L'hème est un noyau aromatique, la protoporphyrine IX, dont les quatre azotes centraux sont liés à un atome de fer qui lie réversiblement l'oxygène.

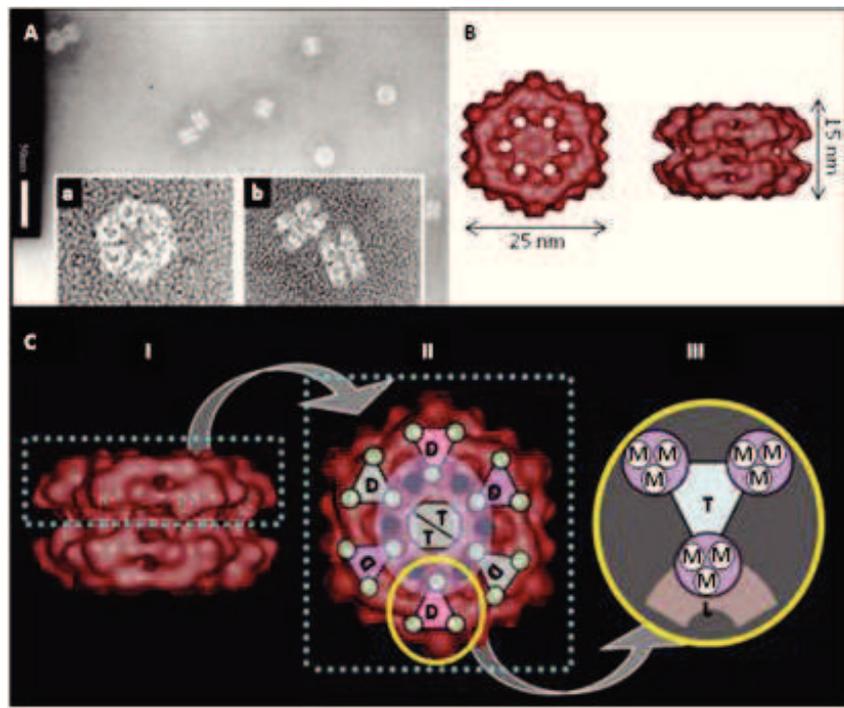
L'hémoglobine d'*Am* est constituée de 198 chaînes polypeptidiques appartenant à 10 types différents regroupés en deux catégories :

- la première (156 chaînes) regroupe des chaînes polypeptidiques dites "fonctionnelles" portant un site actif capable de lier réversiblement l'oxygène; ce sont des chaînes de type globine qui possèdent la structure caractéristique de type globine fold ; dont les masses sont comprises entre 15 et 18 kDa ; ces chaînes sont très similaires aux chaînes de types  $\alpha$  et  $\beta$  des Vertébrés;
- la deuxième (42 chaînes) regroupe des chaînes polypeptidiques dites de "structure" (ou "linker") qui jouent un rôle dans le maintien de la structure quaternaire; possédant peu ou pas de sites actifs mais permettant l'assemblage des dodécamères ; ces chaînes ont des masses moléculaires comprises entre 22 et 27 kDa.

Les globines et les linkers ne présentent pas les mêmes structures primaires et tertiaires, ni les mêmes propriétés fonctionnelles.

Un modèle de la structure quaternaire de l'hémoglobine d'*Am* a été proposé par Zal et ses collaborateurs [287]. Chaque couche est constituée de 6 dodécamères en périphérie et de 2 trimères de globine au centre (Figure 30). Les trimères de globine sont constitués de 3 globines liées entre elles par des ponts disulfure. Un dodécamère (environ 205 kDa) est constitué d'un trimère de globine centrale lié à 9 monomères de globines par des liaisons non covalentes. Les dodécamères sont liés entre eux par des chaînes de structure ou « linkers » qui assurent une fonction de maintien de la structure de la molécule ainsi qu'une fonction antioxydante de type SOD (à Cu/Zn). Les linkers sont des protéines riches en cystéine qui, ont été observé dans *Arenicola marina* pour lier l' $H_2S$  à pH légèrement alcalin, ce qui entraîne la formation de persulfides à des fins de détoxification dans les espèces non symbiotiques.

Suzuki et Riggs, et Chabasse et al. ont montré que les chaînes de linker d'*Am* possèdent un domaine riche en cystéine conservé, un module LDL-A (low-density lipoprotein A), commun à la région riche en cystéine du domaine de liaison du ligand de la famille LDLR (low-density- lipoprotein receptor). Les études portant sur les modifications du taux de LDL induites par l'hémine libre, dérivé ferrique (trivalent) de la protoporphyrine, a révélé que l'hémine s'associe aux LDL et subit une dégradation oxydative, libérant le fer libre, connu pour catalyser la dégradation oxydante [288].



**Figure 29:** Structure et conformation de l'hémoglobine extracellulaire M101 d'*Arenicola marina* [289]. **(A)** Micrographies en microscopie électronique à transmission [287, 288]. **(B)** Reconstitution 3D [290]. A gauche : molécule vue de face. A droite : molécule vue de profil. **(C)** Modèle 3D de la conformation de M101 [287]. **I:** Structure en bicouche hexagonale de M101. **II:** Vue de face de la couche hexagonale, avec ses sous-unités dodécamériques (D) en périphérie et trimériques au centre (T). **III:** Dodécamère constitué de monomères (M), d'un trimère central (T), de globine et de linkers (L).

M101 est stable à pH légèrement alcalin (pH 7-8) lorsque les sels sont présents à des concentrations similaires aux concentrations physiologiques. Parmi les sels qui sont importants pour la structure, les cations alcalino-terreux ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) jouent un rôle de premier plan. De plus, les modules LDL-A, trouvés sur les chaînes des linkers, possèdent un groupe de quatre résidus acides conservés, qui peuvent être impliqués dans le repliement des protéines calcium dépendante [291]. Rousselot et al. ont montré que M101 est capable de se réassocier après dissociation à pH alcalin. Le modèle de dissociation suggère l'importance des interactions de ponts salins dans la stabilisation de la structure quaternaire et l'importance de la composition saline du tampon pour maintenir l'intégrité de M101 à pH légèrement alcalin [288].

Contrairement à la structure quaternaire tétramérique d'hémoglobines bovines et humaines et des tétramères crosslinkés pour créer des polymères d'Hb de haut poids moléculaire, M101 est une structure complexe de haut point moléculaire, composé naturellement de ponts disulfures inter et intra crosslinkés, ne nécessitant pas de modifications. M101 étant extracellulaire, il n'y a pas de typage sanguin éliminant ainsi les problèmes de compatibilité entre donneur et receveur (systèmes ABO et Rhésus). Elle ne présente pas de potentiel mutagène et n'induit aucune vasoconstriction à la différence d'autres HBOCs [288, 292]. Cette protéine non glycosylée n'induit aucune toxicité, ni réponse immunitaire chez la souris [287, 294, 295]. D'autre part, M101 est fonctionnelle dans une large gamme de température (4-37°C).

A la différence des potentiels de réduction négatives exposés par les hémoglobines bovines et humaines (-155 à -23mV), M101 présente des potentiels de réduction positifs (+74mV, +63mV) corrélés et conformes à leur résistance observée dans plusieurs voie d'oxydation. Le potentiel d'oxydo-réduction inhabituellement très positive manifestée par M101, couplé avec la réticulation naturelle, confèrent une grande stabilité. Cette Hb acellulaire d'Invertébré marin subit une réduction rapide et

importante (hème-Fe<sup>3+</sup> → hème-Fe<sup>2+</sup>) à l'état de méthémoglobine en présence de faibles concentrations de plasma humain réduisant les composants. Une exigence physiologique fondamentale pour tous les HBOCs thérapeutiques est le maintien de l'hème-fer à l'état réduit (Fe<sup>2+</sup>). Cela est nécessaire pour la libération de la liaison réversible de l'oxygène moléculaire *in vivo*. L'oxydation conduisant à la formation de méthémoglobine (hème-Fe<sup>3+</sup>) entraîne la diminution de la capacité de transport d'oxygène des HBOCs. Sans un environnement réducteur adéquat, la méthémoglobine est convertie en hémichromes, associée à la formation de radicaux libres oxydants *in vivo*. De plus, M101 est naturellement résistante à l'auto-oxydation [293].

M101 est capable de fixer de manière réversible jusqu'à 156 molécules d'O<sub>2</sub> à saturation (pour comparaison, l'hémoglobine humaine ne fixe que 4 molécules d'O<sub>2</sub>) qu'elle peut libérer sans effecteur allostérique dans un gradient d'oxygène, évitant les dommages dus au stress oxydatif. Sa P50, d'environ 7 mmHg, est plus faible que celle de l'Hb humaine (~23 mmHg) indiquant une affinité plus forte pour l'O<sub>2</sub> [288].

Les caractéristiques fonctionnelles de M101, sa haute affinité pour l'O<sub>2</sub> ainsi que son activité antiradicalaire intrinsèque (de type SOD) liée aux chaînes de structure, peuvent s'avérer bénéfiques au cours de la préservation des organes avant la transplantation. Son activité antioxydante devrait permettre d'éviter à la fois la présence nocive d'EOR associés à l'hème et la libération des produits de dégradation d'Hb qui peuvent exacerber les lésions d'IR. De plus, M101 fonctionne dans une large gamme de températures (de 4°C à 37°C) permettant de l'utiliser lors de la conservation hypothermique.

M101 est dérivé d'un organisme marin qui est soumis à d'importants changements de températures et de conditions environnementales : passant de la normoxie/normothermie, à marée basse, à l'hypoxie/hypothermie, à marée haute. L'évolution lui a donc permis d'utiliser, de manière plus efficace, le transport d'O<sub>2</sub>, à des températures basses, avec la capacité de résister à un environnement difficile, comme l'hypoxie pendant de longues périodes. M101 semble donc parfaitement adapté à des conditions qui ressemblent au processus de conservation d'organes et de la transplantation. La technologie HEMO2Life® utilise une molécule représentant des millions d'années d'évolution pour cibler le cœur des lésions dans l'IR: le manque d'O<sub>2</sub>.

## B. RESULTAT 1 : EVALUATION DE L'AJOUT D'UN NOUVEAU TRANSPORTEUR D'OXYGENE THERAPEUTIQUE SUR LA FIBROSE CHRONIQUE ET LA DYSFONCTION DE L'ORGANE LORS DE LA PRESERVATION STATIQUE RENALE

Les résultats présentés dans cette partie ont été publiés en 2011 dans la revue « American Journal of Transplantation » (jointe en annexe de cette partie) et dont les références sont les suivantes :

Thuillier R, Dutheil D, Ngo Trieu M T, Mallet V, Allain G, Rousselot M, Denizot M, Goujon J-M, Zal F and Hauet T (2011). **Supplementation with a new therapeutic oxygen carrier reduces chronic fibrosis and organ dysfunction in kidney static preservation.** American Journal of Transplantation. 11(9):1845-60.

N'ayant participé qu'à la partie concernant l'étude *in vivo* chez le porc, la partie *in vitro* ne sera pas approfondie.

### 1. Objectifs de l'étude

Le protocole de préservation d'organe le plus couramment utilisé implique la conservation en hypothermie à 4°C [15, 296], dans le but de réduire le métabolisme et donc le besoin de l'organe en oxygène. Cependant, même si le métabolisme est ralenti, la cellule a encore besoin d'oxygène, l'hypoxie reste donc un des principaux obstacles à surmonter dans l'amélioration de la qualité des organes. La présente étude a consisté à évaluer les effets du transporteur naturel d'oxygène M101, hémoglobine extracellulaire du ver marin *Arenicola marina*, en tant qu'additif aux solutions de conservation dans la transplantation rénale.

Pour cela, nous avons tout d'abord caractérisé les propriétés de cette molécule. Puis, nous avons déterminé ses effets sur la viabilité et l'activité métabolique cellulaire dans un modèle *in vitro* de cellules rénales de porc LLC-PK1. Et enfin, nous avons évalué ces mêmes effets sur la conservation de rein de porc autogreffé par mesure de la fonction rénale et de l'intensité des lésions histologiques suite à la séquence d'IR.

## 2. Protocoles utilisés

En premier lieu, la caractérisation des deux propriétés majeures de M101, que sont le transport d'oxygène et son activité de type SOD, a été effectuée *in vitro*.

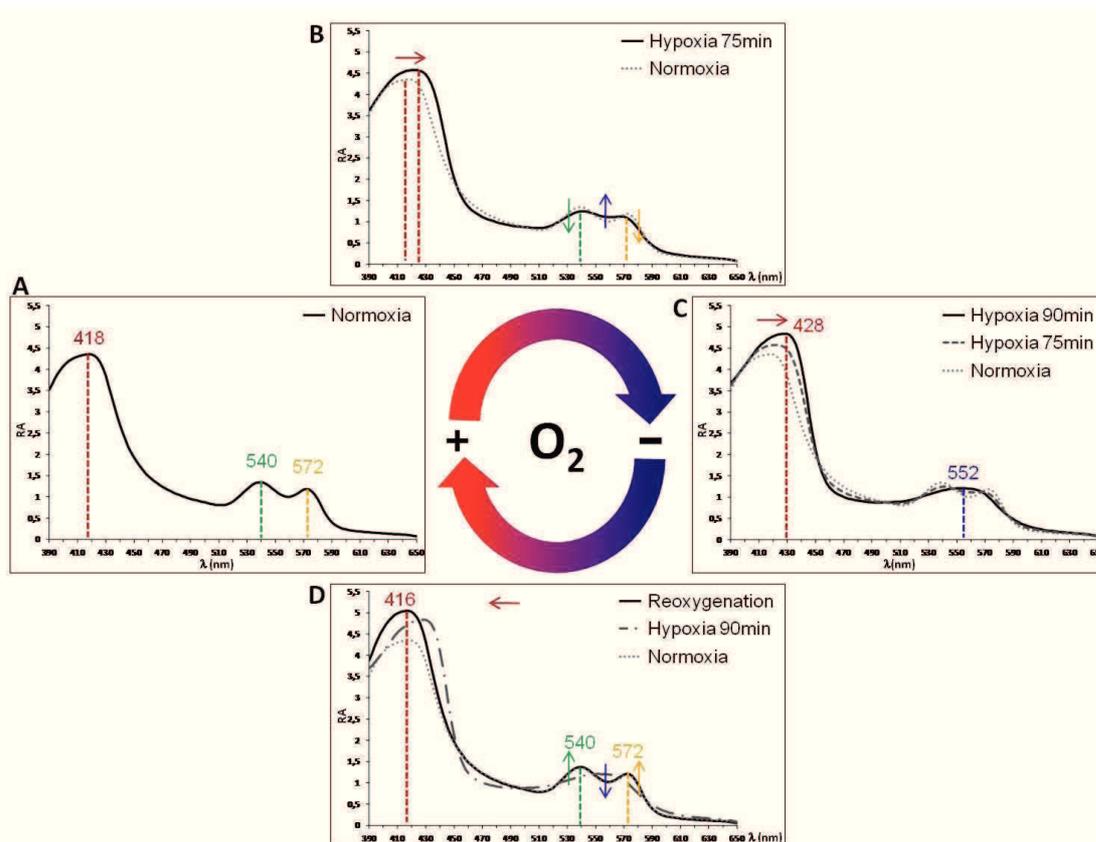
La deuxième partie de ce travail a été réalisée sur un modèle de cellules LLC-PK1 (lignée de cellules tubulaires proximales porcine) soumise à une hypothermie à 4°C en air ambiant dans différentes solutions commerciales de conservation (UW, HTK, IGL, Celsior, Ringer Lactate ou Perfadex) supplémentées ou non en M101. Des évaluations de la mortalité et de la viabilité cellulaire ainsi que de la quantité d'ATP ont été réalisées.

Pour la dernière partie de cette étude, nous avons utilisé un modèle *in vivo* d'autotransplantation de rein de porc Large White. Des évaluations de la fonctionnalité du greffon et des lésions histologiques rénales ainsi que l'inflammation ont été effectuées. Dans un souci de clarté, la terminologie utilisée dans les articles sera conservée dans les parties résultats en français.

## 3. Résultats obtenus

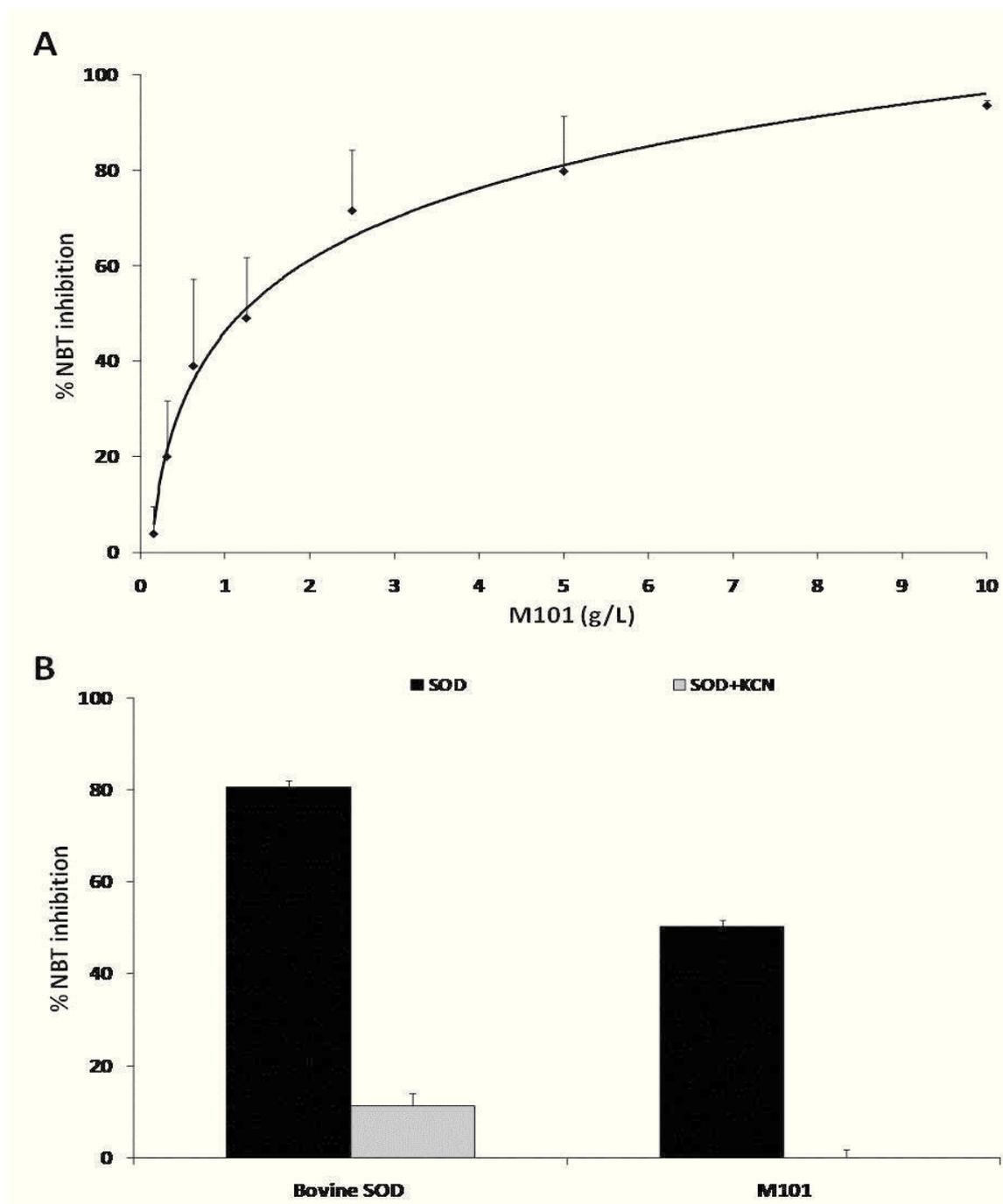
### 3.1. Evaluation de la fonctionnalité et de la stabilité dans différentes solutions de conservation de la molécule M101

Une étude de la liaison de l'oxygène de la molécule M101 a tout d'abord été réalisée. La molécule a été mise en solution dans l'UW et elle a été désoxygénée soit par flush de N<sub>2</sub> soit par ajout de cellules LLC-PK1 afin de consommer l'oxygène. Dans des conditions atmosphériques normales (normoxie), M101 dissous dans l'UW fixe l'oxygène (HbO<sub>2</sub>), on observe alors sur la courbe du spectre d'absorption un pic important à 418 nm, qui correspond à la protéine de l'Hb, ainsi que deux pics plus petits à 540 et 572 nm, qui correspondent aux bandes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hème de l'Hb (Figure 31A). La présence de ces deux pics sur le spectre d'absorption est caractéristique de la fixation de l'oxygène par l'hème de l'Hb. Ensuite, la préparation a été fermée hermétiquement et l'oxygène consommé par les cellules (hypoxie). Après 75 min d'hypoxie, le spectre M101 change progressivement vers une conformation désoxy-Hb avec un décalage de la bande de Soret, une baisse des bandes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hème et une augmentation de l'absorbance autour de 555 nm (Figure 31B). La désoxygénation complète apparaît au bout de 90min d'hypoxie : le spectre montre une bande de Soret avec un maximum à 428 nm et un plateau avec un maximum à 555 nm, qui est le spectre caractéristique de la désoxy-Hb dérivé (Figure 31C). Cet état est réversible car l'oxygénation de la préparation permet de réobtenir le spectre initial de M101 (Figure 31D).



**Figure 30 :** Courbes des spectres de M101, ajoutée à la solution UW à une concentration de 1g/L, au cours du temps. (A) Spectre dans des conditions atmosphériques normales (normoxie). (B) Spectre après 75 minutes d’hypoxie (—) et en normoxie (···). (C) Spectre après 90 minutes d’hypoxie (—), 75 minutes d’hypoxie (--) et en normoxie (···). (D) Spectre après réoxygénation (—), 90 minutes d’hypoxie (--) et en normoxie (···). 416, 418, 428 nm : maximum de la bande de Soret ( $\gamma$ ); 540 nm : maximum de la bande bêta ( $\beta$ ); 572 nm : maximum de la bande alpha ( $\alpha$ ); 555 nm : maximum de la bande  $\beta/\alpha$ .

Puis l’activité de type SOD de la molécule M101 a été vérifiée par un test NBT qui est basé sur la réduction d’un sel de tétrazolium, le nitrobleu tétrazolium (NBT), en un produit de formazan coloré (NBT-diformazan) par les anions superoxydes. La SOD piège les anions superoxydes, ce qui réduit le taux de formation du formazan. La molécule M101 permet une inhibition totale (Figure 32A,  $93,5 \pm 1,1\%$ ) de la formation de NBT (nitrobleu tétrazolium). Cette activité est totalement inhibée par le KCN, un inhibiteur spécifique de l’activité enzymatique de la SOD Cu/Zn (Figure 32B). Ainsi, la molécule M101 démontre par ce test une activité Cu/Zn SOD-like d’un haut niveau d’efficacité.



**Figure 31 :** (A) Evaluation du pourcentage d'inhibition de la formation de NBT en présence de doses croissantes de M101 lors d'une production d'anion superoxyde constante. (B) Evaluation du pourcentage d'inhibition de la formation de NBT en présence de M101 ou de SOD bovine provenant d'érythrocyte, utilisée comme contrôle. L'activité SOD totale (SOD, barres noires) a été comparée à l'activité SOD-Cu/Zn spécifique en présence de KCN (SOD+KCN, barres grises). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes.

Enfin, afin de vérifier la possibilité d'utiliser cette molécule en préservation, la stabilité de M101 a été analysée dans les solutions UW, HTK, IGL, Celsior, RG et Perfadex (Tableau 4). La constante de dissociation et la demi-vie montrent que M101 est stable pendant de longues périodes de temps, indiquant un haut degré de compatibilité avec la majorité des solutions de préservation utilisées actuellement.

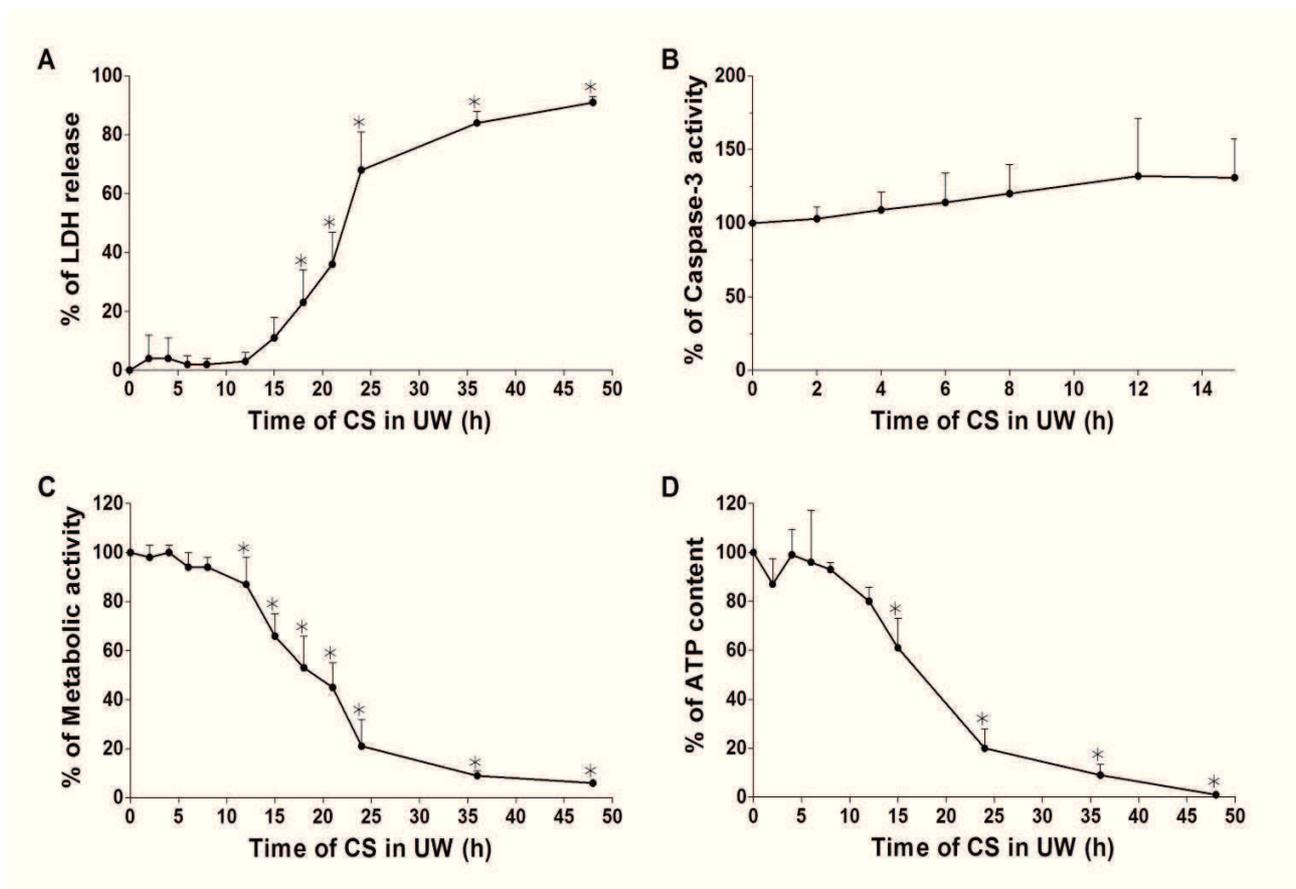
M101 Stability							
Solution	Buffer <sup>2</sup>	UW <sup>2</sup>	HTK <sup>1</sup>	IGL <sup>2</sup>	Celsior <sup>2</sup>	RL <sup>1</sup>	Perfadex <sup>1</sup>
$k_d$ (h <sup>-1</sup> )	0.00015	0.00017	0.00171	0.00107	0.00056	0.00140	0.00036
$T_{1/2}$ (h)	3333	2941	292	467	893	357	1389

$k_d$  = dissociation constant;  $T_{1/2}$  = half-life.  
<sup>1</sup> Stability of M101 was assayed for 24 h at 4°C in different commercial solutions in comparison with the conditioning buffer (Buffer).  
<sup>2</sup> Stability of M101 was assayed for 48 h at 4°C in different commercial solutions in comparison with the conditioning buffer (Buffer).

**Tableau 3 :** Evaluation de la stabilité de M101 dans différentes solutions commerciales de conservation de greffons

### 3.2. Détermination de la protection de la molécule M101 contre des lésions d'hypothermie cellulaire

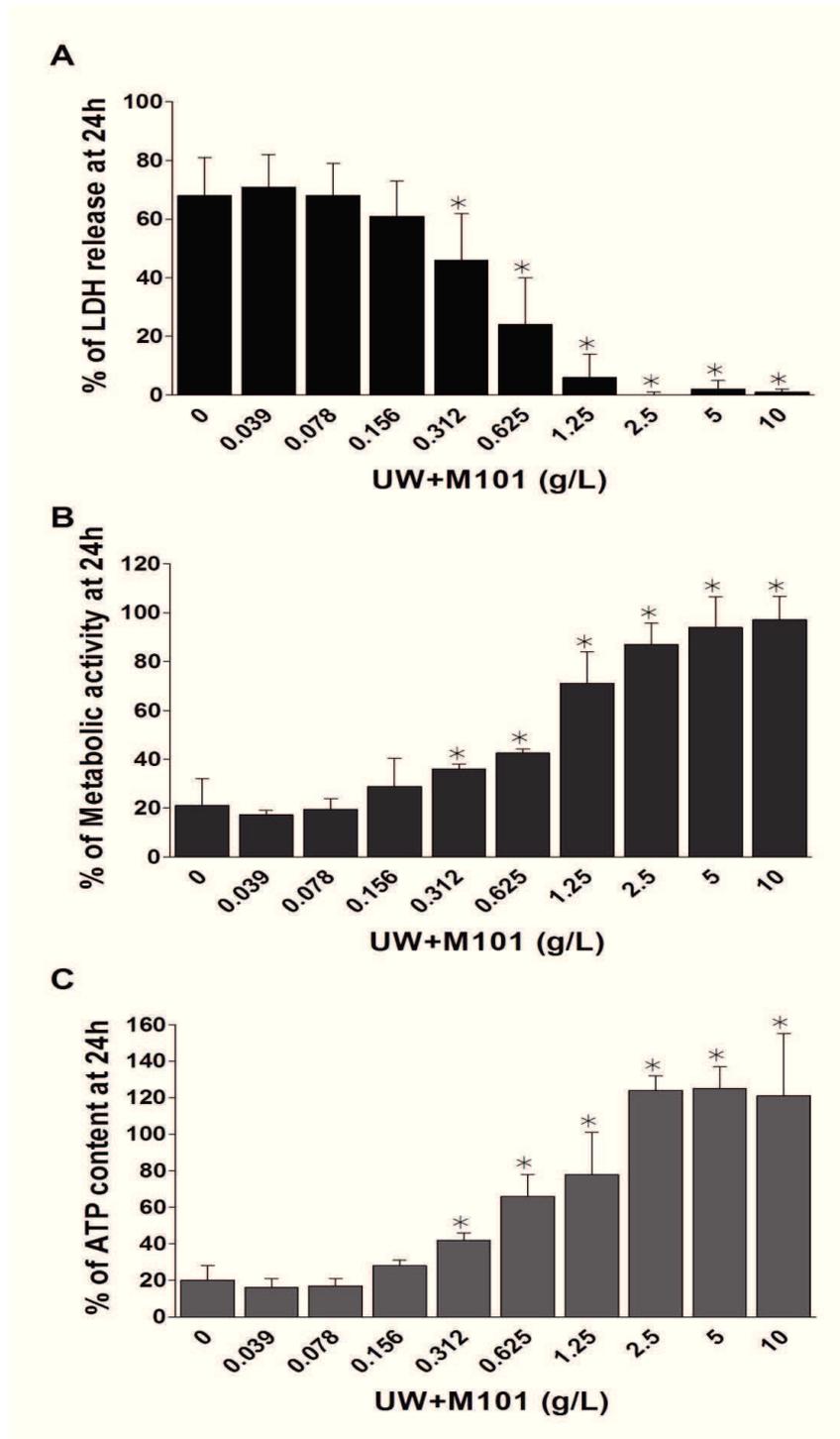
Les effets de la conservation en UW sur des cellules épithéliales rénales ont tout d'abord été déterminés. Seuls les effets de l'UW et de l'hypothermie ont été observés, les cellules n'ayant pas été soumises à une hypoxie. L'évaluation de la viabilité cellulaire par quantification de la libération de LDH, qui est le reflet de la nécrose, a démontré une perte de la viabilité cellulaire après 12h de conservation statique en UW (Figure 33A) et une mortalité quasi totale à 48h. L'activité métabolique, évaluée par un test MTT (Figure 33C), et la quantité d'ATP intracellulaire (Figure 33D) ont été réduites de façon concomitante avec la libération de LDH. On note également pour ces deux tests une perte quasi-totale de l'activité métabolique et totale de la quantité d'ATP après 48h de conservation en UW. Cependant, l'activation de la caspase-3, signe d'apoptose, n'a pas été observée de façon significative (Figure 33B).



**Figure 32 :** Evaluation des dommages cellulaires suite à une conservation des cellules LLC-PK1 à 4°C pendant 48h en UW par quantification de la LDH libérée (A), de l'activité de la caspase-3 (B), de l'activité métabolique (C) et de la quantité d'ATP intracellulaire (D). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes. \*  $p < 0.05$  vs temps 0.

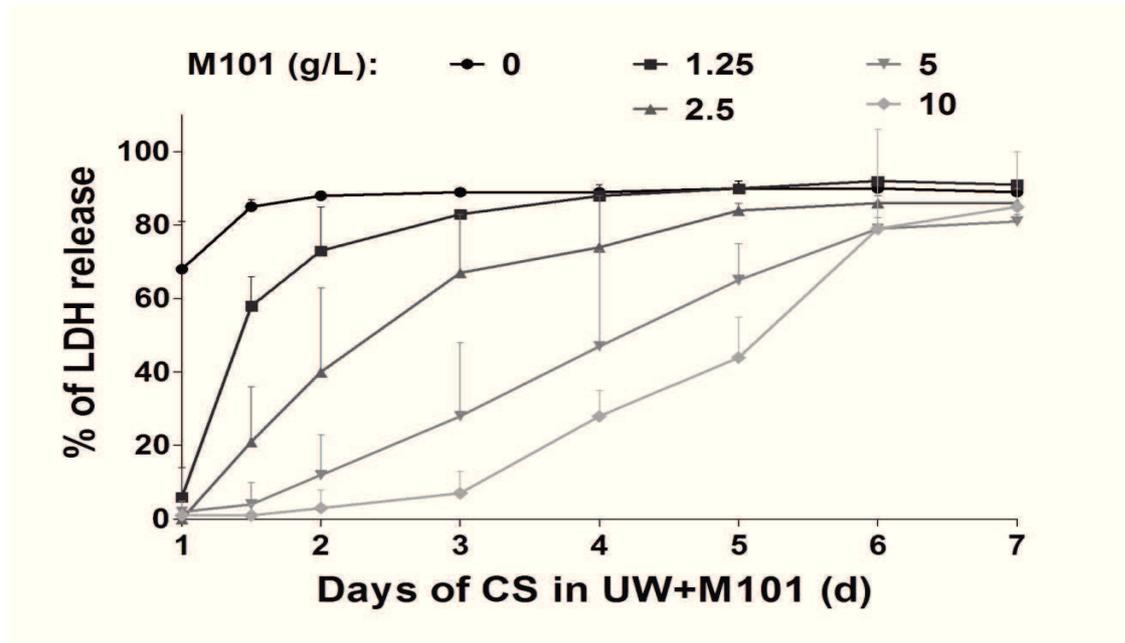
A l'inverse, la molécule M101 a protégé les cellules épithéliales rénales de ces événements. En effet, lorsque M101 est ajouté, même en faible quantité (0,312 g/L) à la solution UW, on observe une diminution significative de la nécrose ainsi qu'une activité métabolique cellulaire et une quantité d'ATP significativement plus élevée après 24h de conservation à 4°C (Figure 34). Une protection totale a été atteinte à partir d'une concentration de 1,25 g/L de M101 comme le souligne les résultats de libération de la LDH :  $6 \pm 8\%$ , de MTT :  $71 \pm 13\%$ ; et de quantification de l'ATP :  $78 \pm 23\%$ . De plus, on observe une augmentation de la quantité d'énergie cellulaire lorsque les cellules ont été conservées à des concentrations à partir de 2,5 g/L de M101 tel que le souligne l'augmentation de 120% de la quantité d'ATP par rapport aux cellules conservées avec l'UW seul. Néanmoins, les doses supérieures à 2,5 g/L n'apportent pas de bénéfice supplémentaire. En effet, nous n'observons pas d'amélioration, au niveau de la viabilité et de la quantité d'ATP, une fois la dose de 2,5 g/L atteinte. Par contre, M101

protège les cellules de façon dose et temps dépendants comme le démontre les résultats d'évaluation de la nécrose (Figure 35). Il a été observé une libération de la LDH inférieure à 20% après 24h de conservation en présence de M101 à une concentration de 1,25 g/L, 36h à 2,5 g/L, 48h à 5 g/L et 72h à 10 g/L.



**Figure 33:** Suite à une conservation à 4°C pendant 24h dans la solution UW contenant des concentrations croissantes de M101 allant de 0 à 10g/L, les dommages cellulaires ont été déterminés

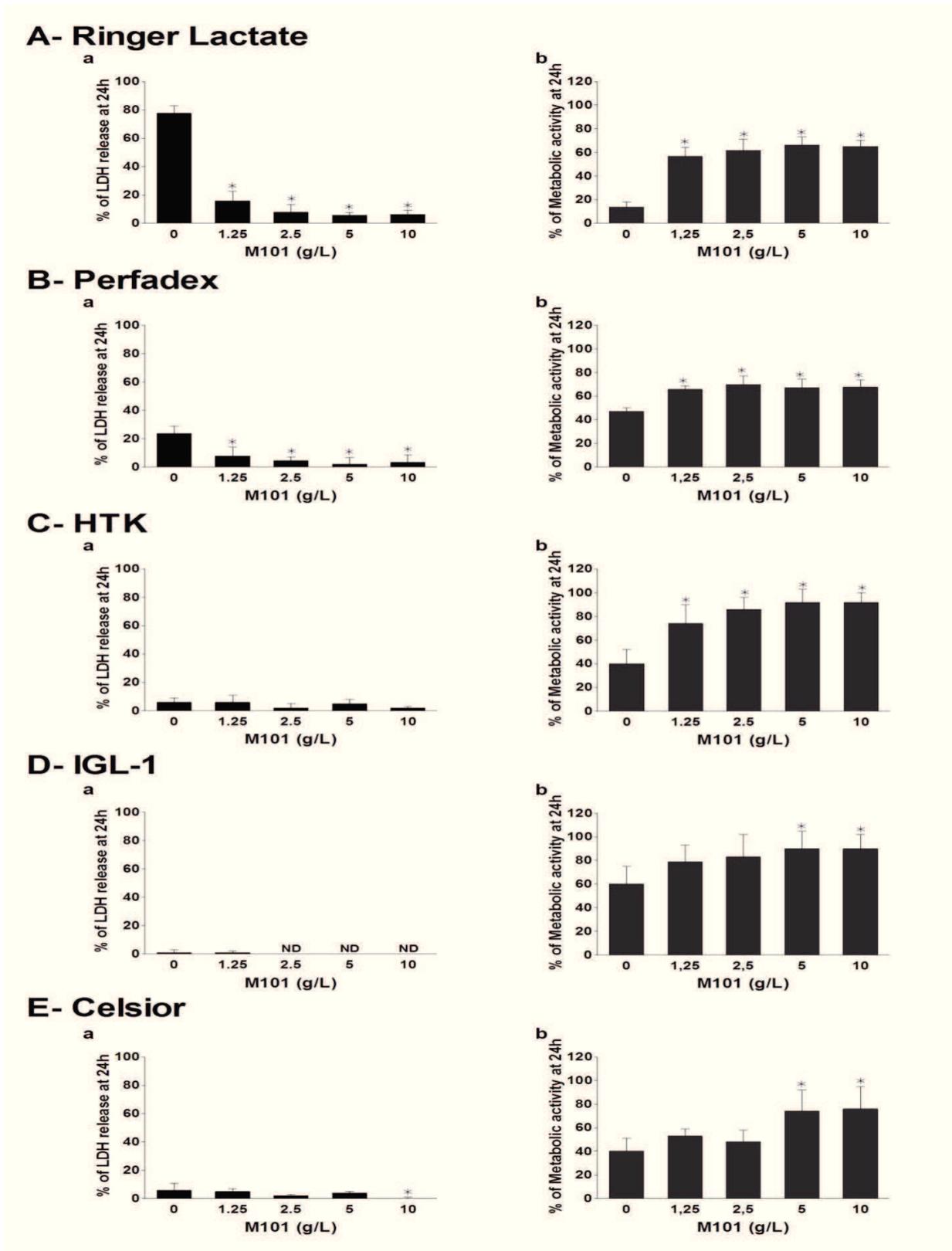
par dosage de la libération de LDH (A), de l'activité métabolique (B) et de la quantité d'ATP intracellulaire (C). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes. \*  $p < 0.05$  vs UW seul.



**Figure 34 :** Suite à une conservation des cellules LLC-PK1 à 4°C pendant sept jours en UW contenant des doses croissantes de M101 allant de 0 à 10g/L, les dommages cellulaires ont été évalués par quantification de la LDH libérée. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes.

Les expériences ont été reproduites avec d'autres solutions telles que le Ringer Lactate (RG) (Figure 36A), le Perfadex (Figure 36B), l'histidine tryptophane ketoglutarate (HTK) (Figure 36C), l'IGL (Figure 36D) et le Celsior (Figure 36E). Comme pour l'UW, la conservation avec ces solutions a induit des dommages fonctionnels. Deux types de résultats ont été obtenus: de manière similaire à l'UW, les cellules conservées en hypothermie dans le RG et, dans une moindre mesure, dans le Perfadex présentaient à la fois une nécrose et une perte d'activité métabolique; tandis que les cellules conservées en hypothermie dans l'HTK, l'IGL ou le Celsior ne présentaient qu'une perte d'activité métabolique. Néanmoins dans chaque solution l'ajout de M101 a permis d'améliorer la viabilité et la fonctionnalité cellulaire avec une libération de LDH inférieure à 20% dans toutes les conditions et une activité métabolique comprise entre 50 et 100%. De plus, au niveau de la nécrose, on observe une diminution significative, dans le RG et le Perfadex, même avec la dose la plus faible à 1,25 g/L; les

autres solutions ne présentant pas de libération de LDH. Concernant l'activité métabolique, on note une augmentation significative dès 1,25 g/L dans le RG, le Perfadex et l'HTK alors que dans l'IGL-1 et le Celsior on voit une augmentation significative qu'à partir de 5 g/L de M101.



**Figure 23 :** Les cellules LLC-PK1 ont été conservées à 4°C durant 24h dans du Ringer Lactate (A), du Perfadex (B), de l'HTK (C), de l'IGL-1 (D) et du Celsior (E), supplémentés avec des

concentrations croissantes de M101 allant de 0 à 10g/L. Les dommages cellulaires ont été déterminés en pourcentage de libération de LDH **(a)** et de l'activité métabolique **(b)**. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes. \*  $p < 0.05$  vs cellules conservées en hypothermie dans les solutions de préservation seuls.

### 3.3. Effet de la molécule M101 sur la fonction rénale

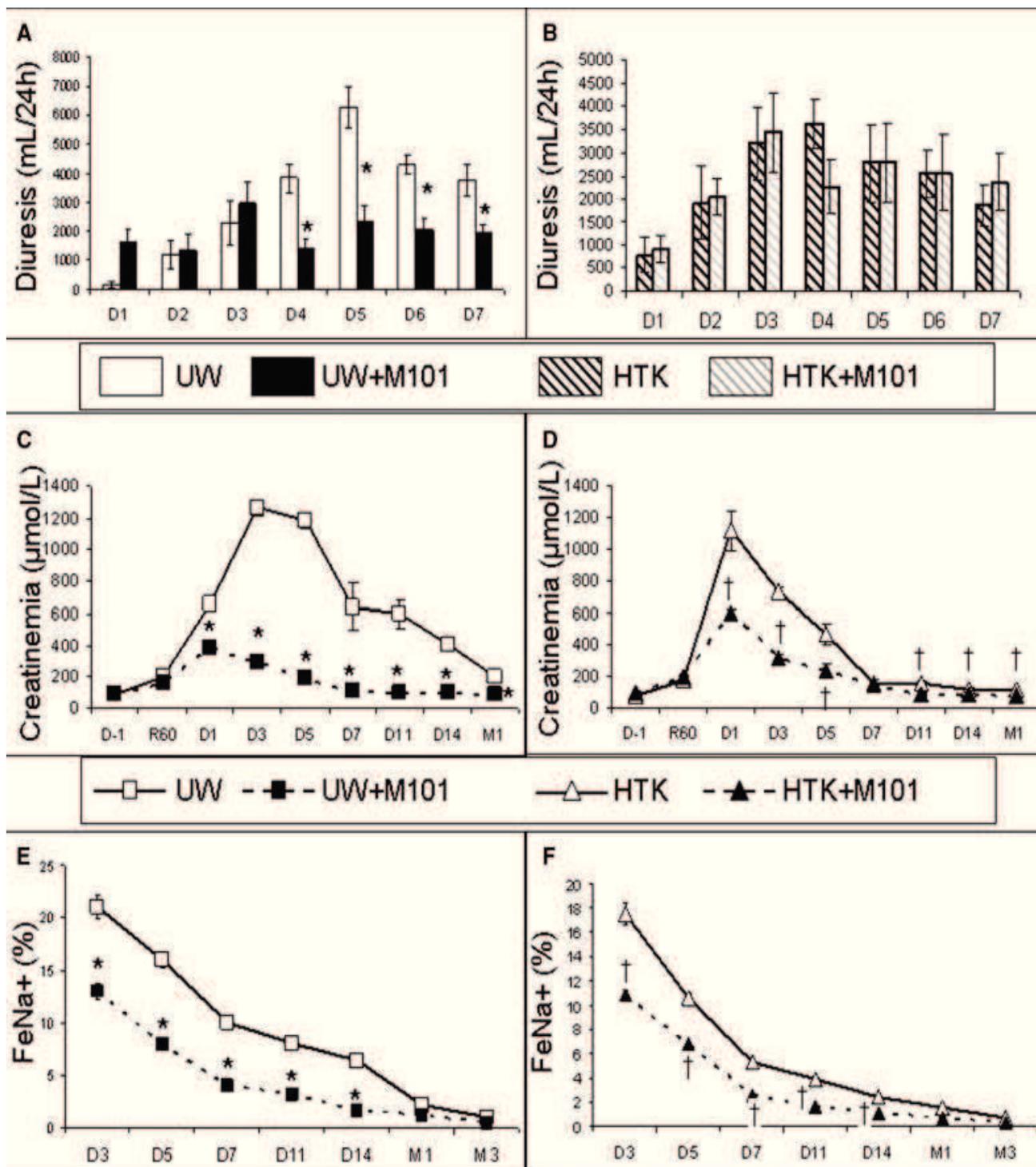
Afin d'évaluer les effets de M101 sur la fonction rénale, nous avons utilisé un modèle *in vivo* d'autotransplantation de rein de porc Large White. Différents groupes ont été utilisés : le groupe UW dans lequel les reins ont été conservés dans la solution UW uniquement, le groupe UW + M101 où les greffons ont été conservés dans la solution UW supplémentée par 5g/L de M101, le groupe HTK dans lequel les greffons ont été conservés dans la solution HTK uniquement et le groupe HTK + M101 où les reins ont été conservés dans la solution HTK à laquelle a été ajoutés 5g/L de M101. Dans chaque groupe, le rein droit a été récupéré, lavé avec la solution préalablement refroidie puis conservé de façon statique à 4°C pendant 24h dans les différentes solutions. Le rein gauche a été néphrectomisé afin de reproduire la masse néphronique observée en situation clinique. Les reins ont ensuite été autogreffés et les animaux ont été suivis pendant 3 mois. En parallèle, un groupe contrôle «sham-operated» a été réalisé. Un dosage de la créatininémie a été réalisé pour évaluer la fonction rénale un jour avant la greffe (D-1), à 60 min (R60), D1, D3, D4, D5, D6, D7, D11, D14, 1 mois (M1) et M3 post-reperfusion dans l'ensemble des groupes expérimentaux étudiés. Comparés aux reins préservés en UW seul, les reins conservés avec de l'UW supplémenté en M101 ont montré des signes de reprise de diurèse tôt après la greffe, comme le démontre la production d'urine à D1 contrairement à D2 pour le groupe UW seul (Figure 37A,  $p = 0.016$ ). De plus, les porcs du groupe UW + M101 ont retrouvés un niveau significatif de production urinaire plus rapidement à D4. Les groupes HTK et HTK + M101 présentaient quant à eux des reprises de diurèse équivalentes (Figure 37B).

En termes de reprise de fonction, nous avons observé que les taux de créatinine sérique du groupe UW montraient des niveaux élevés atteignant un sommet à D3 et diminuant lentement par la suite, avec un taux de 503  $\mu\text{mol/L}$  à J14 (5 fois le niveau pré-transplant). Les animaux du groupe UW+M101, quant à eux, ont montré des niveaux significativement plus bas avec un sommet à D1 et une récupération accélérée menant aux niveaux observés avant transplantation à D7 ( $p = 0.009$  à tous les points de temps, Figure 37C).

Concernant la préservation avec l'HTK, seuls les porcs du groupe HTK seul ont montré un pic de créatinine sérique élevée à D1, suivi d'une lente reprise restant au-dessus des niveaux avant

transplantation tandis que les animaux du groupe HTK+M101 ont montré un pic significativement inférieur à D1 ( $p = 0,009$ ) et une récupération plus rapide du niveau avant transplantation à D11 (Figure 37D).

Puis, nous avons dosé la fraction d'excrétion du sodium ( $\text{FeNa}^+$ ) qui est une mesure du pourcentage de sodium excrété dans les urines par rapport au sodium réabsorbé par le rein. Normalement, le sodium est réabsorbé au niveau de différents segments du tubule rénal, mais lorsque le tubule est lésé, sa capacité de réabsorption est altérée entraînant une augmentation de la valeur de la fraction d'excrétion du sodium. Les mesures de réabsorption du sodium ont montré une amélioration significativement supérieure dans les reins conservés avec M101 par rapport aux solutions seules, confirmant une meilleure récupération.



**Figure 36 :** Evaluation de la fonction rénale après transplantation des reins conservés en UW (A-C-E) ou HTK (B-D-F) sans ajout de M101 (groupes UW et HTK) ou contenant 5g/L de M101 (groupes UW+M101 et HTK+m101) par diurèse (A-B), créatininémie (C-D) et fraction d'excrétion du sodium (E-F). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SD de cinq expériences indépendantes. \*  $p < 0.05$  vs UW; †  $p < 0.05$  vs HTK.

### 3.4. Impact de la molécule M101 sur l'intégrité tissulaire des greffons

Suite à une coloration standard à l'Acide périodique de Schiff (PAS) permettant de mettre en évidence les mucines (épithélium à bordures en brosse), les membranes basales et le glycogène, une analyse histologique a été réalisée. L'évaluation histologique de la perte de la bordure en brosse et du détachement cellulaire, typique des lésions tubulaires d'IR, révèlent des dommages importants dans les greffons UW à D7 et D14, qui se stabilisent à M1 (Figure 38, tableau 5, partie supérieure). Les reins du groupe UW+M101 présentent des lésions moins étendues concernant la perte de la bordure en brosse ce qui empêche le détachement endoluminal. Le groupe HTK entraîne également des lésions importantes à D7 et D14 concernant la perte de bordure en brosse; par contre, on observe un faible détachement luminal qui n'apparaît plus après D7. Les groupes HTK ont montré une tendance similaire à l'amélioration de la perte de la bordure en brosse par M101 mais celle-ci n'a pas apporté de changement au niveau du détachement endoluminal.

Histological Score						
Groups	Brush Border Loss			Endoluminal detachment		
	D7	D14	M1	D7	D14	M1
UW	3.5 ± 1.1	2.6 ± 0.9	2.1 ± 0.3	3.1 ± 0.3	2.5 ± 0.6	2.0 ± 0.1
UW + M101	2.0 ± 1.4	2.0 ± 1.5	1.8 ± 0.4	0	0	0
HTK	3.5 ± 0.6	2.3 ± 1.2	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0.1	0	0
HTK + M101	3.0 ± 1.6	1.5 ± 0.6	1.4 ± 0.5	1.0 ± 0.5	0	0

Inflammation						
Groups	Immune Infiltration			Tubulitis		
	D7	D14	M1	D7	D14	M1
UW	3.1 ± 0.4	3.2 ± 0.3	2.6 ± 0.4	3.2 ± 0.4	3.1 ± 0.2	3.0 ± 0.3
UW+M101	0.0 ± 0.0 <sup>1</sup>	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.0	0	0	1.0 ± 0.1
HTK	1.5 ± 0.6	1.3 ± 1.2	1.2 ± 0.4	0.8 ± 0.9	0.7 ± 0.6	1.2 ± 0.4
HTK+M101	1.5 ± 0.9	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.5	0.5 ± 0.6	1.0 ± 0.1

Groups	CD3+ at 3 month		ED1+ at 3 month	
	Mean	SEM	Mean	SEM
UW	17.0	± 2.0	12.5	± 1.5
UW+M101	6.9	± 0.4 <sup>1</sup>	9.5	± 0.4
HTK	23.0	± 1.4	17.3	± 3.2
HTK+M101	14.2	± 3.9 <sup>2</sup>	6.6	± 1.2 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>p < 0.05 to UW.

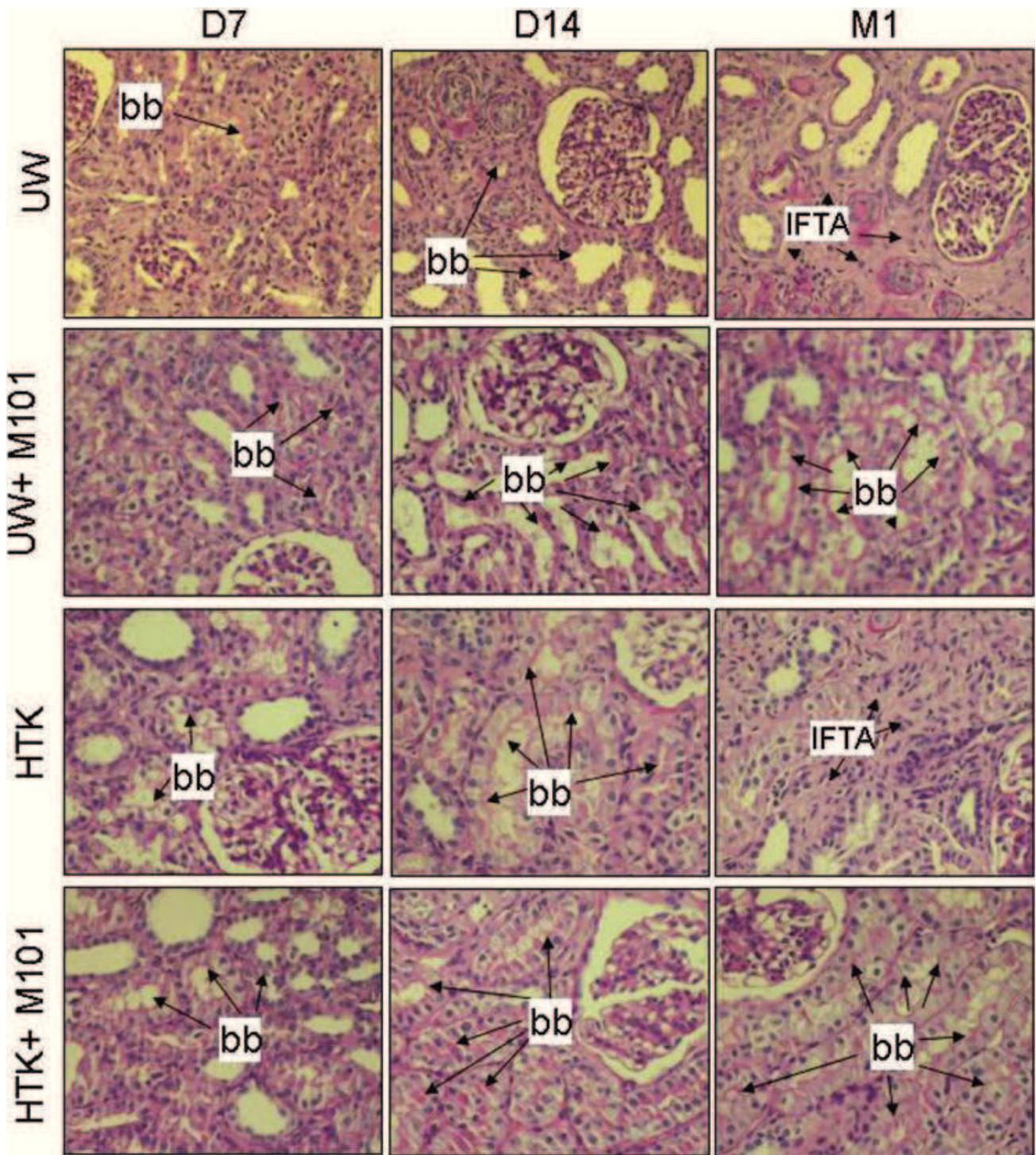
<sup>2</sup>p < 0.05 to HTK; n = 5.

Top panel: Typical IRI histological lesions, brush border loss and endoluminal detachment, were assayed for UW, UW+M101, HTK and HTK + M101 groups after 7 days, 14 days and 1 month posttransplantation. Scale: 0, no abnormality; 1, mild lesions affecting less than 25% of kidney samples; 2, lesions affecting 25–50% of kidney samples; 3, lesions affecting 51–75% of kidney samples; 4, lesions affecting more.

Middle panel: Inflammation was evaluated by measurement of tubulitis and immune infiltration and invasion for UW, UW + M101, HTK and HTK + M101 groups after 7 days, 14 days and 1 month posttransplantation. Quantitative determination was adapted from Banff classification: 0, no mononuclear inflammatory cell in tubules; 1, Foci with 1 to 4 mononuclear cells per tubular cross-section or 10 tubular cells; 2, Foci with 5 to 10 mononuclear cells per tubular cross-section; and 3, Foci with more than 10 mononuclear cells per tubular cross-section. Shown are mean ± SD.

Bottom panel: Inflammation was evaluated by measurement of CD3+ and ED1+ after 3 months posttransplantation. 3-month samples were specifically stained by immunofluorescence and the average number of positive cells by high-powered field (200×) was determined. Shown are mean ± SEM.

**Tableau 4 :** Evaluation de l'intensité des lésions histologiques et de l'inflammation des greffons rénaux dans les différents groupes



**Figure 37:** Marquage à l'acide périodique de Schiff de biopsies de reins à D1, D14 et M1 après transplantation pour les groupes UW, UW+M101, HTK, HTK+M101. Les flèches indiquent la perte de la bordure en brosse (bb) et la fibrose interstitielle/atrophie tubulaire (IFTA).

### 3.5. Effet de la molécule M101 sur l'inflammation

Le degré d'invasion des tissus par les cellules du système immunitaire a également été évalué. Dans un premier temps, une évaluation semi-quantitative a été réalisée sur les sections marquées au PAS utilisée précédemment. Par cette technique, on observe un développement important de la réponse immunitaire dans les greffons UW pendant toute la durée du suivi. Au contraire, les reins conservés en UW+M101 ont montré une faible infiltration immunitaire précoce ainsi qu'une réduction des signes d'inflammation tardifs (Tableau 5). Les groupes HTK montrent également un faible niveau d'infiltration précoce mais ils montrent des signes d'inflammation tardifs plus élevés que les groupes UW.

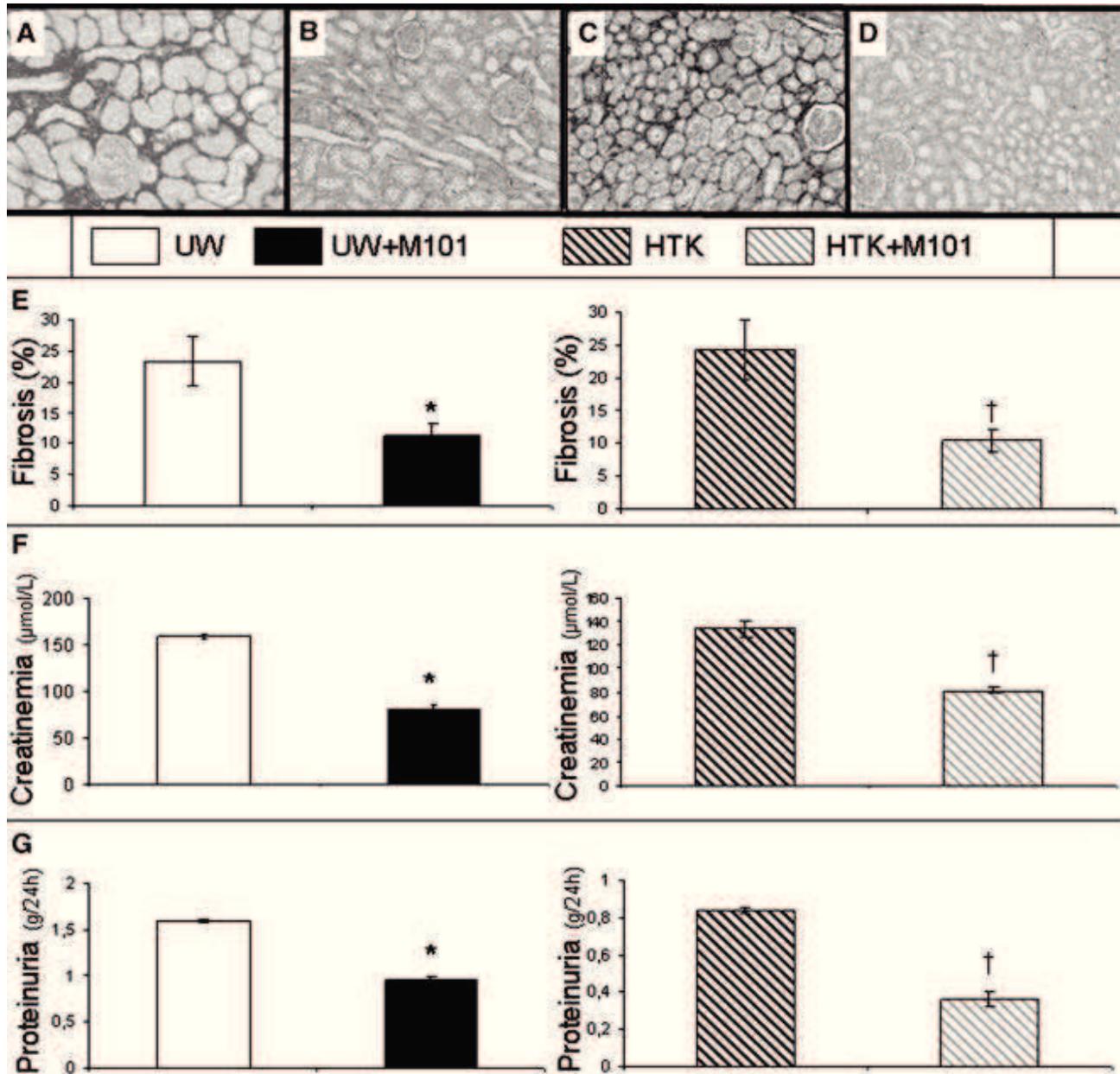
Une analyse plus détaillée à 3 mois a été réalisée par l'intermédiaire de la technique d'immunohistochimie, détectant dans un premier temps les cellules de la réponse immunitaire innée, positive à l'ED1 qui est présent à la surface des macrophages porcins, puis les cellules de la réponse adaptative grâce à un anticorps dirigé contre CD3, marqueur emblématique des lymphocytes T. Ces outils révèlent qu'à 3 mois l'invasion des cellules immunitaires innées (ED1+) et adaptatives (CD3+) est diminuée dans les reins conservés avec M101 par rapport aux solutions seules.

### 3.6. Détermination de l'impact de M101 sur le développement de la fibrose

Les porcs ont été euthanasiés à 3 mois, temps auquel nous avons déjà démontré le développement de la fibrose chronique dans ce modèle. Le développement de la fibrose interstitielle et de l'atrophie tubulaire (FIAT ou IFTA, en anglais) dans les greffons UW était étendu (23%), tandis que l'ajout de M101 les a réduit de façon significative (11%,  $p = 0,049$ , Figure 39E). Les reins HTK ont également montré un développement important de la FIAT (25%). Ici aussi, l'ajout de M101 a réduit de manière significative le développement des dommages (10%,  $p = 0,038$ ).

La fonction rénale a ensuite été analysée par dosage de la créatinine sérique et de la protéinurie. La clairance rénale représente le volume de sang ou de plasma complètement épuré d'une substance par le rein, par unité de temps. La clairance de la créatinine, une substance complètement filtrée et non réabsorbée, reflète le débit de filtration glomérulaire. Lors du dosage de la protéinurie, la quantité de protéines urinaires ne doit pas être supérieure à 0,15 g/24h. Une protéinurie élevée reflète des lésions de la barrière de filtration glomérulaire et /ou tubulaire, qui ne laisse normalement passer qu'une quantité limitée de protéines. Les dommages histologiques ont été associés à une perte chronique de fonction, comme dans les groupes HTK et UW qui présentaient des taux élevés de créatinine sérique et

de protéinurie. Les groupes HTK montrent, néanmoins, un taux de protéinurie deux fois moins élevé que les groupes UW. Pour les deux solutions, l'ajout de M101 a réduit de façon significative ces niveaux.



**Figure 38 :** (A-D) Marquage rouge Sirius représentatif pour les groupes UW (A), UW+M101 (B), HTK (C) et HTK+M101 (D) à M3 posttransplantation. (E) Quantification du développement de la fibrose (E), de la créatinémie (F) et de la protéinurie (G) dans chaque groupe. Les résultats correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM de cinq expériences indépendantes. \*  $p < 0.05$  vs UW; †  $p < 0.05$  vs HTK.

### 3.7. Evaluation des effets de M101 sur la reprise précoce de fonction et après 3 mois

Une autre analyse statistique a montré que l'ajout de M101 est corrélée négativement avec le taux de créatinine à D3 ( $R^2 = 0,75$ ,  $p = 0,0001$ ) et les niveaux d'excrétion de sodium à D3 ( $R^2 = 0,74$ ,  $p = 0,0001$ ). Par ailleurs, nous avons déterminé que l'ajout de M101 était également négativement corrélée avec les résultats des analyses des lésions chroniques (3 mois) : créatinine ( $R^2 = 0,75$ ,  $p = 0,0001$ ), protéinurie ( $R^2 = 0,55$ ,  $p = 0,013$ ) et fibrose ( $R^2 = 0,78$ ,  $p = 0,0001$ ). Une analyse Two-Way ANOVA a révélé qu'il y avait une interaction entre M101 et la solution utilisée pour produire la protection observée dans nos analyses de la phase aiguë: créatininémie ( $p = 0,001$ ) et réabsorption du sodium ( $p = 0,04$ ) à D3, tandis que les effets chroniques de M101 à 3 mois étaient indépendants de la solution utilisée (données non présentées).

## 4. Conclusions

Nous avons décrit dans cette étude les effets bénéfiques de M101, nouveau transporteur naturel d'oxygène, dans un modèle *in vitro* de cellules tubulaires rénales conservées en hypothermie et dans un modèle *in vivo* de greffons rénaux porcins conservés soit avec la solution UW ou la solution HTK. La conservation des cellules avec M101 permet une amélioration significative de la viabilité et de l'activité métabolique cellulaire ainsi qu'une quantité d'ATP plus élevée contrairement à la conservation en UW seul.

De plus, nous avons également démontré que l'utilisation de M101 dans un protocole de conservation statique en hypothermie, qui est la technique de conservation d'organe la plus utilisée, est corrélée à une meilleure reprise de fonction à court terme du greffon rénal ainsi qu'un meilleur résultat à long terme avec une réduction du développement de la FIAT, la cause principale de la perte du greffon.

## C. RESULTATS 2 : EVALUATION DE L'EFFICACITE/ DOSE ET DU MECANISME DU TRANSPORTEUR D'OXYGENE M101 SUR LA PRESERVATION DES ORGANES

Les résultats présentés dans cette partie ont été soumis pour publication dans la revue « » (jointe en annexe de cette partie) et dont les auteurs et le titre sont les suivants :

Mallet V, Dutheil D, Polard V, Thuillier R, Rousselot M, Leize E, Goujon J M, Zal F and Hauet T.

**Dose efficacy and mechanism of the natural oxygen transporter HEMO2Life® in organ preservation.**

### 1. Objectifs de l'étude

Dans l'étude précédente, nous avons rapporté l'utilisation d'une hémoglobine extracellulaire de ver marin, M101, dans la préservation statique, qui, lorsqu'elle est utilisée à une dose de 5 g/L dans les solutions UW ou HTK, permet d'améliorer la qualité du greffon dans un modèle porcin d'autotransplantation. La présente étude a eu un double objectif: tout d'abord, caractériser le mécanisme à l'origine de l'efficacité de M101 parmi les trois mécanismes de la molécule qui sont l'effet grosse molécule, l'activité anti-oxydante et l'activité transporteur d'oxygène; puis, dans un deuxième temps, cette étude a consisté à explorer les capacités de protection de faibles doses utilisées dans les protocoles de conservation avec la solution UW.

A ces fins, nous avons utilisé deux modèles mimant les conditions de préservation des organes : un modèle *in vitro* de cellules endothéliales (premier type cellulaire concerné par les lésions d'IR) en culture primaire dans un protocole d'hypoxie/réoxygénation et *in vivo* dans un modèle porcin de transplantation rénale.

## 2. Protocoles utilisés

La première partie de ce travail a été réalisée sur une culture primaire de cellules HAEC (cellules endothéliales aortiques humaines). Les cellules ont été soumises à une hypoxie à 4°C dans la solution UW supplémentée ou non en M101 à différentes doses suivie par une réoxygénation à 37°C en milieu de culture M200 complet pendant 24h. Des évaluations de la mortalité cellulaire, de l'activité métabolique ainsi que de la quantité d'ATP ont été réalisées. Ces évaluations ont également été complétées par une analyse de l'intégrité cellulaire réalisée par microscopie électronique.

Pour la deuxième partie de cette étude, nous avons utilisé un modèle *in vivo* d'autotransplantation de rein de porc Large White. Un dosage de la créatininémie a été effectué pour évaluer la fonction rénale et une analyse histologique a été réalisée pour évaluer l'étendue des lésions rénales dans chaque groupe expérimental. Dans un souci de clarté, la terminologie utilisée dans les articles sera conservée dans les parties résultats en français.

## 3. Résultats

### 3.1. Effet dose-dépendant de M101 sur les lésions d'IR

Nous avons évalué les effets de l'ajout de M101 à la solution UW dans un modèle *in vitro* d'hypoxie/ hypothermie et de réoxygénation qui reproduit les conditions de conservation des organes dans un modèle de cellule HAEC en culture primaire.

Les effets induits par 24h d'hypoxie/ hypothermie ont tout d'abord été observés. Les cellules conservées en UW seul (groupe 0 g/L) présentaient une concentration diminuée d'ATP intracellulaire comparée aux cellules qui n'avaient pas subi l'hypoxie/ hypothermie (groupe contrôle) (Figure 40A, 47% par rapport au contrôle,  $p < 0,05$ ), un niveau élevé de lactate déshydrogénase (LDH) libérée par les cellules nécrosées et une activité plus faible du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 40C, 51% par rapport au contrôle,  $p < 0,05$ ).

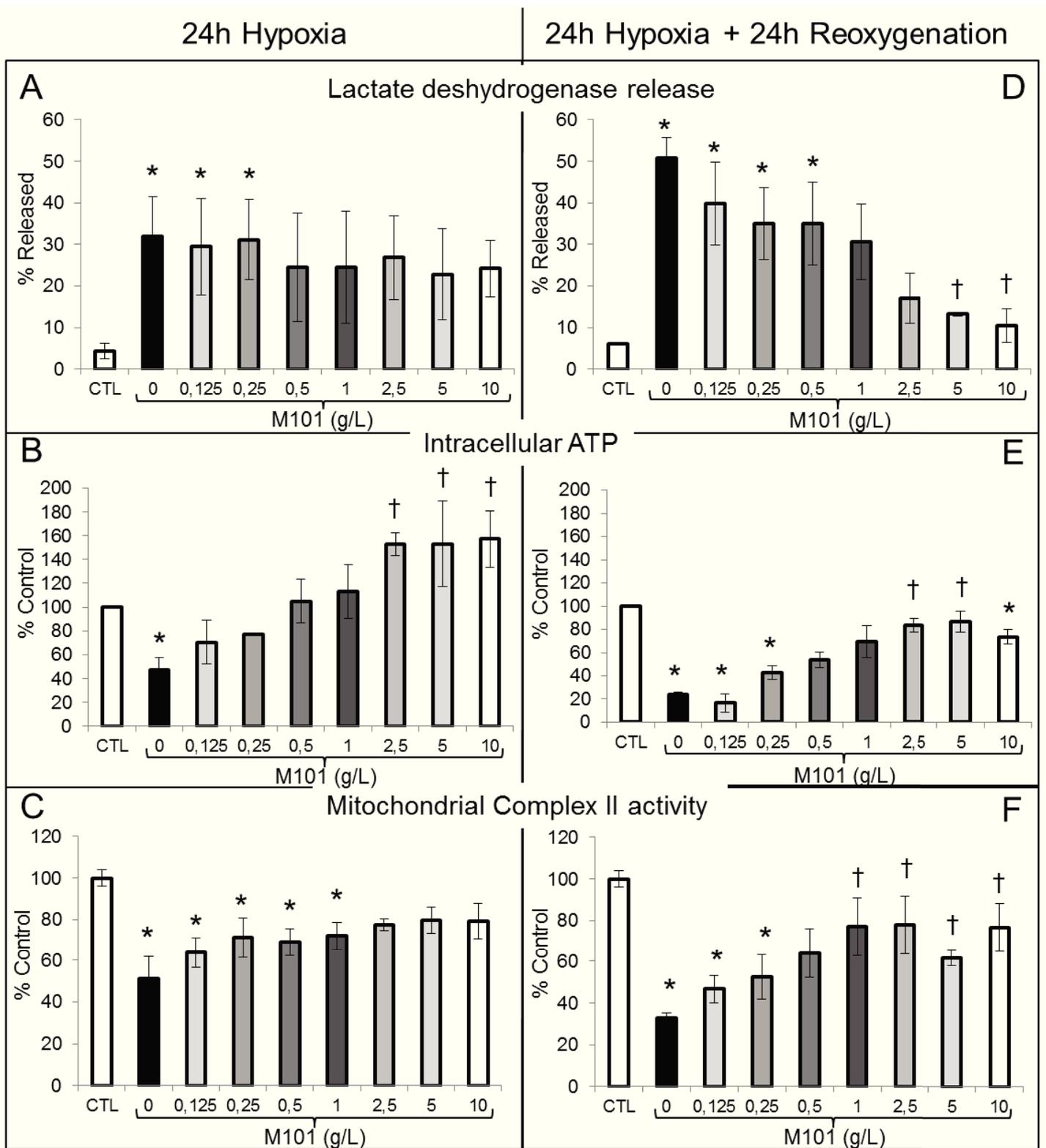
Au contraire, l'addition d'une quantité croissante de M101 à l'UW a pu progressivement améliorer ces paramètres, en particulier en ce qui concerne les niveaux d'ATP intracellulaire (les concentrations de 2,5; 5 et 10 g/L étant significativement différentes comparées à 0 g/L) et les niveaux d'activité du complexe II tandis que l'on n'observe pas de différence sur la nécrose.

Pour parfaire nos observations, nous avons mimé la reperfusion afin d'en étudier les conséquences sur les cellules. A la fin de la période d'hypoxie/hypothermie, les cellules ont été lavées quatre fois avec du PBS et réoxygénées en milieu de culture M200 complet à 37°C pendant 24 heures, dans le but

d'imiter la reperfusion. L'absence de M101 au cours de la période de réoxygénation a été évaluée par analyse spectrophotométrique de l'effluent de lavage, montrant qu'il ne reste aucune molécule M101 dans le puits de culture après le troisième lavage, même pour la concentration de M101 la plus élevée (données non montrées); ainsi, les bénéfices observés à la fin de la période de réoxygénation sont dus à l'action de la molécule au cours de la conservation.

Après 24h de réoxygénation, les cellules conservées en UW seul présentaient une diminution de l'activité du complexe II (Figure 40F, 33% du contrôle,  $p < 0,05$ ), et de la concentration intracellulaire d'ATP (Figure 40D, 24% par rapport aux cellules contrôles,  $p < 0,05$ ) ainsi qu'une augmentation de la mortalité cellulaire avec une libération de 51% de la LDH comparée à 6% dans le contrôle (Figure 40E,  $p < 0,05$ ). Confirmant les données obtenues à la fin de la préservation, les cellules conservées en présence de M101 montrent une amélioration de ces paramètres de façon dose-dépendante, pour atteindre 86% d'ATP intracellulaire, 62% d'activité métabolique et seulement 13% la libération de LDH à une dose de 5g/L ( $p < 0,05$  vs 0g/L). De plus, l'augmentation de la quantité d'ATP est significative à partir de l'ajout de 2,5 g/L de M101 (83%) et celle de l'activité métabolique est significative dès l'ajout de 1 g/L de M101 (77%).

Ces résultats montrent que, dans notre modèle *in vitro* d'IR, M101 est bénéfique pour la survie cellulaire de manière dose-dépendante, atteignant un niveau élevé de protection pour des doses comprises entre 1 et 5 g/L.



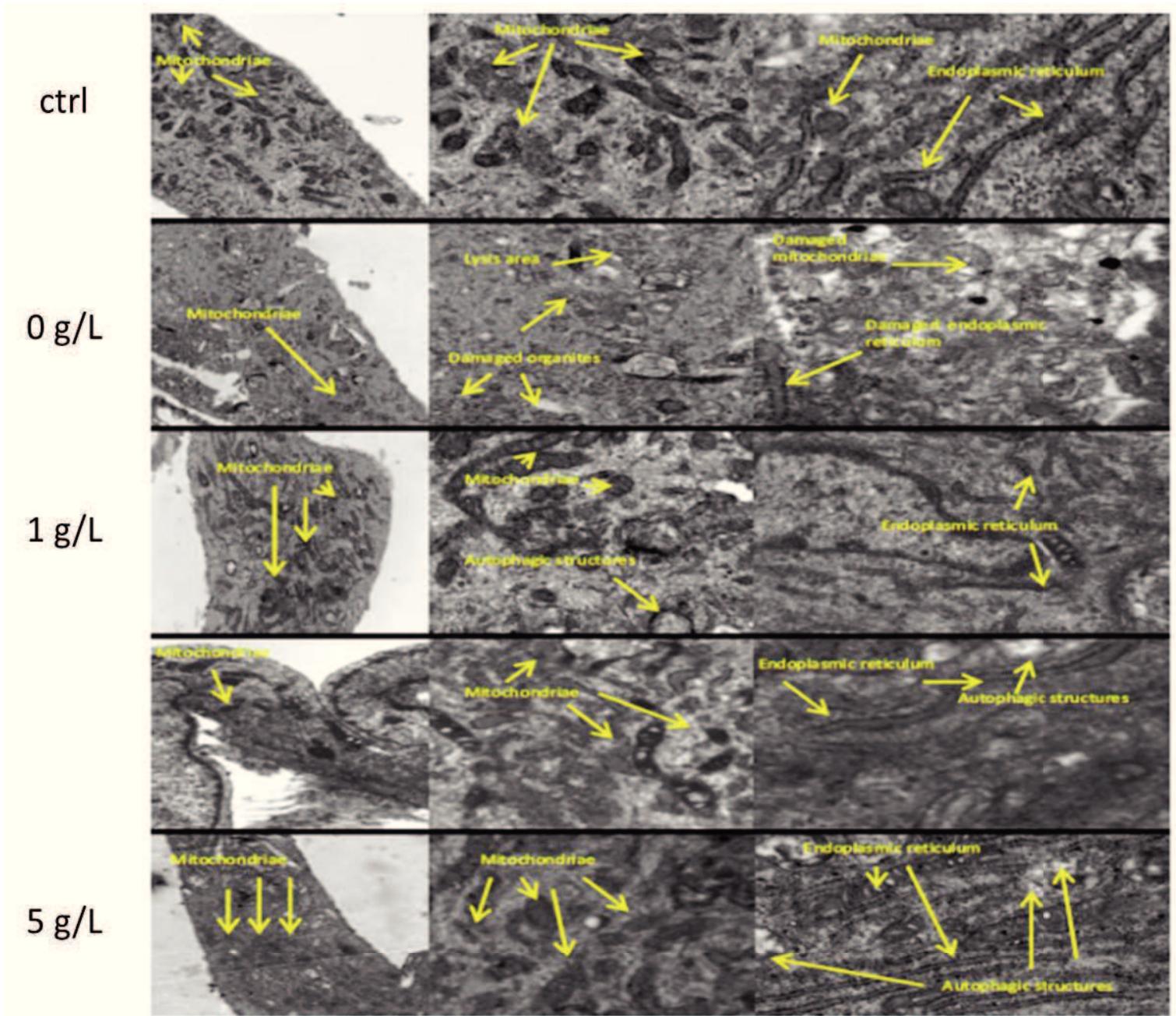
**Figure 39 :** (A-C) Analyses effectuées sur des HAEC suite à une hypoxie/hypothermie de 24h dans la solution UW contenant des concentrations croissantes de M101. (D-F) Analyses réalisées suite à un

protocole similaire suivi de 24h de réoxygénation dans un milieu et des conditions de culture régulières. **(A-D)** Quantification de l'ATP intracellulaire, représentée comme un pourcentage du niveau des cellules contrôles (non soumises à hypoxie/hypothermie); **(B-E)** Libération de LDH dans le milieu de culture par les cellules nécrosées, exprimée comme un pourcentage de la quantité totale de LDH présente dans le puit de culture; **(C-F)** Activité de la succinate deshydrogenase (complexe II mitochondrial, exprimée comme un pourcentage de l'activité détectée dans les cellules contrôles. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes. \*  $p < 0.05$  vs les cellules contrôles; †  $p < 0.05$  vs la solution UW non supplémenté en M101 (0 g/L).

### 3.2. Impact de M101 sur l'intégrité cellulaire

Ces évaluations ont été complétées par une analyse de l'intégrité cellulaire réalisée par microscopie électronique. L'analyse des cellules suite à une hypoxie/hypothermie de 24h dans la solution UW a montré que cette méthode de conservation semble très néfaste pour la préservation de l'intégrité cellulaire (figure 41). En effet, toutes les cellules observées semblent altérées avec de nombreux organites en voie de lyse ainsi que la présence de nombreuses figures myéliniques, le réticulum endoplasmique non fonctionnel : cassé ou dilaté, des mitochondries altérées ou lysées et des noyaux avec des membranes perturbées, signes d'un stress cellulaire important.

Au contraire, le traitement avec M101 réduit la quantité d'organites altérés, améliore l'intégrité mitochondriale et du noyau. Le réticulum endoplasmique semble, cependant, légèrement dilaté. De plus, on note la présence de vacuoles d'autophagie, non visibles dans les cellules conservées avec l'UW seul ce qui souligne la capacité des cellules à mettre en place des mécanismes de survie cellulaire afin de résister à des conditions stressantes par recyclage de leurs constituants dans le but de maintenir leur fonction. Néanmoins, lorsque les cellules sont conservées avec une dose de 5 g/L de M101, il semble qu'il y a une quantité de vacuoles d'autophagie plus importante et que les mitochondries sont moins bien conservées contrairement aux cellules conservées avec 1 et 2,5 g/L de M101.



**Figure 40 :** Observation morphologique par microscopie électronique des HAEC contrôles et des HAEC conservées en hypoxie/hypothermie pendant 24h en UW contenant des doses croissantes de M101. Les images sont représentatives de trois expériences différentes. Grossissement : 12 000X (photos à droite) et 30 000X (photos au centre et à gauche).

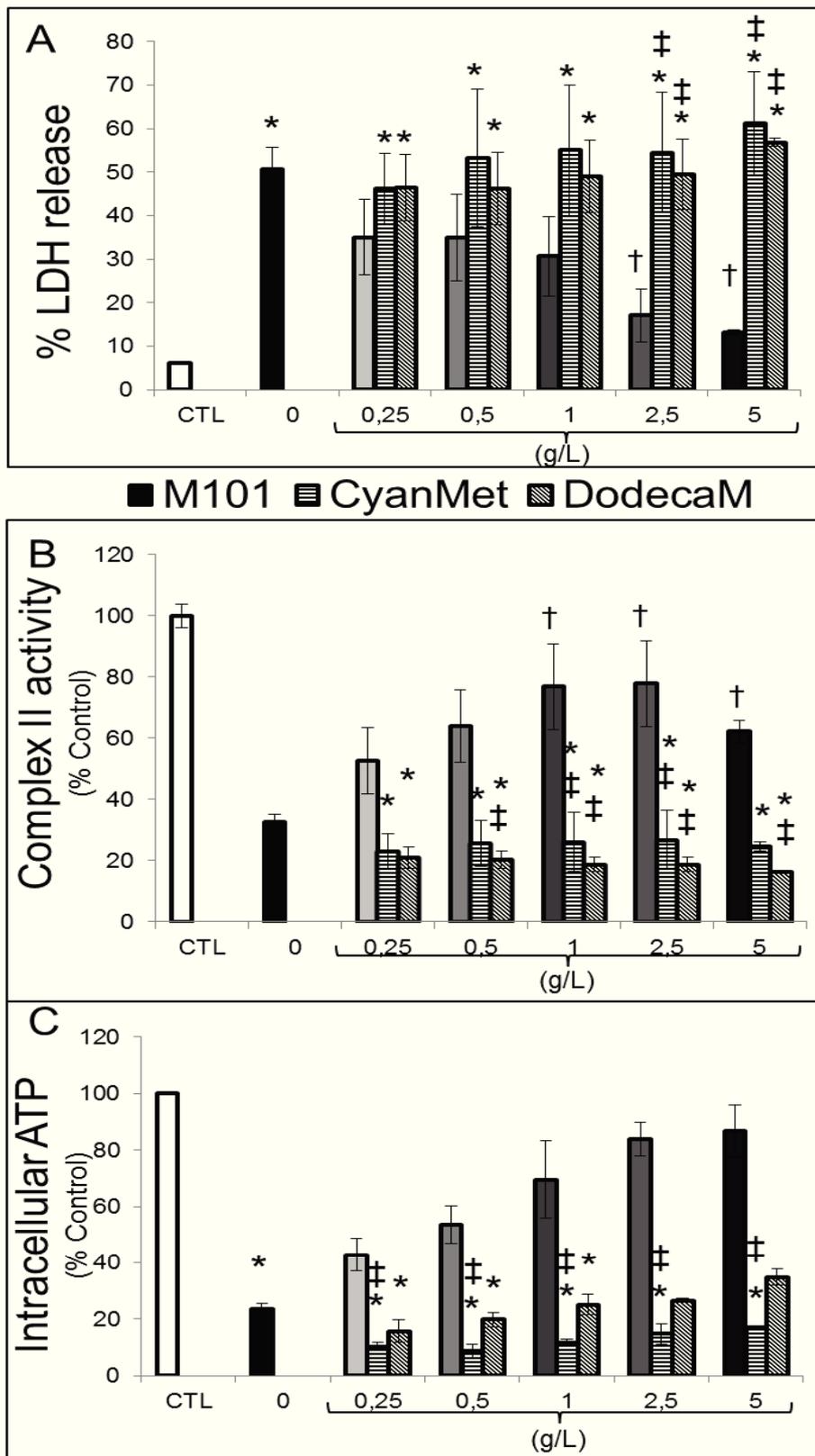
### 3.3. Mécanismes de protection de M101

Afin de déterminer quel mode d'action donne ces bénéfices à la molécule M101, nous avons modifié cette dernière afin de séparer ses propriétés. Pour ce faire, nous avons étudié le mécanisme d'action de deux dérivés de M101 sur les cellules conservées. La cyanméthémoglobine (CyanMet), pour laquelle les hèmes fixant l'oxygène ont été liés de façon covalente et stable à des molécules de cyanure, permettant la suppression efficace de la fonction de transport d'oxygène de M101; et la forme dodécamère de M101 (DodecaM), où les linkers qui stabilisent la structure et qui portent l'activité oxydante ont été dissociés, entraînant une perte de sa propriété SOD ainsi que l'effet protecteur de sa grande taille, tout en gardant intactes ses capacités de transport de l'oxygène. Ces deux molécules ont été utilisées par ajout dans l'UW à des doses croissantes dans notre modèle *in vitro* d'hypoxie/hypothermie et de réoxygénation et ont ensuite été comparées aux molécules M101 non-modifiées.

La quantification de la LDH libérée par les cellules nécrosées (Figure 42A) a montré de nouveau que l'absence de M101 induisait la mort cellulaire (51% de libération), tandis que l'augmentation de la dose de M101 était protectrice (résultats significatifs atteints à partir de 2,5 g/L). Toutefois, ni l'ajout de la CyanMet ni de la DodecaM n'ont pu affecter les niveaux de libération de LDH, et ceci à n'importe quelle concentration utilisée (augmentation significative par rapport à M101 atteinte à partir de 2,5 g/L).

Le dosage de l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 42B) a montré un profil similaire, avec une faible activité lors de la conservation des cellules en UW seul alors que l'augmentation de la concentration de M101 était protectrice, surtout à des doses supérieures à 1 g/L. Ici aussi, l'addition de molécules modifiées CyanMet M101 ou DodecaM a été incapable de reproduire ce niveau de protection (diminution significative par rapport à M101 atteinte au bout de 1 g/L).

L'analyse de la concentration intracellulaire d'ATP a confirmé une protection de M101 dose-dépendante similaire à la protection de M101 en comparaison à l'UW seul, tandis que ni CyanMet ni DodecaM n'ont été en mesure de reproduire ces bénéfices. De façon intéressante, il y avait une tendance à l'amélioration de la concentration en ATP dans les cellules traitées avec la DodecaM d'une manière dose-dépendante (Figure 42C,  $16 \pm 4\%$  à 0,025 g/L versus  $35 \pm 3\%$  à 5 g/L,  $p < 0,05$ ), un effet absent pour la CyanMet, ce qui suggère une certaine protection des concentrations croissantes du transporteur d'oxygène. Cependant, il n'y avait pas de différence significative avec l'UW seul, confirmant la supériorité de la molécule M101 non modifiée.



**Figure 41 :** Analyses métaboliques des cellules HAEC suite à une hypoxie/hypothermie de 24h en solution UW contenant des doses croissantes de la molécule M101 native ou de l'une des deux

molécules modifiées (CyanMet ou DodecaM) suivie par 24h de réoxygénation dans un milieu et des conditions de culture régulières. **(A)** Libération de LDH dans le milieu extracellulaire par les cellules nécrosées, exprimée en pourcentage de la quantité totale de LDH présent dans le puit de culture; **(B)** Activité du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale et **(C)** quantification de l'ATP intracellulaire, exprimée comme un pourcentage de l'activité détectée dans les cellules contrôles. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes. \*  $p < 0.05$  vs les cellules contrôles; †  $p < 0.05$  vs la solution UW non supplémenté en M101 (0 g/L); ‡  $p < 0.05$  vs M101 non modifiée à la même concentration.

Ces résultats indiquent que des trois propriétés de M101 que nous supposons être responsables de ces avantages, c'est à dire sa capacité à transporter l'oxygène, son activité SOD et sa grande taille, qui pourrait avoir un effet protecteur à travers un contrôle de la pression oncotique, aucune n'est plus importante que les autres. M101 doit rester intacte afin de préserver les cellules contre les lésions d'IR.

#### 3.4. Evaluation de la protection dose-dépendante de M101 *in vivo*

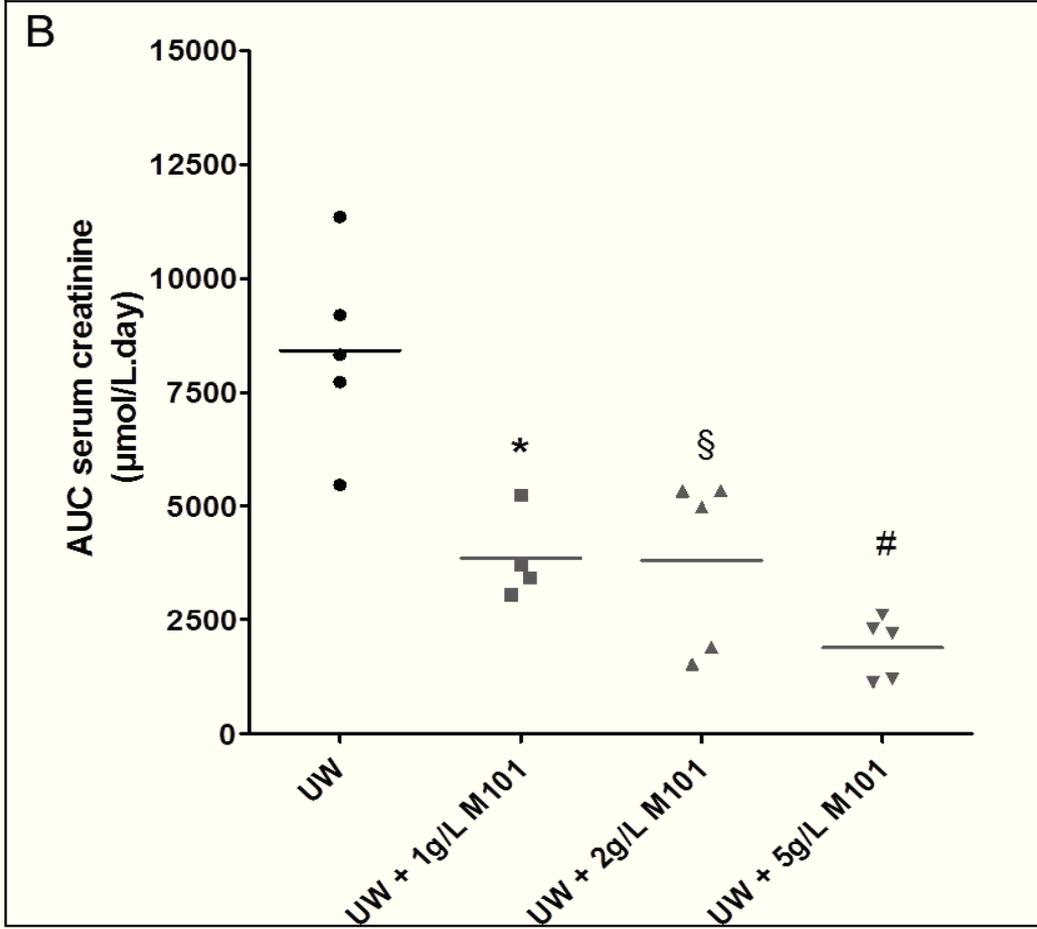
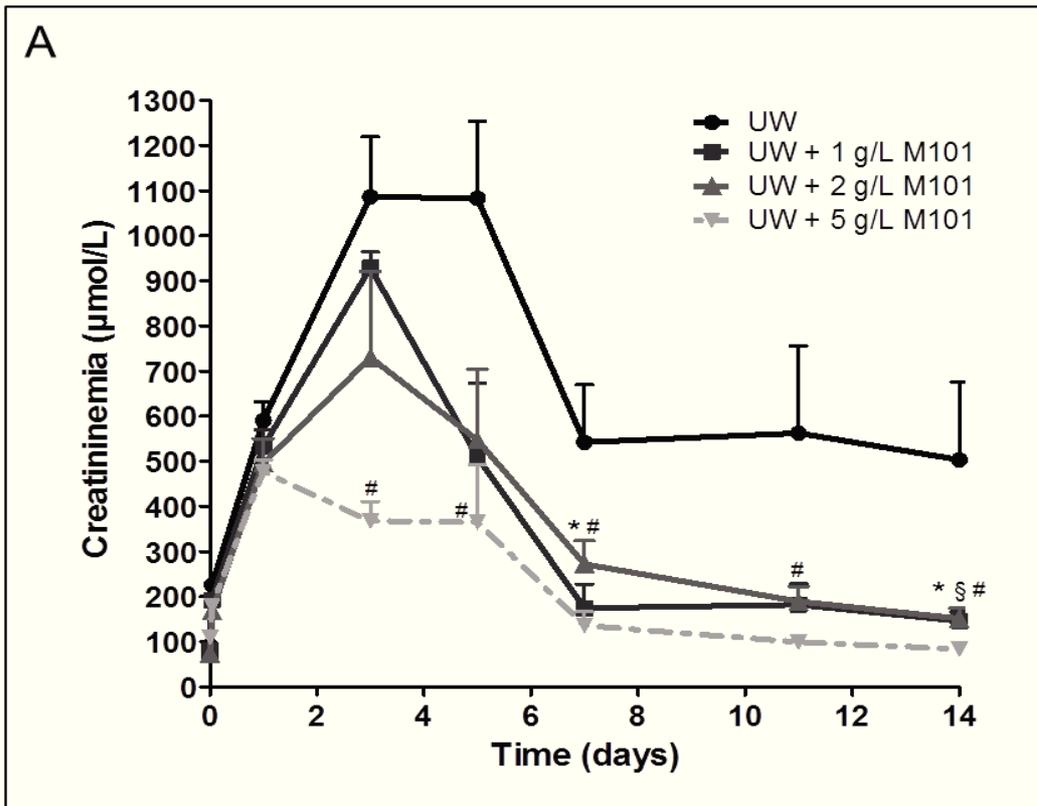
Nous avons déjà démontré les avantages de M101 à 5 g/L additionnée aux solutions de conservation UW et HTK, dans un modèle préclinique d'autotransplantation rénale chez le porc. Afin de déterminer si des doses plus faibles de M101 pourraient avoir un effet protecteur, tel que suggéré par nos données *in vitro*, nous avons reproduit ces expériences en conservant les reins en solution UW supplémenté par 1g/L (UW+ 1 g/L M101), 2 g/L (UW + 2g/L de M101) et 5g/L (UW+ 5 g/L M101) de M101 et ils ont été comparés au groupe UW dans lequel les reins ont été conservés dans la solution UW uniquement. Un dosage de la créatininémie a été réalisé pour évaluer la fonction rénale 1 jour avant la greffe (D-1), à 60 min (R60), D1, D3, D4, D5, D6, D7, D11, D14, 1 mois (M1) et M3 post-reperfusion dans l'ensemble des groupes expérimentaux étudiés.

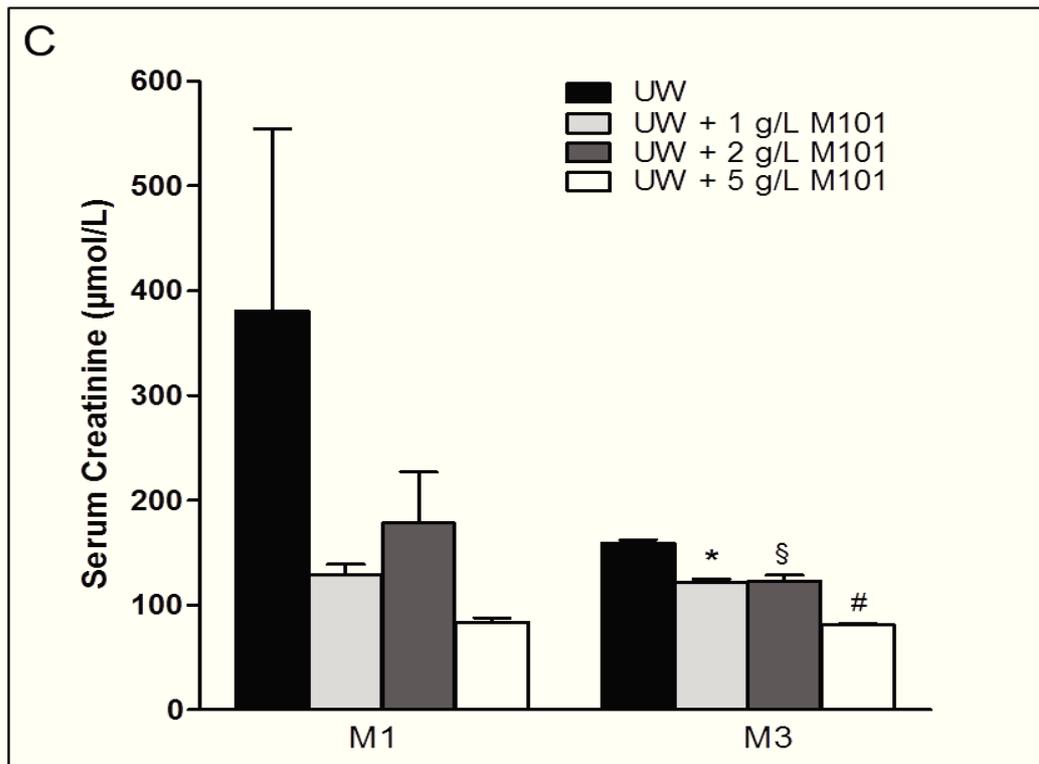
Le dosage des taux de créatinine sérique après la reperfusion (Figure 43A) chez les animaux transplantés avec des reins conservés dans l'UW seul a montré une lente reprise de la fonction, caractérisée par un pic élevé à (environ 1200  $\mu\text{mol/L}$ ), et un retour lent à des niveaux plus bas au cours des deux semaines suivantes pour atteindre environ 400  $\mu\text{mol/L}$  à D14, soit quatre fois plus que les niveaux avant transplantation. L'ajout de M101 dans la solution de conservation a montré une amélioration de la reprise avec un pic de créatinine sérique inférieure à D3 (environ 800  $\mu\text{mol/L}$ ) et une

reprise plus rapide par la suite, atteignant environ 150 $\mu$ mol/L, soit 1,5 fois les niveaux avant la transplantation, à D14. A D14, il n'y avait pas de différence entre les doses à 1, 2 et 5 g/L de M101.

Nous avons effectué une analyse d'aire sous la courbe (AUC) pour le paramètre de la créatininémie (Figure 43B) et nous avons observé que l'aire sous la courbe pour les groupes UW + 1 g/L, UW 2 g/L (environ 4000  $\mu$ mol/L.jour) et UW 5 g/L (environ 2000  $\mu$ mol/L.jour) étaient significativement plus bas que l'aire sous la courbe calculée pour les animaux UW (environ 1500  $\mu$ mol/L.jour,  $p < 0,05$ ). La différence entre les groupes traités par M101 n'est pas significative.

Pour évaluer l'influence du protocole de conservation sur les résultats chroniques, nous avons suivi les animaux pendant 3 mois. Les dosages de la créatinine sérique à M1 et M3 ont montré des niveaux élevés chez les animaux UW, atteignant environ 380 et 160  $\mu$ mol/L, respectivement (Figure 43D). D'autre part, l'ajout de M101 lors de la conservation a été en mesure d'améliorer la qualité des organes ce qui se traduit par une amélioration de reprise de fonction à M1 (approx. 130  $\mu$ mol/L) et M3 (environ 120  $\mu$ mol/L). De la même façon, aucune différence entre 1, 25 g/L de M101 n'a été mesurée à M3.

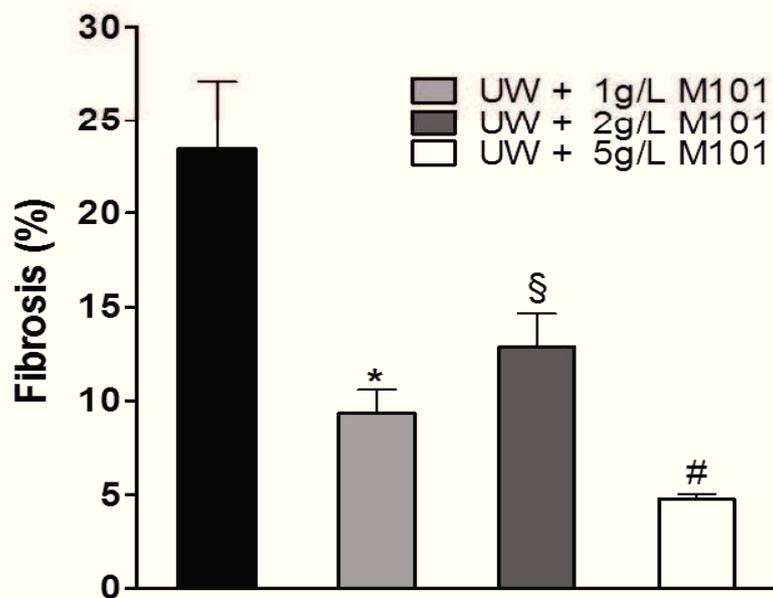
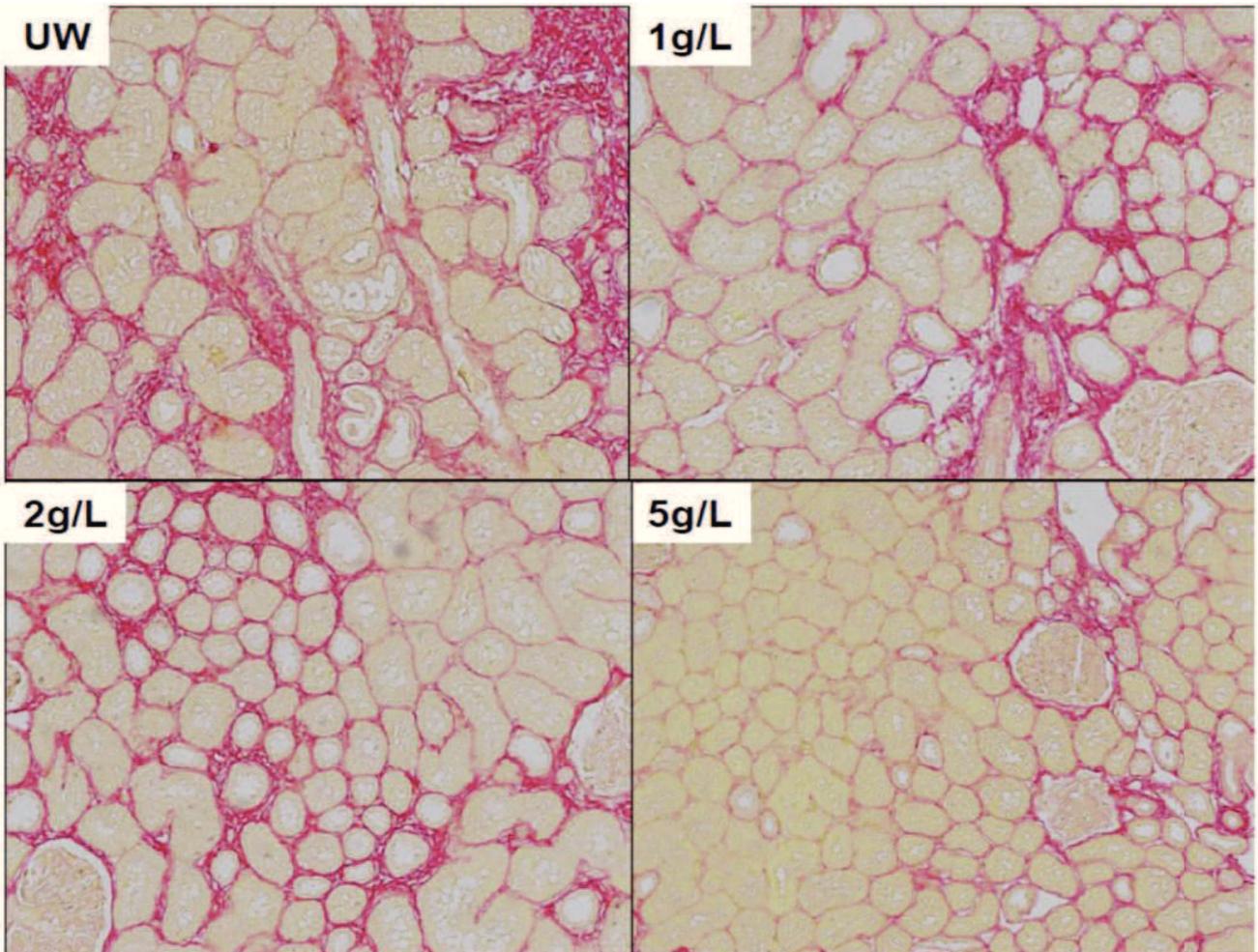




**Figure 42 :** (A) Mesure séquentielle de la créatinine sérique au cours des deux premières semaines après transplantation; (B) Mesure de l'aire sous la courbe au cours des deux premières semaines après transplantation; (C) taux de créatinine sérique à 1 et 3 mois après transplantation. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SEM \*:  $p \leq 0.05$  UW+1g/L M101 vs UW; §:  $p \leq 0.05$  UW+2g/L M101 vs UW; #:  $p \leq 0.05$  UW+5g/L M101 vs UW. N=4-5.

### 3.5. Effet de M101 sur les lésions parenchymales chroniques

Pour déterminer si l'ajout de 1 ou 2 g/L de M101 à l'UW avait un effet protecteur contre le développement de lésions chroniques, nous avons procédé à l'analyse du développement de la fibrose dans les reins à M3 (Figure 44). Bien que la fibrose interstitielle dans les reins conservés en UW avoisinait 23%, l'avancement de cette lésion dans les groupes traités était inférieur, avec 9% dans le groupe UW + 1 g/L ( $p < 0,05$  par rapport à l'UW) et de 13% chez les animaux UW + 2 g/L.



**Figure 43 :** Marquage au rouge Sirius des tissus UW (A), UW+2g/L (B), UW+1g/L (C) et quantification du développement de la fibrose dans chaque groupe (D). Les résultats sont la moyenne  $\pm$

SEM \*:  $p \leq 0.05$  UW+1g/L M101 vs UW; §:  $p \leq 0.05$  UW+2g/L M101 vs UW; #:  $p \leq 0.05$  UW+5g/L M101 vs UW. N=4-5.

#### 4. Conclusions

Nous avons démontré une nouvelle fois les effets bénéfiques de la supplémentation par M101 de la solution de préservation UW et ce même à des doses plus faibles (1 et 2 g/L) que précédemment étudiées. Ainsi, il n'a pas été montré de différence significative entre les groupes traités par M101. La supplémentation par M101 d'UW a permis, dans un modèle d'autotransplantation rénale chez le porc, une amélioration de la reprise de fonction et une diminution des lésions parenchymales chroniques comparées à une conservation en UW seul.

Nous avons également tenté de démontrer laquelle de ces propriétés lui conférait cet effet bénéfique. Suite à l'observation des données de deux molécules modifiées de M101, l'une avec sa capacité à fixer l'oxygène inhibée, l'autre avec une perte de son activité de type SOD et de son haut poids moléculaire, nous sommes arrivés à la conclusion que cette molécule était plus qu'un simple transporteur d'oxygène mais une molécule multifonctionnelle conférant une protection grâce aux avantages combinés de sa capacité à transporter l'oxygène, de son activité SOD et de sa taille importante (permettant de réguler la pression oncotique).

## D. DISCUSSION GENERALE

### 1. Preuve de concept des bénéfices de M101 contre les lésions d'IR rénale

Dans la première étude, nous avons décrit les avantages de l'ajout de M101 dans un modèle *in vitro* de cellules conservées en hypothermie et sur des greffons rénaux préservés soit avec la solution UW soit avec la solution HTK. En effet, l'ajout de M101 a augmenté la résistance des cellules aux lésions d'IR et est corrélé à l'amélioration de la reprise de fonction précoce et d'un meilleur pronostic à long terme avec une fibrose chronique significativement moins importante et une amélioration de la fonction.

M101, hémoglobine extracellulaire issue du ver marin *Arenicola marina*, est un transporteur d'oxygène développé en tant qu'additif aux solutions de conservation des organes en attente de greffe. Cette nouvelle molécule thérapeutique est formulée dans le produit HEMO2Life® développé par la société HEMARINA. Ce transporteur d'O<sub>2</sub> présente des caractéristiques fonctionnelles idéales pour la préservation des organes, telles qu'une capacité à fixer une quantité importante d'O<sub>2</sub> (156 molécules d'O<sub>2</sub> à saturation), une aptitude à fonctionner à basse température et une activité anti-oxydante. Nous avons démontré, dans la première étude, la capacité d'oxygénation de M101 dans des conditions de conservation hypothermique. La fixation et la libération d'oxygène se produisant passivement dans un simple gradient d'oxygène et en l'absence d'effecteur allostérique. De plus, M101 est caractérisée par une P50 (env. 7 mmHg) plus faible que celle de l'hémoglobine humaine, indiquant une affinité plus forte pour l'O<sub>2</sub>. Lorsque la PO<sub>2</sub> est inférieure à la P50, l'oxygène est libéré de manière passive par la molécule M101 et est consommé par les cellules ou les tissus. Il s'agit d'un processus d'équilibre dynamique dépendant des besoins cellulaires, quand un site d'O<sub>2</sub> devient libre, il sera réutilisé par une nouvelle molécule d'O<sub>2</sub>. Nous avons également confirmé que cette molécule possédait une activité SOD à Cu/Zn, qui est d'une grande valeur dans le contexte des lésions générées au cours de l'IR [295, 297, 298].

*In vitro*, la conservation hypothermique en UW provoque (1) une augmentation de la libération de LDH par les cellules, (2) une réduction de l'activité métabolique et (3) du contenu énergétique de manière significative et progressive. Vingt-quatre heures de conservation hypothermique en UW a entraîné la perte presque complète du contenu énergétique, de la viabilité cellulaire et de l'intégrité

fonctionnelle. La majorité de la mort cellulaire a probablement été induite par une nécrose, comme indiqué par le test LDH, plutôt que par une apoptose, l'activité de la caspase-3 n'ayant pas augmenté. Ceci pouvant être expliqué par le manque d'ATP ne permettant pas de mettre en place l'apoptose qui est un mécanisme ATP-dépendant. Au contraire, M101 protège les cellules rénales de façon temps- et dose-dépendant, indépendamment de la solution utilisée. La libération de LDH dans les solutions HTK, IGL et Celsior présentait déjà de faibles niveaux en l'absence de M101, son ajout n'a donc apporté aucun effet supplémentaire sur ce paramètre. Par contre, l'effet bénéfique de M101 est plus évident avec le test MTT, ce qui est en accord avec une étude montrant la supériorité de la sensibilité du test MTT par rapport au dosage de LDH libérées dans une évaluation de l'activité métabolique.

L'ajout de M101 augmente la quantité d'ATP intracellulaire, reflétant un meilleur maintien du métabolisme énergétique, en réduisant probablement la nécessité de passer de la respiration mitochondriale à la glycolyse anaérobie et en protégeant les mitochondries. Le maintien de niveaux d'ATP élevés lors de la conservation avec M101 peut également être bénéfique à la restauration de l'homéostasie énergétique lors de la reperfusion dû à un stress métabolique plus faible des voies oxydatives.

Les résultats *in vitro* nous ont conduits à utiliser la dose à 5 g/L dans notre modèle *in vivo* d'autotransplantation chez le porc, prenant compte de la différence entre la culture 2D *in vitro* et le tissu 3D *in vivo* : ainsi, même si une dose plus faible est protectrice *in vitro*, nous mettions toutes les chances de notre côté pour cette preuve de concept. L'étude qui suivra, utilisant des doses plus faibles, nous confortera dans ce choix.

Nous avons conservé les reins soit avec de l'HTK soit avec de l'UW, qui sont les solutions les plus utilisées dans le monde (données Eurotransplant et UNOS) [4], pendant 24 h. La durée de conservation clinique moyenne mise en place actuellement est de 18 h, avec une tendance à l'augmentation, notre choix d'une conservation de 24 h apparaît donc justifié. De plus, une durée de 24 h apporte un nombre de dommages d'IR adapté pour une preuve de concept. Bien que nous n'ayons pas évalué les bénéfices *in vivo* sur des durées de conservation plus courtes, la démonstration des avantages de M101 sur les temps de conservation courts est probable, compte tenu de l'impact de la molécule *in vivo* après 24 h de préservation et de la protection démontrée dans les études *in vitro* pour des durées de conservation plus courtes.

Dans notre étude nous avons observé des différences entre l'UW et l'HTK. Au niveau de la fonction rénale, le groupe UW montre une augmentation de la diurèse non retrouvée dans le groupe HTK. L'analyse des taux de créatinine sérique montre que le groupe UW conduit à des niveaux élevés atteignant un sommet à D3, diminuant lentement par la suite et n'atteignant jamais le niveau pré-transplantation; tandis que le groupe HTK a montré un pic de créatinine sérique élevée à D1, suivi d'une reprise et d'une récupération plus rapide du niveau avant transplantation à D11. De plus, concernant l'excrétion sodique, les taux observés dans le groupe UW sont plus élevés et diminuent moins rapidement que dans le groupe HTK. L'évaluation des lésions tubulaires ne présente pas de différence entre les deux solutions concernant la perte de la bordure en brosse. Par contre, on note un détachement endoluminal important à D7 et D14 pour les animaux UW alors que les animaux HTK montrent un faible détachement endoluminal qui disparaît rapidement à D7. A l'inverse, l'immunité innée (ED1+) et adaptative (CD3+) semble plus élevée dans le groupe HTK contrairement au groupe UW. Enfin, on note la mise en place d'une fibrose interstitielle et d'une atrophie tubulaire (FIAT) dans les deux groupes avec tout de même une protéinurie deux fois moins importante dans le groupe HTK.

Nous avons montré que les reins conservés dans les solutions seules induisaient une détérioration de la reprise de fonction avec une altération de la filtration glomérulaire et de la fonction tubulaire. En effet, l'insuffisance rénale aiguë conduit à une perte de la polarité des cellules épithéliales tubulaires rénales, entraînant une altération de l'homéostasie ionique caractérisée notamment par une augmentation de l'excrétion urinaire du sodium [72, 73]. Tandis que l'utilisation de M101 a été associée à une amélioration de la reprise précoce de fonction, en particulier dans les greffons conservés avec l'UW. Comme l'intensité des lésions d'IR est directement corrélée avec la survenue de reprise retardée de fonction du greffon chez les patients [7, 299], il est attendu que M101 pourrait être efficace dans la réduction des lésions d'IR *in vivo* dans les reins conservés.

Histologiquement, les lésions d'IR sont caractérisées par des lésions tubulaires étendues, telles que la perte de la bordure en brosse et l'infiltration accrue des cellules immunitaires [112, 300]. En effet, les lésions d'IR ont été démontrées comme étant capables d'induire des processus inflammatoires de façon antigène indépendante [301]. L'analyse histologique montre que la conservation avec les solutions seules entraîne de façon précoce une augmentation de la perte de la bordure en brosse et du détachement endoluminal, hormis pour HTK concernant le dernier paramètre, ainsi qu'une augmentation importante de l'immunité innée (ED1+) et adaptative (CD3+) trois mois après la greffe. Au contraire, l'ajout de M101 est efficace dans la protection contre ces dommages et ceci dès le début,

probablement grâce à la protection cellulaire directe comme observée *in vitro*. Comme les cellules stressées produisent des signaux danger induisant une inflammation et une invasion cellulaire [102], la réduction de ces mécanismes par l'ajout de M101 est probablement due à une meilleure protection cellulaire.

Le stade final lésionnel du greffon rénal est la fibrose tubulo-interstitielle, qui va affecter sa fonction et qui va être d'autant plus importante que les lésions ischémiques aiguës et chroniques sont importantes. L'induction du processus de fibrose dépend des lésions ischémiques et des phénomènes d'inflammation chronique, ainsi que des processus de réparation. Effectivement, la fibrose correspond à l'activation continue d'un processus de cicatrisation conduisant à la formation de tissu cicatriciel qui va remplacer progressivement le tissu rénal fonctionnel. Ce processus est associé au phénomène de TEM, défini par la dédifférenciation de cellules épithéliales des tubulaires en cellules mésenchymateux. Ces cellules vont alors s'accumuler dans l'interstitium rénal où elles vont produire des molécules de MEC [302, 303]. La FIAT est le marqueur central de la dysfonction chronique du greffon, et finalement de la perte du greffon lui-même [304]. Nous avons donc mesuré le développement de la FIAT parallèlement à la perte de fonction à 3 mois et déterminé que les solutions de conservation classiques ne pouvaient pas éviter le développement de la fibrose étendue ainsi que la perte de fonction. Cependant, l'ajout de M101 au moment de la conservation est corrélé avec une diminution du développement de la fibrose, une préservation de la fonction et une amélioration des résultats. Dans notre modèle *in vivo*, nous avons observé les effets additionnés des lésions de conservation et de reperfusion d'organe [305] et nos données soulignent l'importance d'un protocole de conservation optimisé.

Il y a actuellement un regain d'intérêt concernant les machines de conservation d'organes [39, 306] car elles procurent une amélioration importante de la qualité du greffon et du résultat [307]. Bien que son mécanisme reste peu clair, le lavage des métabolites et des déchets cellulaires produits durant l'ischémie semble être une hypothèse vraisemblable. La présence de ces produits à la reperfusion est même probablement associée à l'activation accrue des voies de l'immunité innée, en association avec la voie du « signal danger » [308, 309]. Dans ce contexte, l'ajout de M101, qui pourrait être perfusé dans l'organe pour fournir de l'oxygène aux territoires les plus isolés, serait un ajout précieux et fournirait une protection supplémentaire ou synergique pour l'organe.

## Etude dose réponse et mécanistique des bénéfices de M101 contre les lésions d'ischémie reperfusion rénale

Dans notre deuxième étude, nous avons déterminé la dose-réponse des bénéfices du transporteur d'oxygène M101 sur les lésions d'IR, en utilisant deux modèles différents.

L'utilisation d'un modèle *in vitro* d'IR, c'est-à-dire mimant la conservation des organes avec une phase d'hypoxie/hypothermie dans la solution UW puis en reproduisant les conditions de reperfusion incubant les cellules conservées dans des conditions de culture normales, nous montre que l'addition de M101 durant la conservation offre des bénéfices en termes de concentration d'ATP intracellulaire ainsi que d'amélioration de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, se traduisant par une augmentation de la survie et ceci même après une séquence complète *in vitro* d'IR. Ces avantages sont clairement dose-dépendants, les effets maximums étant trouvés entre 2,5 et 5 g/L en fonction du test utilisé. Nous avons confirmé cet effet sur le maintien de l'intégrité cellulaire en utilisant la microscopie électronique à transmission. L'analyse des résultats montrent que la conservation en UW a des conséquences importantes sur l'intégrité des cellules, perturbant l'organisation des organites majeurs tels que le réticulum endoplasmique, qui apparaît très dilaté, et les mitochondries, qui sont en voie de lyse, ainsi que la membrane du noyau; ce qui sont des signes de souffrance cellulaire et qui pourraient conduire la cellule vers la nécrose. De plus, la présence de figures myéliniques indique également une altération cellulaire. En revanche, l'utilisation de M101 lors de la conservation a permis un meilleur maintien du phénotype cellulaire global, avec une préservation des noyaux, une conservation des structures cellulaires ainsi qu'une amélioration au niveau mitochondrial comme le montre la présence de nombreuses mitochondries avec des crêtes bien visibles. De plus, la présence d'autophagosomes montre que la cellule est capable de mettre en place une réponse contre le stress et suggère donc une meilleure capacité de récupération après une hypoxie/hypothermie, tel que confirmé par les tests fonctionnels. Il semblerait tout de même qu'il y ait une quantité plus importante de vacuoles d'autophagie à 5 g/L contrairement à 1 g/L et 2,5 g/L de M101. De plus, on note la présence d'un réticulum endoplasmique dilaté, mais moins qu'avec l'UW seul, qui avec la présence de vacuoles d'autophagie pourrait être synonyme d'un stress du RE.

« Le stress du RE est une situation cellulaire pathologique fréquente provoquée par l'accumulation excessive de protéines natives, insuffisamment ou mal conformées au sein de la lumière du RE. Cette situation, dont les causes sont aussi fréquentes que l'ischémie, le stress oxydatif ou les infections virales, est la conséquence de désordres profonds de l'homéostasie du RE, qui n'est plus apte à assumer une de ses principales fonctions, la maturation post-traductionnelle des protéines nouvellement synthétisées. Les protéines mal conformées ne seront pas dirigées vers l'appareil de Golgi et seront

éventuellement dégradées par le protéasome ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation). Produites en excès, les protéines mal conformées ne pourront pas être toutes dégradées et finiront par s'accumuler dans la lumière du RE, provoquant une situation de stress, conduisant la cellule à activer une réponse adaptative particulière appelée UPR (« Unfolded Protein Response »), dont le but est de réduire l'accumulation de ces protéines. La réponse UPR permet d'adapter les fonctions cellulaires à cette modification environnementale et de rétablir une fonction du RE normale. Cette réponse est caractérisée par une réduction globale de la synthèse protéique par blocage traductionnel, une augmentation de l'activité de dégradation protéasomale et une augmentation des capacités enzymatiques de maturation protéique. Si le stress se prolonge et que l'adaptation échoue, la cellule déclenche un programme de mort cellulaire apoptotique [310-312]. De plus, il a été relaté que l'IR provoque des désordres de l'homéostasie du RE qui sont autant de facteurs inducteurs du stress du RE. Le déficit en ATP causé par l'hypoxie induit une diminution de la concentration intraréticulaire de calcium et une altération de l'activité de BiP et de GRP94. L'hypoxie et la carence en glucose sont connues pour induire des dysfonctions des systèmes de maturation des protéines natives aboutissant également à une réponse UPR. Enfin, la reperfusion provoque un stress oxydatif modifiant le statut redox du RE, interférant ainsi avec la formation des ponts disulfures et produisant l'accumulation de protéines mal conformées [313-315] » [316].

Une des conséquences de l'UPR est le phénomène d'autophagie. L'autophagie est un mécanisme physiologique cytoprotecteur au moyen duquel la cellule essaie de limiter les effets délétères liés au stress du RE en activant l'autodigestion de protéines et de certains organites intracellulaires [317, 318]. Lors d'un stress, l'autophagie permet de préserver la viabilité cellulaire en diminuant le niveau de protéines de conformation incorrecte dans le RE et en les recyclant afin apporter des nutriments nécessaires aux fonctions cellulaires vitales, ainsi qu'en éliminant les organites cellulaires lésés [318, 319]. Des études ont montré que des inducteurs pharmacologiques du stress du RE, tel que la tunicamycine et la thapsigargine, induisent la formation d'autophagosomes [320, 321]. Lors du stress du RE, l'autophagie peut être induite par la voie IRE1 $\alpha$ /JNK [322] ou par la voie PERK/ATF4. ATF4 active l'autophagie d'une part en induisant l'augmentation de l'expression de Atg12 qui permet la conversion de LC3 [323] et d'autre part par l'activation directe de la transcription de LC3 [324]. L'activation de l'autophagie par ATF4 permet une résistance contre la mort cellulaire notamment lors de l'hypoxie [325].

L'autophagie, par son rôle dans la dégradation des protéines à durée de vie longue, pourrait donc intervenir comme renfort du système ERAD, qui est un système de dégradation des protéines à durée de vie courte. En effet, bien que les protéines ciblées et que les mécanismes de dégradation entre

l'autophagie et le protéasome soient différents, les deux systèmes jouent un rôle semblable dans le recyclage et la dégradation des acides aminés des protéines. Toutefois, le lien fonctionnel entre les deux systèmes et la façon dont ils pourraient être inter-régulés n'est pas bien compris.

Cependant, même si le rôle de l'autophagie dans la survie cellulaire a été établi, de nombreuses études ont émis l'hypothèse que l'autophagie pourrait également être impliquée dans la mort cellulaire. En effet, une accumulation d'autophagosomes a été observée dans des cellules subissant une mort cellulaire, suggérant l'existence d'un lien entre autophagie et apoptose. Cependant, l'interaction entre autophagie et apoptose est complexe et les données sont souvent contradictoires [326].

Les résultats de microscopie électronique sont en accord avec les résultats précédents obtenus avec un modèle d'hypothermie sur une lignée cellulaire de tubules proximaux, dans lequel nous avons montré des bénéfices similaires dans plusieurs solutions de conservation. Les résultats de cette deuxième étude, l'amélioration du modèle par l'utilisation de cellules endothéliales primaires non-immortalisées, qui sont le premier type cellulaire touché par l'IR, et l'affinement des paramètres de conservation, afin de se rapprocher de la situation clinique en utilisant à la fois l'hypoxie et l'hypothermie, montrent que les effets de M101 sont robustes et ne se limitent pas à un seul type de cellule. De plus, la dose présentant un effet maximal est très similaire dans les deux modèles, ce qui confirme la reproductibilité des bénéfices.

Nous avons ensuite étudié la nature des effets bénéfiques de M101 en tentant de déterminer laquelle de ses propriétés avait le plus d'impact sur l'intégrité cellulaire. En effet, M101 a trois propriétés majeures : c'est un transporteur d'O<sub>2</sub> géant présentant 156 sites de liaison à l'O<sub>2</sub> avec une affinité élevée pour l'O<sub>2</sub>, possédant une masse moléculaire élevée (~ 3600kDa), et démontrant une activité de type SOD intrinsèque [295]. Tout d'abord, l'apport d'oxygène au cours de la conservation pourrait être considéré comme une épée à double tranchant. Toutefois, le maintien de l'apport en oxygène au cours de la conservation a montré des avantages en termes de maintien de production d'ATP et de reprise de fonction à la reperfusion, à la fois par des approches technologiques ou pharmacologiques [237]. De plus, l'amélioration de la reprise du rein suite à l'IR en utilisant une activité de type SOD pendant l'ischémie est une approche raisonnable compte tenu du rôle central joué par le stress oxydant dans le développement des lésions d'IR. De telles molécules ont d'ailleurs été utilisées dans plusieurs modèles d'IR et ont démontré des effets bénéfiques [327]. Enfin, les grandes molécules sont utilisées dans des solutions de conservation pour contrer l'entrée d'eau à l'intérieur des cellules; suite à l'afflux causé par le déséquilibre ionique et la perturbation de la pression oncotique à la suite du remplacement du sang

par un milieu acellulaire. Bien que la supériorité des solutions contenant des colloïdes, telles que l'UW, SCOT15 ou IGL1 n'est pas clairement démontrée en clinique [328], les preuves expérimentales suggèrent qu'un choix adapté de colloïde peut améliorer de façon significative la qualité des organes [329, 330].

Cependant, ces résultats sont à prendre avec du recul car : i) il s'agit d'un travail préliminaire, ii) à renouveler car les résultats ne corroborent pas ceux obtenus antérieurement et iii) qu'une analyse des molécules en fin d'expérimentation *in vitro* serait à effectuer afin de valider la structure de la molécule.

En conséquence, nous avons tenté de mesurer les différentes contributions de chaque propriété de l'effet protecteur de M101 contre les lésions d'IR *in vitro*. Malheureusement, les contraintes structurelles de la molécule permettent uniquement la production de deux dérivés M101. Le dérivé cyanméthémoglobine (CyanMet), qui utilise la liaison covalente du cyanure à l'hème transportant l'oxygène afin d'annuler la capacité de la molécule à transporter l'oxygène sans affecter sa structure globale ou son activité de type SOD. Et le dérivé dodécamère de M101 (DodecaM) produit par dissociation des linkers, qui assurent une fonction de maintien de la structure et qui porte l'activité SOD, par diminution du pH, entraînant une préservation de ses capacités de fixation et d'échange de l'oxygène, mais une destruction de son activité de type SOD et une réduction considérable sa taille, par perte de la structure de M101. Dans notre modèle *in vitro*, nous avons démontré que ces deux molécules étaient significativement moins efficaces dans la protection des cellules contre l'IR par rapport à M101 native. En effet, aucun bénéfice évident n'a pu être identifié avec l'utilisation de l'une de ces molécules par rapport à l'UW seul, et aucune différence significative entre les deux molécules modifiées n'a été observée. Seule une tendance à l'amélioration dose-dépendante de la production d'ATP est suggérée en observant les effets de DodecaM, ce qui impliquerait des bénéfices possibles de l'apport d'oxygène. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que M101 n'est ni un simple transporteur d'oxygène, ni une grosse molécule avec une activité de type SOD, mais un système complexe pouvant fournir une protection aux cellules lors du stress de l'IR. Des recherches plus approfondies sont donc nécessaires pour véritablement reconstituer le mécanisme d'action de cet additif.

Le deuxième objectif de l'étude était d'étudier les effets protecteurs de M101 lorsqu'elle est utilisée à des doses plus faibles que précédemment publiées afin d'évaluer le potentiel de transposition de cette molécule à la clinique. À cette fin, nous avons utilisé, comme lors de la précédente étude, un modèle porcin de transplantation rénale. Dans la première partie des résultats nous avons ajouté la

molécule M101 à une dose de 5 g/L à la solution UW et nous avons montré ces bénéfices significatifs concernant la reprise de fonction et la diminution des lésions chroniques comme la fibrose. Dans cette deuxième étude, nous montrons que les deux doses 1, 2 et 5 g/L de M101 ajoutées à l'UW durant la conservation du rein, en utilisant les mêmes conditions expérimentales que lors de l'étude précédente, fournissent un niveau significatif de protection.

Nous avons d'abord analysé la reprise après la reperfusion, en utilisant la créatinine sérique en tant que marqueur de la fonction rénale. L'analyse du profil au cours des deux premières semaines a révélé une amélioration significative pour les reins conservés avec M101, une réduction de l'aire sous la courbe de moitié par rapport au niveau mesuré dans le groupe UW seul. Ceci indique une amélioration significative de la capacité de l'organe à récupérer du stress lié à la conservation et à reprendre une filtration du sang efficace, et ce quelque soit la dose testée.

Le suivi chronique des animaux a confirmé l'amélioration de la qualité de l'organe. En effet, les animaux traités ont montré à la fois des niveaux de créatinine sérique et de fibrose interstitielle plus faible par rapport aux animaux UW seul un mois et trois mois après la transplantation. En considérant que la FIAT est souvent la cause de la dysfonction chronique du greffon, et finalement celle de la perte du greffon lui-même [304], les résultats obtenus dans cette étude confirment une meilleure qualité des organes obtenue avec le traitement par M101, quelque soit la dose. Les niveaux atteints avec les doses à 1 et 2 g/L ont été légèrement supérieurs à ceux obtenus avec 5 g/L, mais les différences observées ne sont pas significatives. Ainsi, alors que les études *in vitro* ont montré une relation dose-réponse graduelle entre les doses à 1g/L et 5g/L, la transition vers le modèle *in vivo* a révélé un effet seuil, avec des résultats identiques entre les doses 1 et 2 g/L, alors que la transition à 5g/L induit une amélioration des résultats observés, mais non significative. Cela met en évidence l'écart entre le contexte *in vitro* et *in vivo* : alors que le premier fournit une plate-forme polyvalente permettant des tests approfondis sur un grand nombre de conditions et de molécules, des analyses mécanistes poussées, le second est inévitable pour obtenir des données précliniques fiables qui peuvent guider la conception de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques.

## E. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce deuxième travail a été d'évaluer les effets d'un nouveau transporteur d'oxygène, l'hémoglobine de ver marin M101 en tant qu'additif aux solutions de conservation dans la transplantation d'organe et notamment rénale; ainsi que de caractériser le mécanisme à l'origine de son efficacité parmi ses trois mécanismes qui sont l'effet grosse molécule, l'activité anti-oxydante et l'activité transporteur d'oxygène.

Nous pouvons conclure que la molécule M101 permet dans deux populations d'intérêt différentes, les cellules tubulaires rénales porcines d'une part et les cellules endothéliales humaines d'autre part, une amélioration significative de la viabilité et de l'activité métabolique cellulaire ainsi qu'une augmentation de la quantité d'ATP contrairement à la conservation en UW seul. De plus, nous avons également démontré que l'utilisation de M101, dans un modèle d'autotransplantation rénale chez le porc, est corrélée à une meilleure reprise de fonction à court terme ainsi qu'un meilleur résultat à long terme avec une réduction du développement de la FIAT, qui représente la cause principale de la perte du greffon.

Enfin, suite à l'observation des données de deux molécules modifiées de M101, l'une avec sa capacité à fixer l'oxygène inhibée, l'autre avec une perte de son activité de type SOD et de son haut poids moléculaire, nous sommes arrivés à la conclusion que cette molécule était plus qu'un simple transporteur d'oxygène mais une molécule multifonctionnelle conférant une protection grâce aux avantages combinés de sa capacité à transporter l'oxygène, de son activité superoxyde dismutase et de sa taille importante (permettant de réguler la pression oncotique).

L'une des perspectives de ce travail serait d'étudier l'autophagie que nous avons observée aux niveaux cellulaires avec présence de figures myéliniques lors de la conservation en UW seul et de vacuoles d'autophagies lors de l'ajout de M101. En effet, lors d'un stress trop important et/ou de trop longue durée, l'autophagie considérée comme un mécanisme de survie cellulaire peut conduire à la mort cellulaire.

De plus, ces données ouvrent des perspectives concernant l'utilisation de molécules ou de procédés capables de fournir de l'oxygène lors de la conservation hypothermique des organes et notamment des organes « marginaux » qui présentent une plus grande sensibilité aux lésions de l'IR.

Cependant, fournir de l'oxygène aux tissus ischémiques au cours de la conservation en hypothermie pourrait toutefois être une « arme à double tranchant ». En effet, une fois la chaîne respiratoire mitochondriale découplée, les molécules de dioxygène sont principalement utilisées pour la

monoréduction plutôt que la tétraréduction, conduisant à la production de l'anion superoxyde et à la mise en place d'un stress oxydatif si la cellule n'est pas capable de restaurer la respiration oxydative. Cette situation pourrait donc entraîner à la reperfusion des lésions encore plus importantes [331]. Il sera donc nécessaire lors de l'étude de ces nouvelles méthodes de s'assurer que l'oxygène apporté aux cellules lors de la conservation n'entraîne pas des conséquences délétères.

Les caractéristiques fonctionnelles de M101, que sont sa forte affinité pour l'oxygène induisant un relargage dans des zones fortement hypoxiques et son activité antiradicalaire en font un transporteur d'oxygène idéal. Cependant, l'utilisation de façon statique de molécules capables de fournir de l'oxygène ne permet peut être pas de protéger toutes les zones du rein notamment les plus profondes, le rein baignant simplement dans la solution de conservation contenant les molécules. Il serait donc intéressant de réaliser une analyse protéomique afin de vérifier la présence de protéines des voies de l'hypoxie afin d'observer la mise en place de ces voies dans les différentes zones du rein et ainsi d'évaluer la répartition de la molécule aux zones les plus profondes.

De plus, il pourrait être judicieux d'utiliser ces molécules transportant l'oxygène dans des machines de perfusion ce qui permettrait de les délivrer à l'ensemble du rein. Des études sont actuellement réalisées aux laboratoires pour évaluer cette approche dans le cadre d'un projet ANR ayant pour but d'évaluer le bénéfice de l'utilisation d'HEMO2life® pour la conservation des greffons rénaux marginaux en machine de perfusion en comparaison d'une conservation en mode statique.

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation*. 1997 Apr 15;63(7):968-74.
- [2] Hicks M, Hing A, Gao L, Ryan J, Macdonald PS. Organ preservation. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ. 2006;333:331-74.
- [3] Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Investig Med*. 2004 Jul;52(5):299-309.
- [4] Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation*. 2007 May 27;83(10):1289-98.
- [5] McLaren AJ, Friend PJ. Trends in organ preservation. *Transpl Int*. 2003 Oct;16(10):701-8.
- [6] Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003 May 9;304(3):437-44.
- [7] Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Aug;287(2):F181-7.
- [8] Inserm. *Transplantation d'organes - Quelles voies de recherche ?*. 2009.
- [9] *La transplantation rénale*. Médecine Sciences Publication. 2012.
- [10] Guild WR, Harrison JH, Merrill JP, Murray J. Successful homotransplantation of the kidney in an identical twin. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 1955;67:167-73.
- [11] Hamburger J, Vaysse J, Crosnier J, al. e. Transplantation d'un rein entre jumeaux non monozygotes après irradiation du receveur. *Presse médicale*. 1962;67:1771-5.
- [12] Mollaret P, Goulon M. [The depassed coma (preliminary memoir)]. *Revue neurologique*. 1959 Jul;101:3-15.
- [13] Société française d'anesthésie et de réanimation ÉfdgeSfdt. Réanimation du sujet en état de mort encéphalique en vue de prélèvement d'organes (conférence d'experts). . Elsevier. 1998.
- [14] Bouhsain S. Apport du laboratoire dans l'évaluation des patients en mort encéphalique en vue d'un prélèvement d'organes sur la personne décédée *Annales de Biologie Clinique*. 2003 septembre 2003;61(5):571-5.
- [15] Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988 Apr;45(4):673-6.
- [16] Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annual review of medicine*. 1995;46:235-47.
- [17] Belzer FO, Ashby BS, Dunphy JE. 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. *Lancet*. 1967 Sep 9;2(7515):536-8.
- [18] Collins GM, Bravo-Shugarman M, Novom S, Terasaki PI. Kidney preservation for transplantation. I. Twelve-hour storage in rabbits. *Transplantation proceedings*. 1969 Sep;1(3):801-7.
- [19] Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet*. 1969 Dec 6;2(7632):1219-22.
- [20] Pegg DE, Calne RY, Pryse-Davies J, Brown FL. Canine Renal Preservation Using Surface and Perfusion Cooling Techniques. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1964 Nov 30;120:506-23.
- [21] Badet L, Eugene M, Hauet T, Barrou B. [The use of preservation solutions in renal transplantation]. *Prog Urol*. 2006 Feb;16(1):25-31.
- [22] Vreugdenhil PK, Marsh DC, Belzer FO, Southard JH. Urea and protein synthesis in cold-preserved isolated rat hepatocytes. *Hepatology* (Baltimore, Md. 1992 Jul;16(1):241-6.
- [23] Wahlberg JA, Love R, Landegaard L, Southard JH, Belzer FO. 72-hour preservation of the canine pancreas. *Transplantation*. 1987 Jan;43(1):5-8.
- [24] Ploeg RJ, Goossens D, McAnulty JF, Southard JH, Belzer FO. Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution. *Transplantation*. 1988 Aug;46(2):191-6.

- [25] Kalayoglu M, Sollinger HW, Stratta RJ, D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Pirsch JD, et al. Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet*. 1988 Mar 19;1(8586):617-9.
- [26] Todo S, Nery J, Yanaga K, Podesta L, Gordon RD, Starzl TE. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *Jama*. 1989 Feb 3;261(5):711-4.
- [27] Moukarzel M, Benoit G, Bensadoun H, Hiesse C, Richard C, Bittard H, et al. Nonrandomized comparative study between University of Wisconsin cold storage and Euro-Collins solution in kidney transplantation. *Transplantation proceedings*. 1990 Oct;22(5):2289-90.
- [28] Ploeg RJ, van Bockel JH, Langendijk PT, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, et al. Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. The European Multicentre Study Group. *Lancet*. 1992 Jul 18;340(8812):129-37.
- [29] Roels L, Coosemans W, Donck J, Maes B, Peeters J, Vanwalleghem J, et al. Inferior outcome of cadaveric kidneys preserved for more than 24 hr in histidine-tryptophan-ketoglutarate solution. Leuven Collaborative Group for Transplantation. *Transplantation*. 1998 Dec 27;66(12):1660-4.
- [30] Hauet T, Han Z, Doucet C, Ramella-Virieux S, Hadj Aissa A, Carretier M, et al. A modified University of Wisconsin preservation solution with high-NA+ low-K+ content reduces reperfusion injury of the pig kidney graft. *Transplantation*. 2003 Jul 15;76(1):18-27.
- [31] Rapport annuel d'activités 2011 de l'Agence de Biomédecine. 2012.
- [32] Tuppin P, Moysan V, Tenailon A, Kessler M. [Could the number of brain-dead organ donors be increased in France]. *Néphrologie & thérapeutique*. 2010 Feb;6(1):2-10.
- [33] Zamour-Tissot C, Lafarge R. Le diagnostic de mort encéphalique. *Urgences 2010 Sfm*. 2010.
- [34] Mertes PM, Longrois D, Audibert G, Charpentier C. Réanimation et mort encéphalique. *Le point sur*. 2007;La réanimation neurochirurgicale:461-87.
- [35] Bos EM, Leuvenink HG, van Goor H, Ploeg RJ. Kidney grafts from brain dead donors: Inferior quality or opportunity for improvement? *Kidney international*. 2007 Oct;72(7):797-805.
- [36] Bouma HR, Ploeg RJ, Schuur TA. Signal transduction pathways involved in brain death-induced renal injury. *Am J Transplant*. 2009 May;9(5):989-97.
- [37] Schuur TA, Morariu AM, Ottens PJ, Hart NA, Popma SH, Leuvenink HG, et al. Time-dependent changes in donor brain death related processes. *Am J Transplant*. 2006 Dec;6(12):2903-11.
- [38] Rapport annuel d'activité 2010 de l'Agence de Biomédecine. 2011.
- [39] Moers C, Smits JM, Maathuis MH, Treckmann J, van Gelder F, Napieralski BP, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *The New England journal of medicine*. 2009 Jan 1;360(1):7-19.
- [40] Rapport annuel d'activité 2008 de l'Agence de la Biomédecine. 2009.
- [41] Pessione F, Cohen S, Durand D, Hourmant M, Kessler M, Legendre C, et al. Multivariate analysis of donor risk factors for graft survival in kidney transplantation. *Transplantation*. 2003 Feb 15;75(3):361-7.
- [42] Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, Dykstra DM, Gillespie BW, Young EW, et al. Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation*. 2002 Nov 15;74(9):1281-6.
- [43] Rapport médicale et scientifique 2011 de l'Agence de Biomédecine. 2012.
- [44] Cohen S, Colpart J-J, Julvez J, Jacquelinet C. Mort encéphalique et don d'organes. *Médecine thérapeutique*. 1999 juin-juillet;5(6):449-55.
- [45] Harper SJ, Hosgood SA, Waller HL, Yang B, Kay MD, Goncalves I, et al. The effect of warm ischemic time on renal function and injury in the isolated hemoperfused kidney. *Transplantation*. 2008 Aug 15;86(3):445-51.
- [46] Brook NR, Waller JR, Nicholson ML. Nonheart-beating kidney donation: current practice and future developments. *Kidney international*. 2003 Apr;63(4):1516-29.
- [47] Keizer KM, de Fijter JW, Haase-Kromwijk BJ, Weimar W. Non-heart-beating donor kidneys in the Netherlands: allocation and outcome of transplantation. *Transplantation*. 2005 May 15;79(9):1195-9.

- [48] Sanchez-Fructuoso AI, Marques M, Prats D, Conesa J, Calvo N, Perez-Contin MJ, et al. Victims of cardiac arrest occurring outside the hospital: a source of transplantable kidneys. *Annals of internal medicine*. 2006 Aug 1;145(3):157-64.
- [49] Alonso A, Fernandez-Rivera C, Villaverde P, Oliver J, Cillero S, Lorenzo D, et al. Renal transplantation from non-heart-beating donors: a single-center 10-year experience. *Transplantation proceedings*. 2005 Nov;37(9):3658-60.
- [50] Alvarez J, del Barrio MR, Arias J, Gonzalez M, Cordoba L, Moreno F, et al. Five years of experience with non-heart-beating donors coming from the streets. *Transplantation proceedings*. 2002 Nov;34(7):2589-90.
- [51] Metcalfe MS, Butterworth PC, White SA, Saunders RN, Murphy GJ, Taub N, et al. A case-control comparison of the results of renal transplantation from heart-beating and non-heart-beating donors. *Transplantation*. 2001 Jun 15;71(11):1556-9.
- [52] Shoskes DA, Cecka JM. Deleterious effects of delayed graft function in cadaveric renal transplant recipients independent of acute rejection. *Transplantation*. 1998 Dec 27;66(12):1697-701.
- [53] Cooper JT, Chin LT, Krieger NR, Fernandez LA, Foley DP, Becker YT, et al. Donation after cardiac death: the university of wisconsin experience with renal transplantation. *Am J Transplant*. 2004 Sep;4(9):1490-4.
- [54] Moers C, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Non-heart beating organ donation: overview and future perspectives. *Transpl Int*. 2007 Jul;20(7):567-75.
- [55] Rudich SM, Kaplan B, Magee JC, Arenas JD, Punch JD, Kayler LK, et al. Renal transplantations performed using non-heart-beating organ donors: going back to the future? *Transplantation*. 2002 Dec 27;74(12):1715-20.
- [56] Weber M, Dindo D, Demartines N, Ambuhl PM, Clavien PA. Kidney transplantation from donors without a heartbeat. *The New England journal of medicine*. 2002 Jul 25;347(4):248-55.
- [57] Gok MA, Shenton BK, Buckley PE, Balupuri S, Soomro N, Manas D, et al. Long-term renal function after transplantation from non-heart-beating donor kidneys. *Transplantation proceedings*. 2002 Nov;34(7):2598-9.
- [58] Pallot JL. Physiologie rénale.
- [59] <http://medicalorama.com/encyclopedie/16899>.
- [60] <http://biodeug.com/licence-3-bio-cellulaire-chapitre-5-le-reinappareil-urinaire>.
- [61] Vaubourdolle M. Biochimie Hématologie. *Le Moniteur internat*. 2007;Tome 2.
- [62] Lameire N. La physiologie rénale et son implication dans l'IRA. *Le point sur*. 2007.
- [63] Eckardt KU, Bernhardt WM, Weidemann A, Warnecke C, Rosenberger C, Wiesener MS, et al. Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney Int Suppl*. 2005 Dec(99):S46-51.
- [64] Thuillier R, Tillement JP, Hauet T. Renal protective effect of metabolic therapy in patients with coronary artery disease and diabetes: from bench to bed side. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(8):863-82.
- [65] Brezis M, Rosen S, Epstein FH. Acute renal failure. Brenner BM, Rector FC eds *The kidney* 4th ed Philadelphia 1999.
- [66] Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical renal ischemia: a contemporary overview. *The Journal of urology*. 2008 Jul;180(1):19-30.
- [67] Silva P. Energy and fuel substrate metabolism in the kidney. *Seminars in nephrology*. 1990 Sep;10(5):432-44.
- [68] Pratschke J, Tullius SG, Neuhaus P. Brain death associated ischemia/reperfusion injury. *Ann Transplant*. 2004;9(1):78-80.
- [69] Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet*. 2004 Nov 13-19;364(9447):1814-27.
- [70] Bonventre JV, Cheung JY. Effects of metabolic acidosis on viability of cells exposed to anoxia. *The American journal of physiology*. 1985 Jul;249(1 Pt 1):C149-59.

- [71] Molitoris BA, Dahl R, Geerdes A. Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase during ischemia. *The American journal of physiology*. 1992 Sep;263(3 Pt 2):F488-95.
- [72] Alejandro VS, Nelson WJ, Huie P, Sibley RK, Dafoe D, Kuo P, et al. Postischemic injury, delayed function and Na+/K(+)-ATPase distribution in the transplanted kidney. *Kidney international*. 1995 Oct;48(4):1308-15.
- [73] Kwon O, Corrigan G, Myers BD, Sibley R, Scandling JD, Dafoe D, et al. Sodium reabsorption and distribution of Na+/K+-ATPase during postischemic injury to the renal allograft. *Kidney international*. 1999 Mar;55(3):963-75.
- [74] Tilney NL, Guttman RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation*. 1997 Oct 15;64(7):945-7.
- [75] Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. *The Biochemical journal*. 1997 Dec 15;328 ( Pt 3):721-32.
- [76] Liu X, Schnellmann RG. Calpain mediates progressive plasma membrane permeability and proteolysis of cytoskeleton-associated paxillin, talin, and vinculin during renal cell death. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2003 Jan;304(1):63-70.
- [77] Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiological reviews*. 2003 Jul;83(3):731-801.
- [78] <http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/notes/Metabolisme.htm>.
- [79] Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*. 2002 Feb 27;73(4):493-9.
- [80] Jassem W, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney international*. 2004 Aug;66(2):514-7.
- [81] <http://jhl.csvdc.qc.ca/html/Science/bio534/heterotrophe.html>.
- [82] Rauen U, Elling B, Gizewski ER, Korth HG, Sustmann R, de Groot H. Involvement of reactive oxygen species in the preservation injury to cultured liver endothelial cells. *Free radical biology & medicine*. 1997;22(1-2):17-24.
- [83] Rauen U, de Groot H. Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells. *Free radical biology & medicine*. 1998 May;24(7-8):1316-23.
- [84] Emami A, Schwartz JH, Borkan SC. Transient ischemia or heat stress induces a cytoprotectant protein in rat kidney. *The American journal of physiology*. 1991 Apr;260(4 Pt 2):F479-85.
- [85] Salahudeen AK, Huang H, Patel P, Jenkins JK. Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury. *Transplantation*. 2000 Nov 27;70(10):1424-31.
- [86] Cruthirds DL, Novak L, Akhi KM, Sanders PW, Thompson JA, MacMillan-Crow LA. Mitochondrial targets of oxidative stress during renal ischemia/reperfusion. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2003 Apr 1;412(1):27-33.
- [87] Szwarc I, Garrigue V, Delmas S, Deleuze S, Chong G, Mourad G. [Delayed graft function: a frequent but still unsolved problem in renal transplantation]. *Nephrologie & therapeutique*. 2005 Dec;1(6):325-34.
- [88] Baughman JM, Mootha VK. Buffering mitochondrial DNA variation. *Nature genetics*. 2006 Nov;38(11):1232-3.
- [89] Abramov AY, Scorziello A, Duchon MR. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci*. 2007 Jan 31;27(5):1129-38.
- [90] Gao X, Zhang H, Belmadani S, Wu J, Xu X, Elford H, et al. Role of TNF-alpha-induced reactive oxygen species in endothelial dysfunction during reperfusion injury. *American journal of physiology*. 2008 Dec;295(6):H2242-9.
- [91] Burns AT, Davies DR, McLaren AJ, Cerundolo L, Morris PJ, Fuggle SV. Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation*. 1998 Oct 15;66(7):872-6.

- [92] Suzuki C, Isaka Y, Takabatake Y, Tanaka H, Koike M, Shibata M, et al. Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008 Mar 28;368(1):100-6.
- [93] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology*. 2012 2012;298:229-317.
- [94] Salahudeen AK, Joshi M, Jenkins JK. Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells. *Transplantation*. 2001 Sep 15;72(5):798-804.
- [95] Lemasters JJ. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *The American journal of physiology*. 1999 Jan;276(1 Pt 1):G1-6.
- [96] Gourdin MJ, Bree B, De Kock M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *European journal of anaesthesiology*. 2009 Jul;26(7):537-47.
- [97] Salahudeen AK, Huang H, Joshi M, Moore NA, Jenkins JK. Involvement of the mitochondrial pathway in cold storage and rewarming-associated apoptosis of human renal proximal tubular cells. *Am J Transplant*. 2003 Mar;3(3):273-80.
- [98] Andre N, Rome A, Carre M. [Antimitochondrial agents: a new class of anticancer agents]. *Arch Pediatr*. 2006 Jan;13(1):69-75.
- [99] [http://afd-ld.org/~fdp\\_viro/content.php?page=interaction](http://afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=interaction).
- [100] Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Apr;284(4):F608-27.
- [101] Bamboat ZM, Ocuin LM, Balachandran VP, Obaid H, Plitas G, DeMatteo RP. Conventional DCs reduce liver ischemia/reperfusion injury in mice via IL-10 secretion. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Feb;120(2):559-69.
- [102] Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current opinion in immunology*. 2001 Feb;13(1):114-9.
- [103] Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science (New York, NY)*. 2002 Apr 12;296(5566):301-5.
- [104] Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol*. 2002 Feb 1;168(3):1286-93.
- [105] Kim BS, Lim SW, Li C, Kim JS, Sun BK, Ahn KO, et al. Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys. *Transplantation*. 2005 May 27;79(10):1370-7.
- [106] Mkaddem SB, Werts C, Goujon JM, Bens M, Pedruzzi E, Ogier-Denis E, et al. Heat shock protein gp96 interacts with protein phosphatase 5 and controls toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 in post-hypoxic kidney cells. *The Journal of biological chemistry*. 2009 May 1;284(18):12541-9.
- [107] Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free radical biology & medicine*. 2010 May 1;48(9):1121-32.
- [108] Arslan F, Keogh B, McGuirk P, Parker AE. TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury. *Mediators of inflammation*. 2010;2010:704202.
- [109] Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ, Hall FW, Kiosses WB, Tobias PS, et al. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol*. 2007 May 15;178(10):6252-8.
- [110] Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation*. 2007 Oct;117(10):2847-59.
- [111] Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJ, Kirschning CJ, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *The Journal of clinical investigation*. 2005 Oct;115(10):2894-903.
- [112] Koo DD, Welsh KI, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation: an immunohistochemical analysis of changes after reperfusion. *The American journal of pathology*. 1998 Aug;153(2):557-66.

- [113] Pober JS. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis research*. 2002;4 Suppl 3:S109-16.
- [114] Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clinical immunology* (Orlando, Fla. 2007 Apr;123(1):7-13.
- [115] Bolisetty S, Agarwal A. Neutrophils in acute kidney injury: not neutral any more. *Kidney international*. 2009 Apr;75(7):674-6.
- [116] Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *Journal of molecular medicine* (Berlin, Germany). 2009 Sep;87(9):859-64.
- [117] Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clinical immunology* (Orlando, Fla. 2009 Jan;130(1):41-50.
- [118] Molitoris BA, Marrs J. The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *The American journal of medicine*. 1999 May;106(5):583-92.
- [119] [http://umvf.univ-nantes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath\\_3/site/html/2.html](http://umvf.univ-nantes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_3/site/html/2.html).
- [120] Gute D, Korthuis RJ. Role of leukocyte adherence in reperfusion-induced microvascular dysfunction and tissue injury. Granger, DN, Schmid-Schonbein, GW (Eds), *Leukocyte Adhesion* Oxford University Press. 1995.
- [121] Nourshargh S, Krombach F, Dejana E. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *Journal of leukocyte biology*. 2006 Oct;80(4):714-8.
- [122] Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nature reviews*. 2010 May;11(5):366-78.
- [123] Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli FM, et al. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nature immunology*. 2011 Aug;12(8):761-9.
- [124] Proebstl D, Voisin MB, Woodfin A, Whiteford J, D'Acquisto F, Jones GE, et al. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2012 Jun 4;209(6):1219-34.
- [125] McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* (New York, NY. 2010 Oct 15;330(6002):362-6.
- [126] Woeste G, Wullstein C, Meyer S, Usadel KH, Hopt UT, Bechstein WO, et al. Octreotide attenuates impaired microcirculation in postischemic pancreatitis when administered before induction of ischemia. *Transplantation*. 2008 Oct 15;86(7):961-7.
- [127] Jo SK, Sung SA, Cho WY, Go KJ, Kim HK. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 May;21(5):1231-9.
- [128] Sung FL, Zhu TY, Au-Yeung KK, Siow YL, O K. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney international*. 2002 Oct;62(4):1160-70.
- [129] Ko GJ, Boo CS, Jo SK, Cho WY, Kim HK. Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Mar;23(3):842-52.
- [130] Vinuesa E, Hotter G, Jung M, Herrero-Fresneda I, Torras J, Sola A. Macrophage involvement in the kidney repair phase after ischaemia/reperfusion injury. *The Journal of pathology*. 2008 Jan;214(1):104-13.
- [131] Huang Y, Rabb H, Womer KL. Ischemia-reperfusion and immediate T cell responses. *Cellular immunology*. 2007 Jul;248(1):4-11.
- [132] Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplantation reviews* (Orlando, Fla. 2009 Jan;23(1):1-10.

- [133] Ascon DB, Lopez-Briones S, Liu M, Ascon M, Savransky V, Colvin RB, et al. Phenotypic and functional characterization of kidney-infiltrating lymphocytes in renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol*. 2006 Sep 1;177(5):3380-7.
- [134] Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney international*. 2007 Apr;71(7):619-28.
- [135] Loverre A, Capobianco C, Stallone G, Infante B, Schena A, Ditonno P, et al. Ischemia-reperfusion injury-induced abnormal dendritic cell traffic in the transplanted kidney with delayed graft function. *Kidney international*. 2007 Oct;72(8):994-1003.
- [136] Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nature medicine*. 2011;17(11):1391-401.
- [137] Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation*. 2005 Oct 4;112(14):2143-8.
- [138] Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, Mauiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, et al. Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *The Journal of clinical investigation*. 2001 Nov;108(9):1283-90.
- [139] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*. 2005 Apr;6(4):345-52.
- [140] Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *The Journal of experimental medicine*. 2001 Jun 4;193(11):1311-8.
- [141] Gandolfo MT, Jang HR, Bagnasco SM, Ko GJ, Agreda P, Satpute SR, et al. Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury. *Kidney international*. 2009 Oct;76(7):717-29.
- [142] Kinsey GR, Sharma R, Huang L, Li L, Vergis AL, Ye H, et al. Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Aug;20(8):1744-53.
- [143] Kinsey GR, Huang L, Vergis AL, Li L, Okusa MD. Regulatory T cells contribute to the protective effect of ischemic preconditioning in the kidney. *Kidney international*. 2010 May;77(9):771-80.
- [144] Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nature medicine*. 2009 Feb;15(2):192-9.
- [145] Hill P, Shukla D, Tran MG, Aragonés J, Cook HT, Carmeliet P, et al. Inhibition of hypoxia inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Jan;19(1):39-46.
- [146] Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P, Chou J, Schmieder RE, Gunzler V, et al. Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Dec;21(12):2151-6.
- [147] Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH. Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jun;14(6):1643-51.
- [148] Yapici U, Bemelman FJ, Scheepstra CG, Roelofs JJ, Claessen N, van der Loos C, et al. Intragraft FOXP3 protein or mRNA during acute renal allograft rejection correlates with inflammation, fibrosis, and poor renal outcome. *Transplantation*. 2009 May 15;87(9):1377-80.
- [149] Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American journal of pathology*. 2007 Jun;170(6):1807-16.
- [150] Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews*. 2002 May;3(5):349-63.
- [151] Pallet N, Anglicheau D. Transition épithélio-mésenchymateuse: aspects fondamentaux. *Flammarion médecine-sciences, Actualités néphrologiques*. 2008.

- [152] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Jan;15(1):1-12.
- [153] Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2004 Mar;82(3):175-81.
- [154] Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells, tissues, organs*. 2007;185(1-3):191-203.
- [155] Okada H, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *The American journal of physiology*. 1997 Oct;273(4 Pt 2):F563-74.
- [156] Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *The American journal of pathology*. 2001 Oct;159(4):1465-75.
- [157] Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol*. 2006 Nov;17(11):2974-84.
- [158] Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2000 May;80(5):617-53.
- [159] Neilson EG. Setting a trap for tissue fibrosis. *Nature medicine*. 2005 Apr;11(4):373-4.
- [160] Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nature cell biology*. 2002 Aug;4(8):599-604.
- [161] Lin J, Patel SR, Cheng X, Cho EA, Levitan I, Ullenbruch M, et al. Kielin/chordin-like protein, a novel enhancer of BMP signaling, attenuates renal fibrotic disease. *Nature medicine*. 2005 Apr;11(4):387-93.
- [162] Hertig A, Xu-Dubois YC, Rondeau E. Transition épithélio-mésenchymateuse : un marqueur utile en transplantation rénale. *Flammarion médecine-sciences, Actualités néphrologiques*. 2008.
- [163] Meulemans D, Bronner-Fraser M. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Developmental cell*. 2004 Sep;7(3):291-9.
- [164] Ridinger K, Ilg EC, Niggli FK, Heizmann CW, Schafer BW. Clustered organization of S100 genes in human and mouse. *Biochimica et biophysica acta*. 1998 Dec 10;1448(2):254-63.
- [165] Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2002 Aug;110(3):341-50.
- [166] Gabbiani G. The biology of the myofibroblast. *Kidney international*. 1992 Mar;41(3):530-2.
- [167] Powell DW. Myofibroblasts: paracrine cells important in health and disease. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2000;111:271-92; discussion 92-3.
- [168] Lelongt B, Ronco P. Role of extracellular matrix in kidney development and repair. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2003 Aug;18(8):731-42.
- [169] Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Mar;292(3):F905-11.
- [170] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*. 2003 May 2;92(8):827-39.
- [171] Davies M, Martin J, Thomas GJ, Lovett DH. Proteinases and glomerular matrix turnover. *Kidney international*. 1992 Mar;41(3):671-8.
- [172] Hertig A, Rondeau E. Plasminogen activator inhibitor type 1: the two faces of the same coin. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2004 Jan;13(1):39-44.
- [173] Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *The Journal of clinical investigation*. 1991 Oct;88(4):1067-72.
- [174] Baricos WH, Cortez SL, el-Dahr SS, Schnaper HW. ECM degradation by cultured human mesangial cells is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade. *Kidney international*. 1995 Apr;47(4):1039-47.
- [175] Gaertner R, Logeart D, Michel JB, Mercadier JJ. [Early left ventricular remodelling following acute coronary accident]. *Med Sci (Paris)*. 2004 Jun-Jul;20(6-7):643-50.

- [176] Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology*. 2008 Jan;214(2):199-210.
- [177] Hertig A. [Epithelial-mesenchymal transition of the renal graft]. *Nephrologie & therapeutique*. 2008 Jun;4 Suppl 1:S25-S8.
- [178] Bedi S, Vidyasagar A, Djamali A. Epithelial-to-mesenchymal transition and chronic allograft tubulointerstitial fibrosis. *Transplantation reviews (Orlando, Fla)*. 2008 Jan;22(1):1-5.
- [179] Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *The Journal of cell biology*. 1995 Jul;130(2):393-405.
- [180] Bagetti Filho HJ, Pereira-Sampaio MA, Favorito LA, Sampaio FJ. Pig kidney: anatomical relationships between the renal venous arrangement and the kidney collecting system. *The Journal of urology*. 2008 Apr;179(4):1627-30.
- [181] Dehoux JP, Gianello P. The importance of large animal models in transplantation. *Front Biosci*. 2007;12:4864-80.
- [182] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*. 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.
- [183] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- [184] Seelig HP. [The Jaffe reaction with creatinine. Reaction product and general reaction conditions]. *Zeitschrift fur klinische Chemie und klinische Biochemie*. 1969 Nov;7(6):581-5.
- [185] Bartels H, Cikes M. [Chromogens in the creatinine determination of Jaffe]. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1969 Oct;26(1):1-10.
- [186] Bartels H. [Serum creatinine and creatinine clearance]. *Die Medizinische Welt*. 1972 Jul 8;23(27):961-3.
- [187] Goujon JM, Hauet T, Menet E, Levillain P, Babin P, Carretier M. Histological evaluation of proximal tubule cell injury in isolated perfused pig kidneys exposed to cold ischemia. *The Journal of surgical research*. 1999 Apr;82(2):228-33.
- [188] Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI. Sirius Red F3ba as a Stain for Connective Tissue. *Archives of pathology*. 1964 Jul;78:69-72.
- [189] Jamieson RW, Friend PJ. Organ reperfusion and preservation. *Front Biosci*. 2008;13:221-35.
- [190] Hosgood SA, Bagul A, Yang B, Nicholson ML. The relative effects of warm and cold ischemic injury in an experimental model of nonheartbeating donor kidneys. *Transplantation*. 2008 Jan 15;85(1):88-92.
- [191] Brasile L, Stubenitsky BM, Booster MH, Arenada D, Haisch C, Kootstra G. Hypothermia--a limiting factor in using warm ischemically damaged kidneys. *Am J Transplant*. 2001 Nov;1(4):316-20.
- [192] Hamamoto H, Sakamoto H, Leshnowar BG, Parish LM, Kanemoto S, Hinmon R, et al. Very mild hypothermia during ischemia and reperfusion improves postinfarction ventricular remodeling. *The Annals of thoracic surgery*. 2009 Jan;87(1):172-7.
- [193] Chien GL, Wolff RA, Davis RF, van Winkle DM. "Normothermic range" temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovascular research*. 1994 Jul;28(7):1014-7.
- [194] Tissier R, Cohen MV, Downey JM. Does mild hypothermia protect against reperfusion injury? The debate continues. *Basic research in cardiology*. 2011 Sep;106(5):691-5.
- [195] Hale SL, Dae MW, Kloner RA. Hypothermia during reperfusion limits 'no-reflow' injury in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 2003 Sep 1;59(3):715-22.
- [196] Hamamoto H, Leshnowar BG, Parish LM, Sakamoto H, Kanemoto S, Hinmon R, et al. Regional heterogeneity of myocardial reperfusion injury: effect of mild hypothermia. *The Annals of thoracic surgery*. 2009 Jan;87(1):164-71.
- [197] Hale SL, Kloner RA. Myocardial temperature in acute myocardial infarction: protection with mild regional hypothermia. *The American journal of physiology*. 1997 Jul;273(1 Pt 2):H220-7.

- [198] Miki T, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. Mild hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart: a practical intervention for acute myocardial infarction? *Basic research in cardiology*. 1998 Oct;93(5):372-83.
- [199] Hale SL, Kloner RA. Myocardial temperature reduction attenuates necrosis after prolonged ischemia in rabbits. *Cardiovascular research*. 1998 Dec;40(3):502-7.
- [200] Hale SL, Dave RH, Kloner RA. Regional hypothermia reduces myocardial necrosis even when instituted after the onset of ischemia. *Basic research in cardiology*. 1997 Oct;92(5):351-7.
- [201] Schwartz DS, Bremner RM, Baker CJ, Uppal KM, Barr ML, Cohen RG, et al. Regional topical hypothermia of the beating heart: preservation of function and tissue. *The Annals of thoracic surgery*. 2001 Sep;72(3):804-9.
- [202] Duncker DJ, Klassen CL, Ishibashi Y, Herrlinger SH, Pavek TJ, Bache RJ. Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *The American journal of physiology*. 1996 Apr;270(4 Pt 2):H1189-99.
- [203] Dae MW, Gao DW, Sessler DI, Chair K, Stillson CA. Effect of endovascular cooling on myocardial temperature, infarct size, and cardiac output in human-sized pigs. *American journal of physiology*. 2002 May;282(5):H1584-91.
- [204] Gotberg M, Olivecrona GK, Engblom H, Ugander M, van der Pals J, Heiberg E, et al. Rapid short-duration hypothermia with cold saline and endovascular cooling before reperfusion reduces microvascular obstruction and myocardial infarct size. *BMC cardiovascular disorders*. 2008;8:7.
- [205] van den Doel MA, Gho BC, Duval SY, Schoemaker RG, Duncker DJ, Verdouw PD. Hypothermia extends the cardioprotection by ischaemic preconditioning to coronary artery occlusions of longer duration. *Cardiovascular research*. 1998 Jan;37(1):76-81.
- [206] Tissier R, Ghaleh B, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A. Myocardial protection with mild hypothermia. *Cardiovascular research*. 2012 May 1;94(2):217-25.
- [207] Tissier R, Chenoune M, Ghaleh B, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A. The small chill: mild hypothermia for cardioprotection? *Cardiovascular research*. 2010 Dec 1;88(3):406-14.
- [208] Ning XH, Chen SH, Xu CS, Hyyti OM, Qian K, Krueger JJ, et al. Hypothermia preserves myocardial function and mitochondrial protein gene expression during hypoxia. *American journal of physiology*. 2003 Jul;285(1):H212-9.
- [209] Ning XH, Xu CS, Portman MA. Mitochondrial protein and HSP70 signaling after ischemia in hypothermic-adapted hearts augmented with glucose. *The American journal of physiology*. 1999 Jul;277(1 Pt 2):R11-7.
- [210] Ning XH, Chi EY, Buroker NE, Chen SH, Xu CS, Tien YT, et al. Moderate hypothermia (30 degrees C) maintains myocardial integrity and modifies response of cell survival proteins after reperfusion. *American journal of physiology*. 2007 Oct;293(4):H2119-28.
- [211] Yang D, Guo S, Zhang T, Li H. Hypothermia attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial cell apoptosis via alterations in apoptotic pathways and JNK signaling. *FEBS letters*. 2009 Aug 6;583(15):2500-6.
- [212] Ning XH, Chen SH, Xu CS, Li L, Yao LY, Qian K, et al. Hypothermic protection of the ischemic heart via alterations in apoptotic pathways as assessed by gene array analysis. *J Appl Physiol*. 2002 May;92(5):2200-7.
- [213] Yang D, Zeng Y, Tian C, Liu J, Guo SB, Zheng YH, et al. Transcriptomic analysis of mild hypothermia-dependent alterations during endothelial reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem*. 2010;25(6):605-14.
- [214] Imakita M, Yamanaka N, Kuroda N, Kitayama Y, Okamoto E. Does topical cooling alleviate ischemia/reperfusion injury during inflow occlusion in hepatectomy? Results of an experimental and clinical study. *Surgery today*. 2000;30(9):795-804.
- [215] Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, et al. The influence of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury: a systematic analysis. *Transplantation*. 2001 Nov 15;72(9):1486-90.

- [216] Khandoga A, Enders G, Luchting B, Axmann S, Minor T, Nilsson U, et al. Impact of intraischemic temperature on oxidative stress during hepatic reperfusion. *Free radical biology & medicine*. 2003 Oct 15;35(8):901-9.
- [217] Zager RA, Altschuld R. Body temperature: an important determinant of severity of ischemic renal injury. *The American journal of physiology*. 1986 Jul;251(1 Pt 2):F87-93.
- [218] Olschewski P, Gass P, Ariyakhagorn V, Jasse K, Hunold G, Menzel M, et al. The influence of storage temperature during machine perfusion on preservation quality of marginal donor livers. *Cryobiology*. 2010 Jun;60(3):337-43.
- [219] Haase VH. Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Aug;291(2):F271-81.
- [220] Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature reviews*. 2004 May;5(5):343-54.
- [221] Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2004 Aug;19:176-82.
- [222] Agani FH, Pichiule P, Chavez JC, LaManna JC. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Nov 17;275(46):35863-7.
- [223] Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Aug 18;275(33):25130-8.
- [224] Yamane A, Seetharam L, Yamaguchi S, Gotoh N, Takahashi T, Neufeld G, et al. A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene*. 1994 Sep;9(9):2683-90.
- [225] de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science (New York, NY)*. 1992 Feb 21;255(5047):989-91.
- [226] Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K, et al. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene*. 2000 Apr 20;19(17):2138-46.
- [227] Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*. 2001 Feb 1;97(3):785-91.
- [228] Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobe G, Johnson DW. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Feb;19(2):348-55.
- [229] Bernhardt WM, Gottmann U, Doyon F, Buchholz B, Campean V, Schodel J, et al. Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogeneic kidney transplant model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Dec 15;106(50):21276-81.
- [230] Higgins DF, Kimura K, Iwano M, Haase VH. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2008 May 1;7(9):1128-32.
- [231] Gunaratnam L, Bonventre JV. HIF in kidney disease and development. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Sep;20(9):1877-87.
- [232] Orphanides C, Fine LG, Norman JT. Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via a TGF-beta1-independent mechanism. *Kidney international*. 1997 Sep;52(3):637-47.
- [233] Haase VH. Pathophysiological Consequences of HIF Activation: HIF as a modulator of fibrosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009 Oct;1177:57-65.

- [234] Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2007 Dec;117(12):3810-20.
- [235] Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP, Shelley CS. Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Jul 13;101(28):10440-5.
- [236] Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*. 2003 Mar 7;112(5):645-57.
- [237] Hosgood SA, Nicholson HF, Nicholson ML. Oxygenated kidney preservation techniques. *Transplantation*. 2012 Mar 15;93(5):455-9.
- [238] Minor T, Putter C, Gallinat A, Ose C, Kaiser G, Scherag A, et al. Oxygen persufflation as adjunct in liver preservation (OPAL): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2011;12:234.
- [239] Minor T, Stegemann J, Hirner A, Koetting M. Impaired autophagic clearance after cold preservation of fatty livers correlates with tissue necrosis upon reperfusion and is reversed by hypothermic reconditioning. *Liver Transpl*. 2009 Jul;15(7):798-805.
- [240] Kim JS, Nitta T, Mohuczy D, O'Malley KA, Moldawer LL, Dunn WA, Jr., et al. Impaired autophagy: A mechanism of mitochondrial dysfunction in anoxic rat hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2008 May;47(5):1725-36.
- [241] Galluzzi L, Morselli E, Vicencio JM, Kepp O, Joza N, Tajeddine N, et al. Life, death and burial: multifaceted impact of autophagy. *Biochemical Society transactions*. 2008 Oct;36(Pt 5):786-90.
- [242] Fischer JH, Funcke C, Yotsumoto G, Jeschkeit-Schubbert S, Kuhn-Regnier F. Maintenance of physiological coronary endothelial function after 3.3 h of hypothermic oxygen persufflation preservation and orthotopic transplantation of non-heart-beating donor hearts. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004 Jan;25(1):98-104.
- [243] Minor T, Akbar S, Tolba R, Dombrowski F. Cold preservation of fatty liver grafts: prevention of functional and ultrastructural impairments by venous oxygen persufflation. *Journal of hepatology*. 2000 Jan;32(1):105-11.
- [244] Fujino Y. Two-layer cold storage method for pancreas and islet cell transplantation. *World J Gastroenterol*. 2010 Jul 14;16(26):3235-8.
- [245] Fujino Y, Kuroda Y, Suzuki Y, Fujiwara H, Kawamura T, Morita A, et al. Preservation of canine pancreas for 96 hours by a modified two-layer (UW solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation*. 1991 May;51(5):1133-5.
- [246] Kuroda Y, Morita A, Fujino Y, Tanioka Y, Ku Y, Saitoh Y. Restoration of pancreas graft function preserved by a two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method after significant warm ischemia. *Transplantation*. 1993 Jan;55(1):227-8.
- [247] Fujino Y, Suzuki Y, Tsujimura T, Takahashi T, Tanioka Y, Tominaga M, et al. Possible role of heat shock protein 60 in reducing ischemic-reperfusion injury in canine pancreas grafts after preservation by the two-layer method. *Pancreas*. 2001 Nov;23(4):393-8.
- [248] Matsumoto S, Kuroda Y, Hamano M, Kim Y, Suzuki Y, Ku Y, et al. Direct evidence of pancreatic tissue oxygenation during preservation by the two-layer method. *Transplantation*. 1996 Dec 15;62(11):1667-70.
- [249] Brandhorst H, Asif S, Andersson K, Theisinger B, Andersson HH, Felldin M, et al. A new oxygen carrier for improved long-term storage of human pancreata before islet isolation. *Transplantation*. 2010 Jan 27;89(2):155-60.
- [250] Hosgood SA, Nicholson ML. The role of perfluorocarbon in organ preservation. *Transplantation*. 2010 May 27;89(10):1169-75.
- [251] Tanioka Y, Sutherland DE, Kuroda Y, Gilmore TR, Asaheim TC, Kronson JW, et al. Excellence of the two-layer method (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) in pancreas preservation before islet isolation. *Surgery*. 1997 Aug;122(2):435-41; discussion 41-2.

- [252] Deai T, Tanioka Y, Suzuki Y, Kuroda Y. The effect of the two-layer cold storage method on islet isolation from ischemically damaged pancreas. *The Kobe journal of medical sciences*. 1999 Aug;45(3-4):191-9.
- [253] Tsujimura T, Kuroda Y, Kin T, Avila JG, Rajotte RV, Korbitt GS, et al. Human islet transplantation from pancreases with prolonged cold ischemia using additional preservation by the two-layer (UW solution/perfluorochemical) cold-storage method. *Transplantation*. 2002 Dec 27;74(12):1687-91.
- [254] Matsumoto S, Rigley TH, Reems JA, Kuroda Y, Stevens RB. Improved islet yields from *Macaca nemestrina* and marginal human pancreata after two-layer method preservation and endogenous trypsin inhibition. *Am J Transplant*. 2003 Jan;3(1):53-63.
- [255] Matsumoto S. Clinical application of perfluorocarbons for organ preservation. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*. 2005;33(1):75-82.
- [256] Matsumoto S, Kuroda Y. Perfluorocarbon for organ preservation before transplantation. *Transplantation*. 2002 Dec 27;74(12):1804-9.
- [257] Farrar D, Grocott M. Intravenous artificial oxygen carriers. *Hosp Med*. 2003 Jun;64(6):352-6.
- [258] Cataldi A. Cell responses to oxidative stressors. *Current pharmaceutical design*. 16(12):1387-95.
- [259] Clark LC, Jr., Gollan F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science (New York, NY)*. 1966 Jun 24;152(3730):1755-6.
- [260] Geyer RP, Monroe RG, Taylor K. Survival of rats totally perfused with a fluorocarbon-detergent preparation. *Organ perfusion and preservation*. 1968:pp. 85-96
- [261] Sloviter HA, Kamimoto T. Erythrocyte substitute for perfusion of brain. *Nature*. 1967 Nov 4;216(5114):458-60.
- [262] Naito R, Yokoyama K. An improved perfluorodecalin emulsion. *Progress in clinical and biological research*. 1978;19:81-9.
- [263] Mitsuno T, Ohyanagi H. Present status of clinical studies of Fluosol-DA (20%) in Japan. *International anesthesiology clinics*. 1985 Spring;23(1):169-84.
- [264] Winslow RM. Hemoglobin-based red cell substitutes. Johns Hopkins University Press. 1992.
- [265] Hoffman SJ, Looker DL, Roehrich JM, Cozart PE, Durfee SL, Tedesco JL, et al. Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990 Nov;87(21):8521-5.
- [266] Smani Y, Labrude P, Vigneron C, Faivre B. [Hemoglobin-based oxygen carriers and trials to substitute red blood cells]. *Transfus Clin Biol*. 2007 Nov;14(5):464-73.
- [267] Schubert A. Hemoglobin-Based Oxygen Carriers, Blood Substitutes, and Their Relevance to High-Volume Blood Loss. *Seminars in Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain*. 2001;20(1 ):pp 78-84.
- [268] Greenburg AG, Kim HW. Hemoglobin-based oxygen carriers. *Critical care (London, England)*. 2004;8 Suppl 2:S61-4.
- [269] Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Burch JM, Haenel JB, Garcia J, et al. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery. *Journal of the American College of Surgeons*. 1998 Aug;187(2):113-20; discussion 20-2.
- [270] Burmeister MA, Rempf C, Standl TG, Rehberg S, Bartsch-Zwemke S, Krause T, et al. Effects of prophylactic or therapeutic application of bovine haemoglobin HBOC-200 on ischaemia-reperfusion injury following acute coronary ligation in rats. *British journal of anaesthesia*. 2005 Dec;95(6):737-45.
- [271] Caswell JE, Strange MB, Rimmer DM, 3rd, Gibson MF, Cole P, Lefer DJ. A novel hemoglobin-based blood substitute protects against myocardial reperfusion injury. *American journal of physiology*. 2005 Apr;288(4):H1796-801.
- [272] Szebeni J, Spielberg H, Cliff RO, Wassef NM, Rudolph AS, Alving CR. Complement activation and thromboxane secretion by liposome-encapsulated hemoglobin in rats in vivo: inhibition by soluble complement receptor type 1. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*. 1997 Jul;25(4):347-55.

- [273] Winslow RM. Current status of blood substitute research: towards a new paradigm. *Journal of internal medicine*. 2003 May;253(5):508-17.
- [274] Ketcham EM, Cairns CB. Hemoglobin-based oxygen carriers: development and clinical potential. *Annals of emergency medicine*. 1999 Mar;33(3):326-37.
- [275] Rohlfis RJ, Bruner E, Chiu A, Gonzales A, Gonzales ML, Magde D, et al. Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide. *The Journal of biological chemistry*. 1998 May 15;273(20):12128-34.
- [276] Smani Y, Fifre A, Labrude P, Vigneron C, Faivre B. Pharmacological and physicochemical factors in the pressor effects of conjugated haemoglobin-based oxygen carriers in vivo. *Journal of hypertension*. 2007 Mar;25(3):599-608.
- [277] Smani Y, Faivre B, Audonnet-Blaise S, Labrude P, Vigneron C. Hemoglobin-based oxygen carrier distribution inside vascular wall and arterial pressure evolution: is there a relationship? *European surgical research Europäische chirurgische Forschung*. 2005 Jan-Feb;37(1):1-8.
- [278] Gulati A, Sharma AC, Singh G. Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. *Critical care medicine*. 1996 Jan;24(1):137-47.
- [279] Gulati A, Rebello S. Role of adrenergic mechanisms in the pressor effect of diaspirin cross-linked hemoglobin. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1994 Jul;124(1):125-33.
- [280] D'Agnillo F, Alayash AI. Redox cycling of diaspirin cross-linked hemoglobin induces G2/M arrest and apoptosis in cultured endothelial cells. *Blood*. 2001 Dec 1;98(12):3315-23.
- [281] Buehler PW, D'Agnillo F, Schaer DJ. Hemoglobin-based oxygen carriers: From mechanisms of toxicity and clearance to rational drug design. *Trends in molecular medicine*. 2010 Oct;16(10):447-57.
- [282] Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *Jama*. 2008 May 21;299(19):2304-12.
- [283] Fergusson DA, McIntyre L. The future of clinical trials evaluating blood substitutes. *Jama*. 2008 May 21;299(19):2324-6.
- [284] Sanchez C, MAGASICH N, VAN DER LINDEN P. Les transporteurs d'oxygène : quel avenir ? . 2009.
- [285] Regner KR, Nilakantan V, Ryan RP, Mortensen J, White SM, Shames BD, et al. Protective effect of Lifor solution in experimental renal ischemia-reperfusion injury. *The Journal of surgical research*. 2010 Dec;164(2):e291-7.
- [286] Regner KR, Nilakantan V, Ryan RP, Mortensen J, White SM, Shames BD, et al. Protective effect of Lifor solution in experimental renal ischemia-reperfusion injury. *The Journal of surgical research*. Dec;164(2):e291-7.
- [287] Zal F, Green BN, Lallier FH, Vinogradov SN, Toulmond A. Quaternary structure of the extracellular haemoglobin of the lugworm *Arenicola marina*: a multi-angle-laser-light-scattering and electrospray-ionisation-mass-spectrometry analysis. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1997 Jan 15;243(1-2):85-92.
- [288] Rousselot M, Le Guen D, Zal F. Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular haemoglobin. *The FEBS journal*. 2006 Apr;273(7):1582-96.
- [289] Thuillier R, Dutheil D, Trieu MT, Mallet V, Allain G, Rousselot M, et al. Supplementation with a new therapeutic oxygen carrier reduces chronic fibrosis and organ dysfunction in kidney static preservation. *Am J Transplant*. 2011 Sep;11(9):1845-60.
- [290] Jouan L, Taveau JC, Marco S, Lallier FH, Lamy JN. Occurrence of two architectural types of hexagonal bilayer hemoglobin in annelids: comparison of 3D reconstruction volumes of *Arenicola marina* and *Lumbricus terrestris* hemoglobins. *Journal of molecular biology*. 2001 Jan 26;305(4):757-71.
- [291] Guo Y, Yu X, Rihani K, Wang QY, Rong L. The role of a conserved acidic residue in calcium-dependent protein folding for a low density lipoprotein (LDL)-A module: implications in structure and

function for the LDL receptor superfamily. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Apr 16;279(16):16629-37.

[292] Tsai AG, Intaglietta M, Sakai H, Delpy E, La Rochelle CD, Rousselot M, et al. Microcirculation and NO-CO studies of a natural extracellular hemoglobin developed for an oxygen therapeutic carrier. *Current drug discovery technologies*. 2012 Sep;9(3):166-72.

[293] Harrington JP, Kobayashi S, Dorman SC, Zito SL, Hirsch RE. Acellular invertebrate hemoglobins as model therapeutic oxygen carriers: unique redox potentials. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*. 2007;35(1):53-67.

[294] Harnois T, Rousselot M, Rogniaux H, Zal F. High-level production of recombinant *Arenicola marina* globin chains in *Escherichia coli*: a new generation of blood substitute. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*. 2009;37(3):106-16.

[295] Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, Lagente V, Pirow R, Rees JF, et al. *Arenicola marina* extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnology journal*. 2006 Mar;1(3):333-45.

[296] Favreau F, Thuillier R, Cau J, Milin S, Manguy E, Mauco G, et al. Anti-thrombin therapy during warm ischemia and cold preservation prevents chronic kidney graft fibrosis in a DCD model. *Am J Transplant*. 2010 Jan;10(1):30-9.

[297] Ahlenstiel T, Burkhardt G, Kohler H, Kuhlmann MK. Improved cold preservation of kidney tubular cells by means of adding bioflavonoids to organ preservation solutions. *Transplantation*. 2006 Jan 27;81(2):231-9.

[298] McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England journal of medicine*. 1985 Jan 17;312(3):159-63.

[299] Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted organs: some new strategies against an old problem. *Am J Transplant*. 2004 Jan;4(1):1.

[300] Cassie S, Masterson MF, Polukoshko A, Viskovic MM, Tibbles LA. Ischemia/reperfusion induces the recruitment of leukocytes from whole blood under flow conditions. *Free radical biology & medicine*. 2004 May 1;36(9):1102-11.

[301] Dragun D, Hoff U, Park JK, Qun Y, Schneider W, Luft FC, et al. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background. *Kidney international*. 2000 Nov;58(5):2166-77.

[302] Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Dec;112(12):1776-84.

[303] Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation*. 2007 Mar;117(3):524-9.

[304] El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant*. 2009 Mar;9(3):527-35.

[305] Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation*. 2006 Mar 15;81(5):643-54.

[306] Jochmans I, Moers C, Smits JM, Leuvenink HG, Treckmann J, Paul A, et al. Machine perfusion versus cold storage for the preservation of kidneys donated after cardiac death: a multicenter, randomized, controlled trial. *Annals of surgery*. 2010 Nov;252(5):756-64.

[307] Vaziri N, Thuillier R, Favreau FD, Eugene M, Milin S, Chatauret NP, et al. Analysis of machine perfusion benefits in kidney grafts: a preclinical study. *Journal of translational medicine*. 2011;9:15.

[308] Eleftheriadis T, Lawson BR. Toll-like receptors and kidney diseases. *Inflammation & allergy drug targets*. 2009 Jul;8(3):191-201.

[309] Evankovich J, Billiar T, Tsung A. Toll-like receptors in hepatic ischemia/reperfusion and transplantation. *Gastroenterology research and practice*. 2010;2010.

[310] Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Jun 18;279(25):25935-8.

- [311] Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annual review of cell and developmental biology*. 2002;18:575-99.
- [312] Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 2000 May 26;101(5):451-4.
- [313] Bailly-Maitre B, Fondevila C, Kaldas F, Droin N, Luciano F, Ricci JE, et al. Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 Feb 21;103(8):2809-14.
- [314] Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, et al. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *Faseb J*. 2004 Sep;18(12):1401-3.
- [315] Hung CC, Ichimura T, Stevens JL, Bonventre JV. Protection of renal epithelial cells against oxidative injury by endoplasmic reticulum stress preconditioning is mediated by ERK1/2 activation. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Aug 1;278(31):29317-26.
- [316] Pallet N, Bouvier N, Beaune P, Legendre C, Thervet E, Anglicheau D. [Endoplasmic reticulum stress in kidney diseases: a question of life and death?]. *Nephrologie & therapeutique*. 2009 Jun;5(3):173-80.
- [317] Hoyer-Hansen M, Jaattela M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell death and differentiation*. 2007 Sep;14(9):1576-82.
- [318] Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, et al. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *The American journal of pathology*. 2007 Aug;171(2):513-24.
- [319] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008 Jan 11;132(1):27-42.
- [320] Criollo A, Maiuri MC, Tasdemir E, Vitale I, Fiebig AA, Andrews D, et al. Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell death and differentiation*. 2007 May;14(5):1029-39.
- [321] Gozuacik D, Bialik S, Raveh T, Mitou G, Shohat G, Sabanay H, et al. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell death and differentiation*. 2008 Dec;15(12):1875-86.
- [322] Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and cellular biology*. 2006 Dec;26(24):9220-31.
- [323] Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, et al. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell death and differentiation*. 2007 Feb;14(2):230-9.
- [324] Rzymiski T, Milani M, Pike L, Buffa F, Mellor HR, Winchester L, et al. Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene*. 2010 Aug 5;29(31):4424-35.
- [325] Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, et al. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Jan;120(1):127-41.
- [326] Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell death and differentiation*. 2009 Jul;16(7):966-75.
- [327] Salvemini D, Riley DP, Cuzzocrea S. SOD mimetics are coming of age. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 May;1(5):367-74.
- [328] O'Callaghan JM, Knight SR, Morgan RD, Morris PJ. Preservation solutions for static cold storage of kidney allografts: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant*. 2012 Apr;12(4):896-906.

- [329] Thuillier R, Giraud S, Favreau F, Goujon JM, Desurmont T, Eugene M, et al. Improving long-term outcome in allograft transplantation: role of ionic composition and polyethylene glycol. *Transplantation*. 2011 Mar 27;91(6):605-14.
- [330] Thuillier R, Renard C, Rogel-Gaillard C, Demars J, Milan D, Forestier L, et al. Effect of polyethylene glycol-based preservation solutions on graft injury in experimental kidney transplantation. *The British journal of surgery*. 2011 Mar;98(3):368-78.
- [331] t Hart NA, van der Plaats A, Faber A, Leuvenink HG, Olinga P, Wiersema-Buist J, et al. Oxygenation during hypothermic rat liver preservation: an in vitro slice study to demonstrate beneficial or toxic oxygenation effects. *Liver Transpl*. 2005 Nov;11(11):1403-11.

# VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

## A. Communications orales

- ✓ 10<sup>ème</sup> Congrès Société Francophone de Transplantation 2010 :  
V. Mallet, R. Thuillier, M. Eugène, T. Hauet, S. Giraud, Réseau FLIRT. **Modulation de la température de conservation des greffons dans un modèle d'ischémie reperfusion *in vitro*.**
- ✓ 9<sup>ème</sup> Congrès Société Francophone de Transplantation 2009 :  
Présentation de mon projet de thèse sur la « **Modulation des conditions de conservation d'un greffon rénal dans un modèle préclinique** »
- ✓ 3<sup>ème</sup> Rencontre Tours-Poitiers 2010:  
V. Mallet, R. Thuillier, M. Eugène, T. Hauet, S. Giraud, Réseau FLIRT. **Modulation de la température de conservation des greffons dans un modèle d'ischémie reperfusion *in vitro***

## B. Publication

- ✓ R.Thuillier, D. Dutheil, M.T. Ngo Trieu, V. Mallet, G. Allain, M. Rousselot, M. Denizot, J.M. Goujon, F. Zal and T. Hauet. **Supplementation with a new therapeutic oxygen carrier reduces chronic fibrosis and organ dysfunction in kidney static preservation.** *American Journal of Transplantation*; 11: 1845-1860, 2011.
- ✓ V. Mallet, R. Thuillier, D. Dutheil, M. T. Ngo Trieu, P.O. Delpech, M. Denizot, M. Rousselot, F. Zal, J.M. Goujon and T. Hauet. **Dose efficacy and mechanism of the oxygen transporter M101 in organ preservation.** (à soumettre dans *Life Sciences*)

# ANNEXE

# Supplementation With a New Therapeutic Oxygen Carrier Reduces Chronic Fibrosis and Organ Dysfunction in Kidney Static Preservation

R. Thuillier<sup>a,b,g,†</sup>, D. Dutheil<sup>c,†</sup>, M. T. N. Trieu<sup>a</sup>,  
V. Mallet<sup>a,c</sup>, G. Allain<sup>a</sup>, M. Rousselot<sup>c</sup>,  
M. Denizot<sup>e,f</sup>, J.-M. Goujon<sup>a</sup>, F. Zal<sup>c</sup> and  
T. Hauet<sup>a,b,d,g,\*</sup>

<sup>a</sup>Inserm U927; Faculté de Médecine et Pharmacie; Univ Poitiers; Poitiers, F86000, France

<sup>b</sup>CHU de Poitiers, Dept de Biochimie, Poitiers, F86000, France

<sup>c</sup>HEMARINA, Aéroport centre, Biotechnopôle, Morlaix, F29600, France

<sup>d</sup>INRA, Plate-forme IBISA, Unité de Transplantation Expérimentale, GEPA, Département de Génétique Animale, Domaine du Magneraud, Surgères, F17700, France

<sup>e</sup>UMR7144, UPMC Université Paris 06, Equipe Ecophysiologie des Invertébrés Marins aux Milieux Extrêmes, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, F29680, France

<sup>f</sup>UMR7144, CNRS Centre National de la Recherche Scientifique, Equipe Ecophysiologie des Invertébrés Marins aux Milieux Extrêmes, Station biologique de Roscoff, Roscoff, F29680, France

<sup>g</sup>FLIRT : Fédération pour L'étude de l'Ischemie Reperfusion en Transplantation, France

\*Corresponding author: Thierry Hauet,  
t.hauet@chu-poitiers.fr

†Both the authors have equally contributed to this work.

**Static preservation is currently the most widely used organ preservation strategy; however, decreased donor organ quality is impacting outcome negatively. M101 is an O<sub>2</sub> carrier with high-oxygen affinity and the capacity to function at low temperatures. We tested the benefits of M101 both *in vitro*, on cold preserved LLC-PK1, as well as *in vivo*, in a large white pig kidney autotransplantation model. *In vitro*, M101 supplementation reduced cold storage-induced cell death. *In vivo*, early follow-up demonstrated superiority of M101-supplemented solutions, lowering the peak of serum creatinine and increasing the speed of function recovery. On the longer term, supplementation with M101 reduced kidney inflammation levels and maintained structural integrity, particularly with University of Wisconsin (UW). At the end of the 3-month follow-up, M101 supplementation proved beneficial in terms of survival and function, as well as slowing the advance of interstitial fibrosis. We show that addition of M101 to classic organ preservation protocols with UW and**

**Histidine–Tryptophane–Ketoglutarate, the two most widely used solutions worldwide in kidney preservation, provides significant benefits to grafts, both on early function recovery and outcome. Simple supplementation of the solution with M101 is easily translatable to the clinic and shows promises in terms of outcome.**

**Key words:** Graft preservation, ischemia reperfusion injury, kidney transplantation, oxygen, oxygen transporters

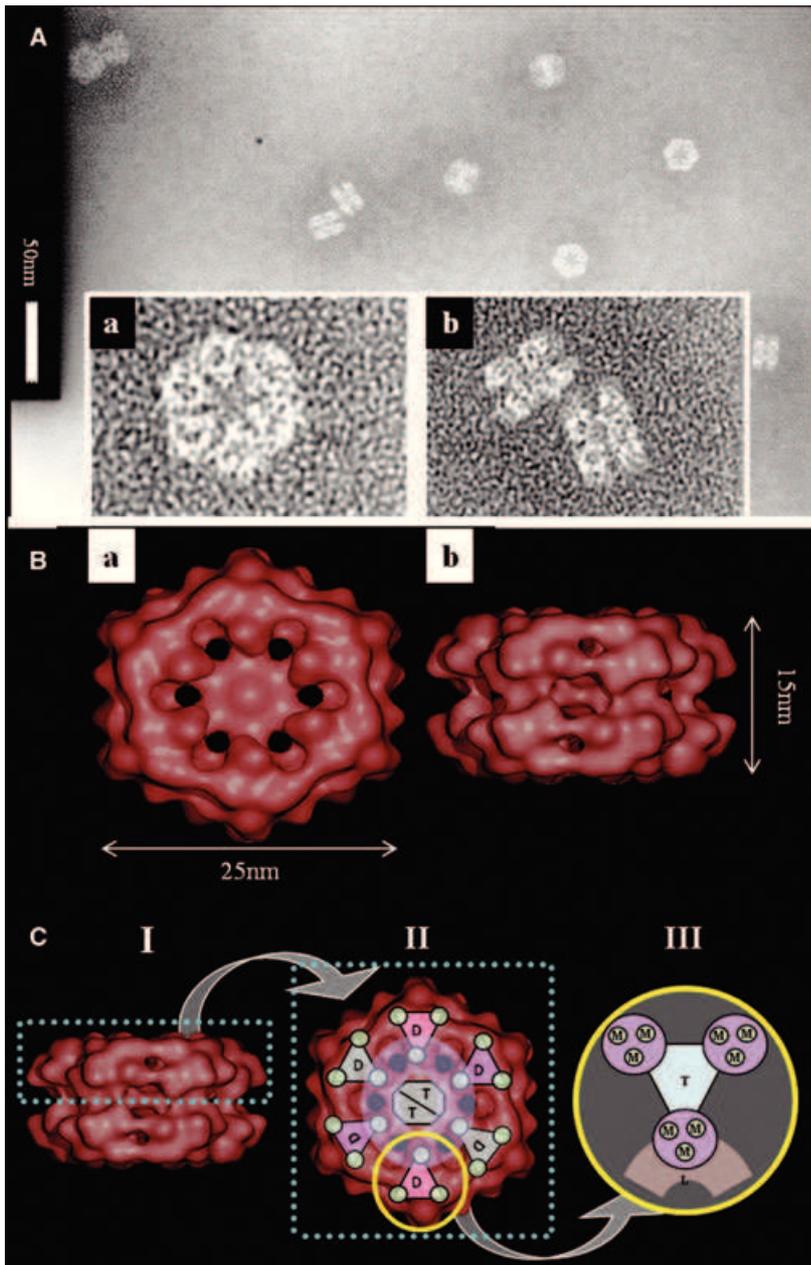
**Abbreviations:** ATP, adenosine 5'-triphosphate; CS, cold storage; HBL-Hb, hexagonal-bilayer hemoglobin; HBOC, hemoglobin-based oxygen carrier; HTK, histidine tryptophane ketoglutarate; IFTA, interstitial fibrosis and tubular atrophy; IRI, ischemia reperfusion injury; LDH, lactate dehydrogenase; M101, hemarina-M101; NBT, nitroblue tetrazolium; PFCs, perfluorocarbons; SOD, superoxide dismutase; UW, University of Wisconsin.

**Received 06 December 2010, revised 29 April 2011 and accepted for publication 30 April 2011**

## Introduction

Kidney transplantation remains the therapy of choice for end stage renal diseases. Ischemia reperfusion injury (IRI), inherent to transplantation, strongly correlates with delayed graft function (1,2), chronic graft failure and late graft loss (3–5). IRI is a complex process involving oxidative stress, mitochondrial uncoupling (6,7) and the coagulation cascade (8,9). It also activates innate immune response independently of allogenicity (10), with intense immune cells invasion (11,12). Hence, a better management of organ preservation could limit IRI, improving graft quality and outcome substantially.

Currently, hypothermic cold storage (CS) is the main strategy to minimize ischemic injuries (1,13). CS preservation is based on metabolism reduction with temperature; however, even slow metabolism requires O<sub>2</sub>. Hence, the concept of introducing O<sub>2</sub> during CS is growing. Different approaches are developed: persufflation by retrograde venous application of O<sub>2</sub>, the two-layer method with



**Figure 1: Structure and conformation of *Arenicola marina* hemoglobin.** (A) Micrographs obtained by transmission electron microscopy (19,20). (B) Three-dimensional reconstruction obtained by frozen electron microscopy (17). Detailed are a face view (a) and a profile view (b) of the molecule. (C) Model of 3D conformation of *Arenicola marina* hemoglobin (20). *I*: Hexagonal bilayer of the molecule. *II*: Face view of hexagonal layer with dodecameric subunits (D) and trimer subunits (T). *III*: Dodecamer with monomers (M), trimer (T) and linkers (L). Conformation is a regular hexagonal bilayer, each consisting of a central part consisting of 2 trimers of globin (T) and a peripheral part including 6 dodecamers (D), appearing as equilateral triangles with 3 monomers of globin (M) noncovalently bonded at each edge and a trimer of globin (T) at the center of the triangle. Dodecamers are bonded with 3.5 nonglobin chains (L) ensuring conformation and stability.

perfluorocarbons (PFC) or gaseous oxygenation during CS (14–16). However, their effectiveness remains unclear and translation to the clinic could be difficult considering the important changes in protocol and equipment.

Herein, we investigate a new therapeutic molecule, Hemarina-M101 (M101) (Figure 1A), a respiratory pigment from a marine invertebrate, *Arenicola marina*, developed as an additive to preservation solutions (18–20). M101 is a giant O<sub>2</sub> carrier corresponding to an extracellular hexagonal-bilayer hemoglobin (HBL-Hb). HBL-Hbs are naturally extracellular heminic respiratory pigments of high molecular weight (~3600 kDa), made of complexes globin

and nonglobin linker chains (Figure 1B). Such large complexes represent a summit of complexity for oxygen-binding heme proteins with a remarkable hierarchical organization, each globin chain surrounding and protecting its own heme group, a protoporphyrin ring with an iron atom in center reversibly binding one O<sub>2</sub> molecule. This confers a high O<sub>2</sub> binding capacity: M101 can carry up to 156 molecules of O<sub>2</sub> (Figure 1C). M101 possesses other advantages: O<sub>2</sub> is released against a gradient in the absence of allosteric effectors, providing the environment with just the right amount of O<sub>2</sub>; it functions in a large range of temperature (from 4°C to 37°C) (21,22) and it possesses intrinsic superoxide dismutase (SOD)-like activity linked to

Cu/Zn metals (18), all invaluable in IRI (23,24). M101 is also fully identified from gene to protein quaternary structure (25,26). Furthermore, M101 is nonimmunogenic (18). These suggest an important potential towards improving organ preservation by CS.

The concept of supplementing classical organ preservation protocols is rapidly gaining interest (9,27–32). Simple addition of a molecule to an established protocol presents high potential for translation to clinic, compared to more cumbersome approaches of changing solutions and/or machines. We tested the benefits of M101 supplementation *in vitro* in cold stored cultured cells using a range of solutions used in the clinic, then *in vivo* with the two most widely used static cold preservation solutions (90% of the world’s market) (33): University of Wisconsin (UW) and Histidine Tryptophane Ketoglutarate (HTK). We used a pig model of kidney auto-transplantation, as this species presents an elaborate system of interlobular and segmental arteries to supply the numerous kidney lobes, a char-

acteristic shared with humans and higher mammal but absent in rodents or dogs (6), making porcine models very relevant to mimic human conditions (34,35).

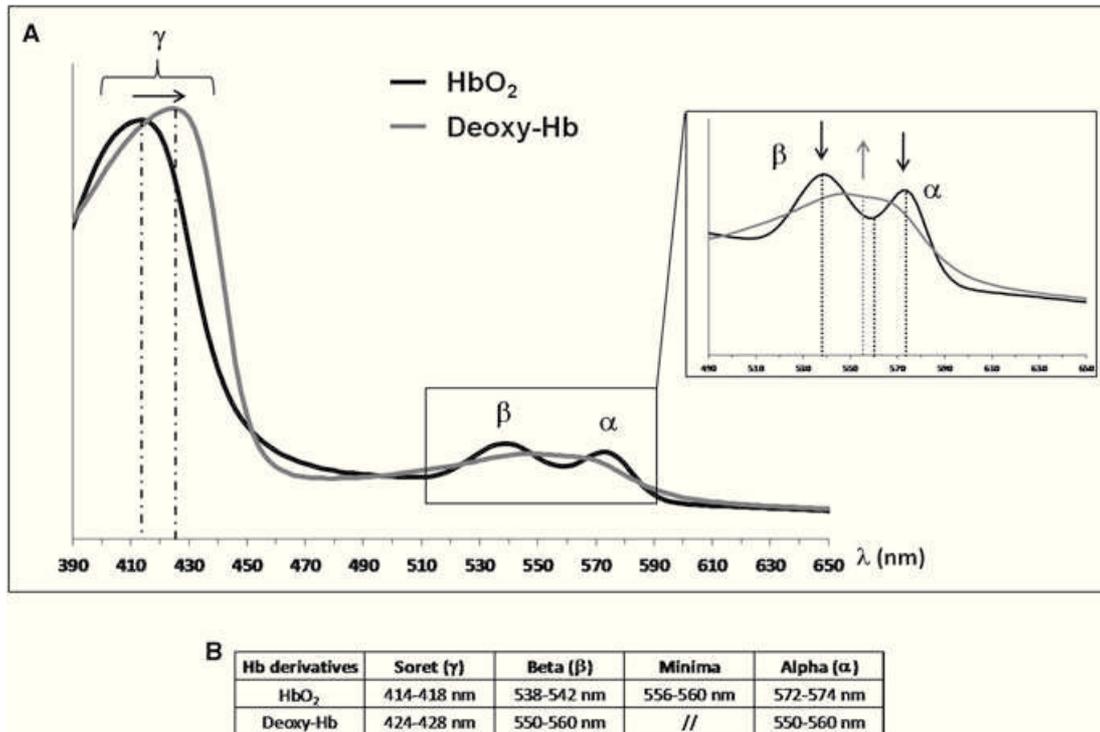
**Methods**

**Reagents**

Unless specified, all reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France).

**M101 production and utilization in preservation solutions**

M101 (HEMO<sub>2</sub>life, Hemarina SA, Morlaix, Brittany, France) was manufactured using standard procedures for the extraction of biologics conformed to the specifications of the health authorities. The purified protein is frozen at -80°C then thawed to 4°C before experiment and diluted in a preservation solution: UW (ViaSpan, Bristol-Myers-Squibb, Braine-l’Alleud, Belgium), HTK (Custodiol, Essential Pharmaceuticals, Newton, PA, USA), IGL (IGL-1, IGL Group, Lissieu, France), Celsior (Celsior, Genzyme, Saint-Germain-en-Laye, France), Ringer Lactate (RL, Aguetant, France) or Perfadex (Perfadex, Vitrolife, Sweden).



**Figure 2: Spectral characteristics of oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin derivatives of *Arenicola marina* hemoglobin.** M101 is a hemic respiratory pigment. The heme pocket of hemoglobin molecules is the site of many dynamics interactions involving O<sub>2</sub> binding (36). If the iron atom of the hemoglobin molecule is bounded to O<sub>2</sub>, hemoglobin is called oxy-hemoglobin or HbO<sub>2</sub>. If the iron atom of the hemoglobin molecule is bounded to nothing, hemoglobin is called deoxy-hemoglobin or deoxy-Hb. All hemoglobin derivatives differ from each other by their light-absorption spectra, which enable to identify the hemoglobin derivatives from its spectral profile. Spectral signature of hemoglobin derivatives of *Arenicola marina* has widely been studied (37,38). The absorption is at its highest for the so-called Soret band, at 416 nm for HbO<sub>2</sub> and 426 nm for deoxy-Hb. It then drops off steeply until approximately 510 nm, where it picks up slightly again at two typical peaks (Beta and Alpha bands) for HbO<sub>2</sub> at 540 nm and 573 nm, respectively, and at a single larger band around 555 nm for deoxy-Hb. (A) Light-absorption spectra of HbO<sub>2</sub> (black line) and deoxy-Hb (grey line) over the 390–650 nm range. (B) Maxima and minima absorption of Soret, Beta and Alpha bands for HbO<sub>2</sub> and deoxy-Hb derivatives.  $\gamma$  = Soret band;  $\beta$  = Beta band;  $\alpha$  = Alpha band.

**M101 functional analyses**

**Oxygen binding:** M101 was supplemented (1 g/L) to UW. Either N<sub>2</sub> gas or LLC-PK1 cells incorporated to the preparation was used to deoxygenate the solution then both preparations were hermetically sealed. The functionality of M101 was followed by spectrophotometry (36) allowing characterization of oxyhemoglobin (HbO<sub>2</sub>) and deoxyhemoglobin (deoxy-Hb; Figure 2). Absorption spectra were recorded over the 390–650 nm range (UVmc2, SAFAS, Monaco). Dissolved O<sub>2</sub> (dO<sub>2</sub>) was monitored using an O<sub>2</sub> sensor (Metler Toledo, France).

**SOD activity:** M101 SOD activity was evaluated by nitroblue tetrazolium (NBT) assay modified by Oberley and Spitz (39). Briefly, superoxide was generated by xanthine and xanthine oxidase in presence of catalase and DE-TAPAC. Reduction of NBT was detected by spectrophotometry at 560 nm. KCN was added 1 h at 4°C before starting the experiment to deactivate Cu/Zn-SOD. A Cu/Zn-SOD from bovine erythrocytes was used as a control (Calbiochem).

Decreased absorbance indicates increased scavenging activity. The percentage inhibition of superoxide anion generation was calculated using:  $[(A_0 - A_1)/A_0 \times 100]$ , where A<sub>0</sub> is the absorbance of control and A<sub>1</sub> is the absorbance of samples.

**M101 structural analyses**

M101 was supplemented (1 g/L) to solutions, its structure was followed over time by isocratic gel filtration at room temperature with an autosampler set at 4°C employing an HPLC system (Dionex, France) and a 1 cm × 30 cm Superose 6C column (fractional range 5–5000 kDa, GE Healthcare, Vélizy Cedex, France). Flow rate was 0.5 mL/min and the eluate was monitored with a photodiode array detector over the range 250–700 nm. The elution curves were acquired and processed using the Chromeleon software (Dionex, Voisins le Bretonneux, France).

The dissociation curve was obtained normalizing the area of M101 peak at time t (A<sub>t</sub>) with the area of M101 peak at time 0 (A<sub>0</sub>) and plotted versus time. The GraphPad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used to fit the curve to linear ( $f(A_t/A_0) = -k_d t, T_{1/2} = 1/(2k_d)$ ) or mono-exponential ( $f(A_t/A_0) = a \times \exp[-k_d t]$ ) profile. The fit acceptability was judged with the best-correlation coefficient. The dissociation constant (k<sub>d</sub>) and half-life (T<sub>1/2</sub>) were deduced from the best-fitted curve: linear or mono-exponential.

**Cell cold-storage experiments**

Porcine proximal tubular cell line LLC-PK1 (CL-101, ATCC, LGC Standards, France) were cultured as previously described (40). Cold ischemia injury was simulated by storage of cell monolayer at 4°C under room atmosphere in a preservation solution (UW, HTK, IGL, Celsior, RL or Perfadex) supplemented or not with M101.

Assays were: (1) *Necrosis*: Lactate dehydrogenase (LDH) release was tested using *In Vitro* Toxicology Assay Kit; (2) *Apoptosis*: Caspase-3 activity was determined using Caspase-3 Fluorometric Assay kit (R&D Systems, Lyon, France); (3) *Viability*: Metabolic activity was determined by MTT assay and (4) *Energetic content*: Intracellular ATP was determined using Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay Kit. Kits were used following the manufacturer's guidelines. Reactions were quantified with a multiplate reader (Victor3, Perkin-Elmer, Waltham, MA).

For each parameter, results were expressed as percentages of measured values in cold-preserved cells versus measured value in cells before injury (control).

**In vivo surgical procedures and experimental groups**

Large white male pigs (INRA/GEPA, Surgères, France) were prepared as previously described (4) in accordance with French guidelines of the Ethical Committee for Human and Animal Studies. The right kidney was collected, cold flushed and preserved for 24 h before transplantation, a time chosen because it is slightly longer to the cold ischemia time noticed by United Network for Organ Sharing for renal allografts (19.6 ± 8.4 h in 2000) (41). The left kidney was nephrectomized to mimic nephron mass in transplanted situation. Surgical teams were blinded to protocols. Time for vascular anastomoses was 30 ± 5 min, blood loss was minimal and no postoperative complication was observed. Four groups were studied: (1) UW: organ preservation with UW; (2) UW + M101: UW supplemented with 5 g/L M101; (3) HTK: HTK; (4) HTK + M101: HTK supplemented with 5 g/L M101. Controls were sham-operated animals.

**Functional parameters**

Pigs were placed in a metabolic cage for diuresis (mL/24 h), creatinemia (μmol/L), fraction of excreted sodium (%) and proteinuria (g/24 h) measurements as previously described (3–5).

**Morphological studies**

Biopsies were collected 7, 14 days and 1 month after reperfusion. Brush border loss and endoluminal detachment were assessed using a semiquantitative 6-point scale: 0, no abnormality; 1, mild lesions affecting less than 25% of kidney samples; 2, lesions affecting 25–50% of kidney samples; 3, lesions affecting 51–75% of kidney samples; 4, lesions affecting more than 75% of kidney samples and 5, extensive necrosis and renal damage (42).

Quantitative determination of interstitial invasion was adapted from Banff classification (43): 0, no mononuclear inflammatory cell in tubules; 1, Foci with 1 to 4 mononuclear cells per tubular cross-section or ten tubular cells; 2, Foci with 5–10 mononuclear cells per tubular cross-section and 3, Foci with more than 10 mononuclear cells per tubular cross-section.

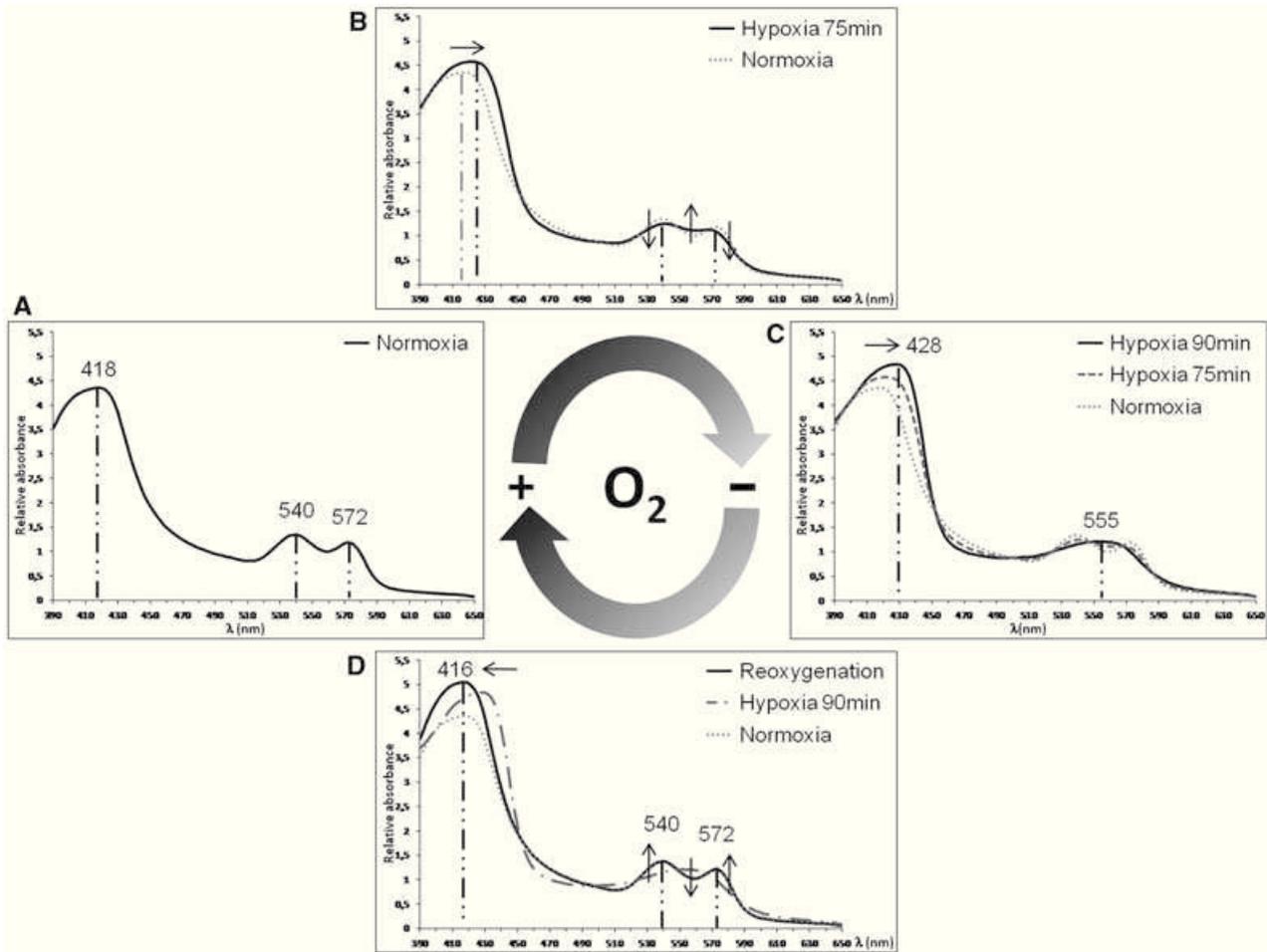
Tubulointerstitial fibrosis was determined using Picro Sirius staining (44).

Immunohistochemistry was used for ED1+ and CD3+ cell invasion measurement (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA). Quantitative evaluation was performed on 5–10 high-powered fields (200×).

**Statistical methods:** Means ± SEM or SD are shown. *In vitro* data were compared using Dunett's test. For *in vivo* data, the Mann-Whitney U test was used for comparisons between 2 groups (only UW vs. UW + M101 and HTK vs. HTK + M101 comparisons were conducted). Correlations were measured with Spearman's test and dependence of M101 effect on the solution used was tested using a two-way ANOVA. SPSS software (IBM, Armonk, NY, USA) and GraphPad software (GraphP) were used for statistical analyses. Significance was accepted for p < 0.050.

**Results****M101 functionality**

**O<sub>2</sub> binding:** M101 in solution with UW was deoxygenated by N<sub>2</sub> flushing or by addition of LLC-PK1 cells. Figure 3 shows data obtained with cells since both set of experiment gave the same results. Under room atmospheric condition, M101 dissolved in UW was oxygenated (HbO<sub>2</sub>) as shown by absorption spectrum (Figure 3A, normoxia). Then, the preparation was hermetically sealed and O<sub>2</sub> consumed by cells (hypoxia). After 75 min of hypoxia, M101 spectrum switched progressively towards deoxy-Hb



**Figure 3: Spectral curves of M101 over time on the 390–650 nm range.** M101 was supplemented to UW at a concentration of 1 g/L and LLC-PK1 cells were added to the preparation. Preparation was kept at 4°C and was hermetically sealed to induce hypoxia. Spectrum of M101 was followed over time. (A) Spectrum under room atmospheric condition (normoxia). (B) Spectra after 75 min of hypoxia (—) and under normoxia (---). (C) Spectra after 90 min of hypoxia (—), 75 min of hypoxia (---) and under normoxia (---). (D) Spectra after reoxygenation (—), 90 min of hypoxia (---) and under normoxia (---). 416, 418, 428 nm: maxima of Soret band ( $\gamma$ ); 540 nm: maxima of Beta band ( $\beta$ ); 572 nm: maxima of Alpha band ( $\alpha$ ); 555 nm: maxima of  $\beta/\alpha$  band.

conformation with a shift of Soret band, a decrease of Beta and Alpha bands and an increase of absorbance around 555 nm (Figure 3B). Complete deoxygenation appeared after 90 min of hypoxia (Figure 3C): spectrum showed Soret with a maximum at 428 nm and a plateau with a maximum at 555 nm, the characteristic spectrum of deoxy-Hb derivative. This state was reversible as oxygenation of the preparation resulted in the initial spectrum of M101 (Figure 3D). The measure of dO<sub>2</sub> correlated with the light-absorption spectra (data not shown).

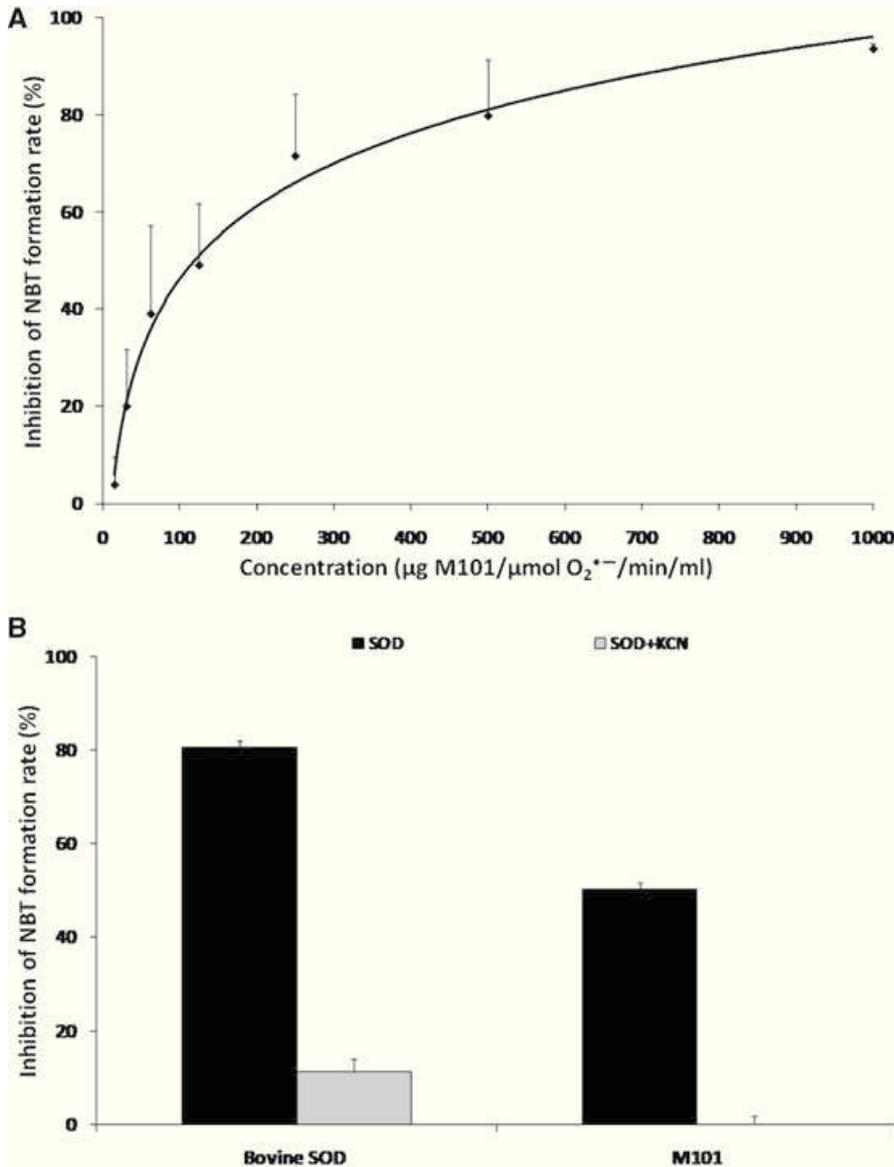
**SOD activity:** M101 was an effective antioxidant with total inhibition of NBT formation (Figure 4A, 93.5 ± 1.1%). This activity is relative to a Cu/Zn-SOD since KCN, a specific inhibitor of Cu/Zn-SOD enzymatic activity, totally inhibited the scavenging ability of M101 (Figure 4B).

**M101 is stable in commercial preservation solutions**

The stability of M101 was assayed in UW, HTK, IGL, Cel-sior, RL and Perfadex. Dissociation constant and half-life show that M101 is stable for long periods of time (Table 1).

**M101 protects cells in vitro against cold preservation lesions**

Conservation of kidney epithelial cells in the gold standard solution, UW, was very deleterious (Figures 5–8). Assessment of cell viability by LDH release demonstrated a loss of cell viability after 12 h of CS (Figure 5A). No significant activation of caspase-3 was detected (Figure 5B). Metabolic activity (Figure 5C) and ATP content (Figure 5D) were reduced concomitantly to LDH release.



**Figure 4: Inhibitory effect of M101 on the reduction of nitroblue tetrazolium by superoxide anion radical generated by the hypoxanthine-xanthine oxidase system.** (A) Percentage of inhibition of NBT formation with an increase of M101 under a constant superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ) generation. (B) Percentage of inhibition of NBT formation with M101 or bovine SOD from erythrocyte used as control. Total SOD activity (SOD, black bars) was compared to specific Cu/Zn-SOD activity determined in presence of KCN (SOD + KCN, light gray bars). Shown are mean  $\pm$  SD; n = 3.

M101 was protective against these events (Figure 6): as little as 0.312 g/L was sufficient to significantly improve structural and metabolic integrity and energetic content after 24 h. Total protection was reached at 1.25 g/L of M101 (LDH release:  $6 \pm 8\%$ ; MTT test:  $71 \pm 13\%$ ; ATP content:  $78 \pm 23\%$ ). Cellular energetic content was upregu-

lated with concentrations higher than 2.5 g/L (ATP content  $>120\%$  compared to control). M101 also protected renal cells in a time and concentration dependent manners (Figure 7): cellular integrity was totally preserved (LDH release  $< 20\%$ ) for 24 h at 1.25 g/L, 36 h at 2.5 g/L, 48 h at 5 g/L and 72 h at 10 g/L.

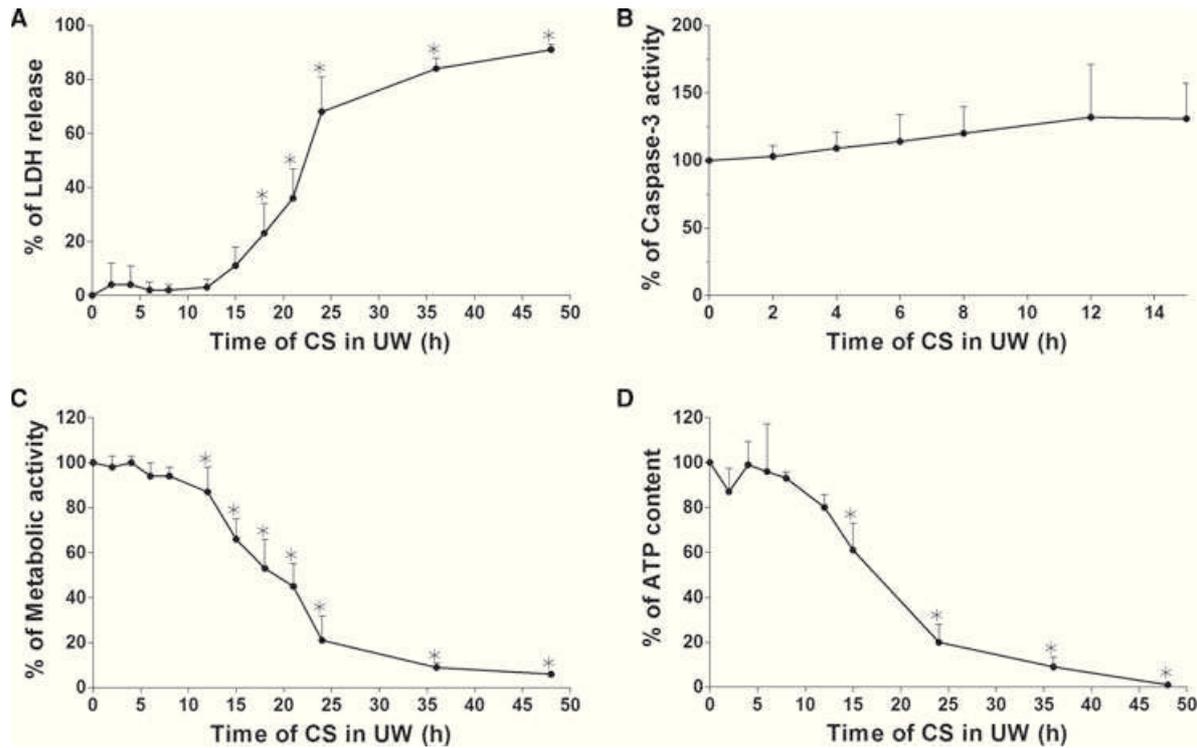
**Table 1: M101 Stability in commercial preservation solution**

Solution	M101 Stability						
	Buffer <sup>2</sup>	UW <sup>2</sup>	HTK <sup>1</sup>	IGL <sup>2</sup>	Celsior <sup>2</sup>	RL <sup>1</sup>	Perfadex <sup>1</sup>
$k_d$ ( $h^{-1}$ )	0.00015	0.00017	0.00171	0.00107	0.00056	0.00140	0.00036
$T_{1/2}$ (h)	3333	2941	292	467	893	357	1389

$k_d$  = dissociation constant;  $T_{1/2}$  = half-life.

<sup>1</sup>Stability of M101 was assayed for 24 h at 4°C in different commercial solutions in comparison with the conditioning buffer (Buffer).

<sup>2</sup>Stability of M101 was assayed for 48 h at 4°C in different commercial solutions in comparison with the conditioning buffer (Buffer).



**Figure 5: Cold-stored kidney epithelial cells preserved in UW for 48 h.** LLC-PK1 cells were stored at 4°C for up to 48 h in UW. Cell damage was assayed by percentages of LDH release (A), caspase-3 activity (B), metabolic activity (C) and cellular ATP content (D). CS = cold storage. Shown are mean ± SD. Statistics: \* = p < 0.05 versus time 0; n = 3.

Experiments were reproduced with other solutions (Figure 8): RL (Figure 8A), Perfadex (Figure 8B), HTK (Figure 8C), IGL (Figure 8D) and Celsior (Figure 8E). As for UW, conservation in these solutions induced cell structural and/or functional damages (respectively, Figures 8a and b). Two kinds of results were obtained: (1) similarly to UW, cells cold-stored in RL and, in a lesser extent, in Perfadex presented both structural and functional injuries; (2) cells cold-stored in HTK, IGL or Celsior presented only functional injuries. In every solution, M101 supplementation protected both cell integrity and cell functionality (LDH release <20% in all conditions and MTT test: 50–100%).

**In vivo kidney graft function recovery is faster with M101**

Pigs transplanted with UW + M101-preserved kidney resumed urine production at day 1 (versus day 2 for UW), and had a faster recovery to stabilized urine production levels by day 4 (Figure 9A, p = 0.016). HTK groups had equivalent diuresis recoveries (Figure 9B). Serum creatinine levels in UW group showed high levels peaking at day 3 and slowly decreasing afterwards. UW + M101 animals showed significantly lower levels peaking at day 1 and recovered pre-transplant levels by day 7 (p = 0.009 at all time points, Figure 9C). HTK animals showed a high serum creatinine peak at day 1, followed by a slow recovery remaining above

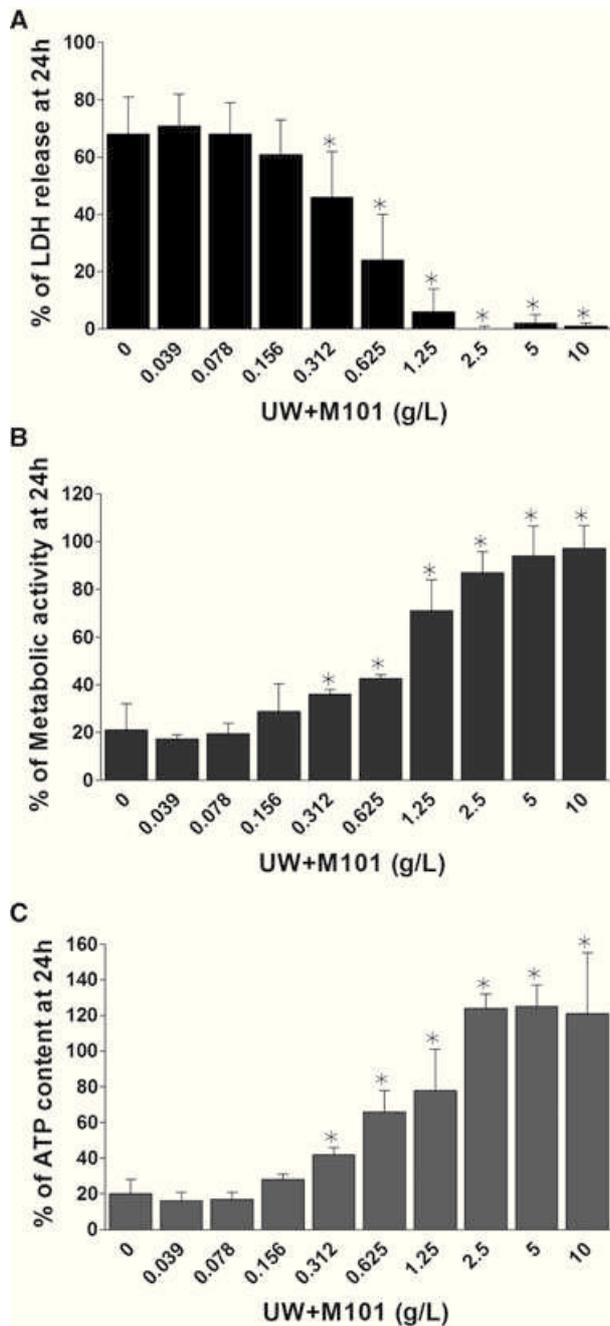
pretransplant levels while HTK + M101 animals had a significantly lower peak at day 1 (p = 0.009) and a faster recovery to pretransplant level by day 11 (Figure 9D). Sodium reabsorption measurements showed significantly superior performance in M101 preserved kidneys compared to solution alone, confirming better recovery (Figures 9E and F).

**Tissue integrity is better preserved in M101 grafts**

Evaluation of brush border loss and cell detachment, typical IRI tubular lesions, revealed important damage in UW grafts at days 7 and 14, stabilizing at month 1 (Figure 10; Table 2, top panel). UW + M101 kidneys showed less extended lesions. HTK groups showed a similar trend towards amelioration of histological lesions by M101.

**Inflammation is less severe in M101 kidneys**

There was an important immune response development in UW grafts throughout the duration of the follow-up (Table 2, middle–bottom panel). Kidneys preserved in UW + M101 showed little immune infiltration early on, and reduced signs of inflammation later. HTK groups both showed low-level infiltration. At 3 months, invasion of both innate (ED1+) and adaptive (CD3+) immune cells revealed decreased levels of invasion in M101 preserved kidneys compared to the solution alone.



**Figure 6: Cold-stored kidney epithelial cells preserved in UW supplemented with M101 for 24 h.** LLC-PK1 cells were stored at 4°C for 24 h in UW supplemented with M101 in concentrations ranging from 0 to 10 g/L. Cell damage was assayed by percentages of LDH release (A), metabolic activity (B) and cellular ATP content (D). Shown are mean ± SD. Statistics: \* = p < 0.05 versus UW alone; n = 3.

**Outcome is improved by M101 supplementation**

Pigs were euthanized at 3 months, time at which we previously demonstrated development of chronic fibrosis in this model (Figure 11) (45,46). Development of interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) in UW grafts was extensive (23%), while M101 supplementation significantly reduced it (11%, p = 0.049; Figure 11E). HTK kidneys also demonstrated important IFTA development (25%). Here also, addition of M101 significantly reduced damage development (10%, p = 0.038).

Histological damage was associated with chronic loss of function, as both HTK and UW groups showed high serum creatinine (Figure 11F) and proteinuria (Figure 11G) levels. For both solutions, M101 supplementation significantly reduced these levels.

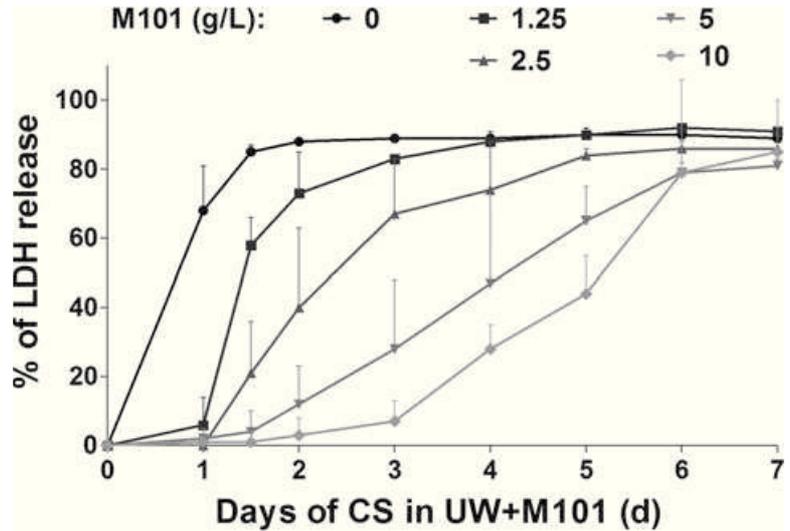
**M101 supplementation correlates with better early and 3-month outcomes**

Further statistical analysis showed that M101 supplementation was negatively correlated with creatinine levels at day 3 (R<sup>2</sup> = 0.75, p = 0.0001) and sodium excretion levels at day 3 (R<sup>2</sup> = 0.74, p = 0.0001). Moreover, we determined that M101 supplementation was also negatively correlated with chronic outcome (3 months): creatinine (R<sup>2</sup> = 0.75, p = 0.0001), proteinuria (R<sup>2</sup> = 0.55, p = 0.013) and fibrosis (R<sup>2</sup> = 0.78, p = 0.0001). Two-way ANOVA revealed that there was an interaction between M101 and the solution used for acute outcome: creatinemia (p = 0.001) and sodium reabsorption (p = 0.04) at day 3; while chronic M101 effects at 3 months were independent of the solution used (data not shown).

**Discussion**

Herein, we describe the benefits of M101 supplementation on cold stored cells *in vitro* and on kidney grafts stored with either UW or HTK. M101 supplementation increased cell resistance to IRI and correlated with improved early function recovery and better long-term outcome with less chronic fibrosis and amelioration of function.

M101 is a new therapeutic molecule, an extracellular respiratory pigment from marine organism, developed as an additive to preservation solutions. This O<sub>2</sub> carrier has peculiar assets for organ preservation such as high oxygen affinity, ability to function at low temperatures and anti-oxidative activity. We demonstrated the oxygenation ability of M101 in CS conditions. O<sub>2</sub> binding and release occurs passively in a simple O<sub>2</sub> gradient and in absence of allosteric effector. M101 is characterized by a P<sub>50</sub>, corresponding to 50% of the O<sub>2</sub> saturation. When the PO<sub>2</sub> is below the P<sub>50</sub>, oxygen is released passively from M101 and consumed by cells or tissues. This is a dynamic equilibrium process dependant on cellular needs, when a O<sub>2</sub> site becomes free, it will be reused by a new O<sub>2</sub> molecule. We also confirmed that this



**Figure 7: Cold-stored kidney epithelial cells preserved in UW supplemented with M101 up to 7 days.** LLC-PK1 were stored at 4°C up to 7 days in UW supplemented with M101 in concentrations ranging from 0 to 10 g/L. Cell damage was assayed by percentage of LDH release. CS = cold storage. Shown are mean ± SD; n = 3.

molecule possesses a Cu/Zn-SOD activity, which is of high value in the context of IRI (18,23,24).

*In vitro*, progressive CS causes a significant and progressive (1) increase in cell LDH release, (2) reduction in metabolic activity and (3) reduction in energetic content. Twenty-four hours of CS resulted in almost complete loss of structural viability, functional viability and energetic content. The majority of cell death was likely due to necrosis, as shown by LDH test, rather than apoptosis since caspase-3 activity did not change. M101 protected renal cells in a time- and dose-dependent manner, independently of the solution used. LDH release in HTK, IGL and Cel-sior was at low levels without M101 so the addition of M101 had no additional effect on this parameter. The benefit of M101 is more evident by MTT assay, which is in accordance to a study showing superiority of MTT assay sensitivity over LDH release assay on the evaluation of metabolic activity (47).

M101 supplementation increased cellular ATP content, reflecting superior maintenance of energetic metabolism, likely decreasing the need to switch from mitochondrial respiration to anaerobic glycolysis and protecting the mitochondria. Maintenance of high ATP levels during preservation by M101 may also benefit the restoration of energy homeostasis upon reperfusion due to less metabolic stress on oxidative pathways.

*In vitro* results lead us to adopt 5 g/L *in vivo*, allowing for possible discrepancies between *in vitro* 2D culture and *in vivo* 3D tissue. In the later setting, we characterized the effects of M101 supplementation in a porcine autologous transplantation model particularly well adapted for studying IRI, the target of M101. An allograft setting may have biased the findings, for instance with side effects from immunosuppression.

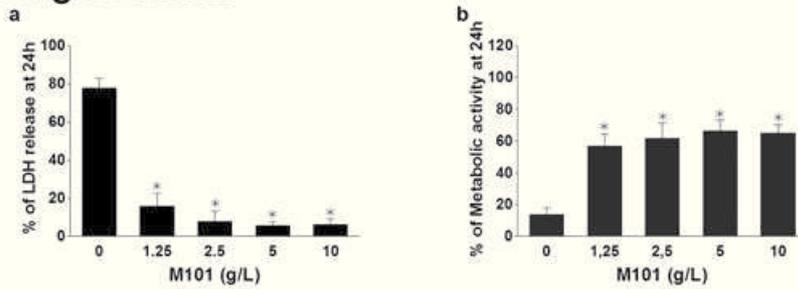
We preserved kidneys with either HTK or UW, the most widely used solutions in the world (Eurotransplant and UNOS data [14]), for 24 h. As current preservation time average 18 h, with a trend towards increasing, our choice of 24 h appears justified. Furthermore, 24 h provides the amount of IR damage adapted for a proof of concept. While we did not evaluate *in vivo* benefits on shorter preservation times, demonstration of M101 benefits on shorter preservation time are likely, considering the impact of the molecule *in vivo* after 24 h preservation and the protection demonstrated on *in vitro* studies for shorter preservation times.

The differences between UW and HTK have been the object of several publications and since this study was not designed to compare these solutions, we will focus our discussion on the impact of M101 on their performance separately. Use of M101 was correlated with improved early recovery of function, particularly in grafts preserved with UW. Since the intensity of IRI is directly correlated to the occurrence of delayed graft function in patients (1,2), it is expected that M101 will be efficient in reducing IRI *in vivo* in preserved kidney graft.

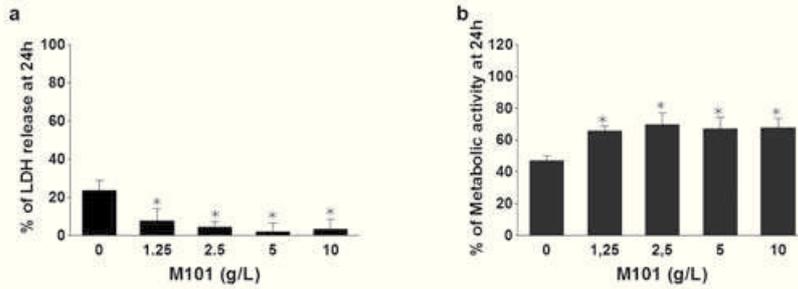
Histologically, IRI is characterized by extensive tubular damage, such as loss of brush border, and intense immune cell infiltration (11,12). Indeed, IRI was shown to be capable to induce inflammatory processes in an antigen-independent fashion (10). M101 supplementation was effective in protecting against these damages early on, likely through direct cell protection as observed *in vitro*. As stressed cells produce danger signals inducing inflammation and cell invasion (48), reduction of these mechanisms by M101 supplementation was likely due to better cell protection.

IFTA is the pivotal marker of chronic loss of graft function, and ultimately loss of the grafts itself (49). We

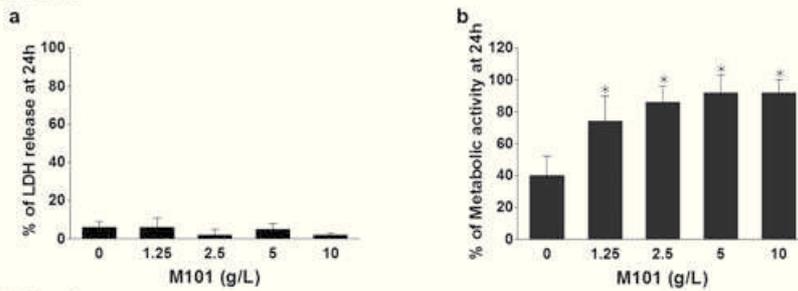
**A - Ringer Lactate**



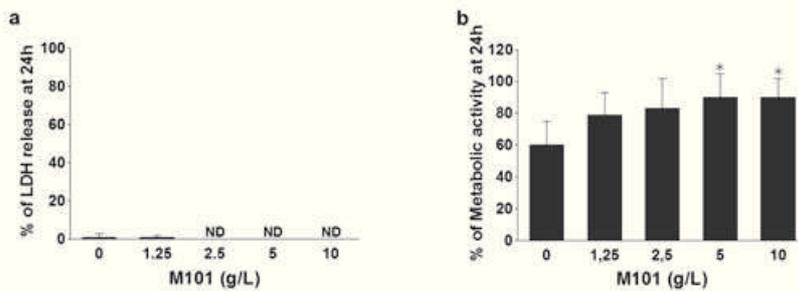
**B - Perfadex**



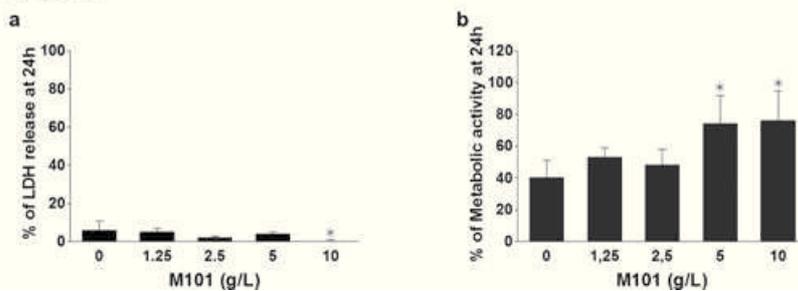
**C - HTK**



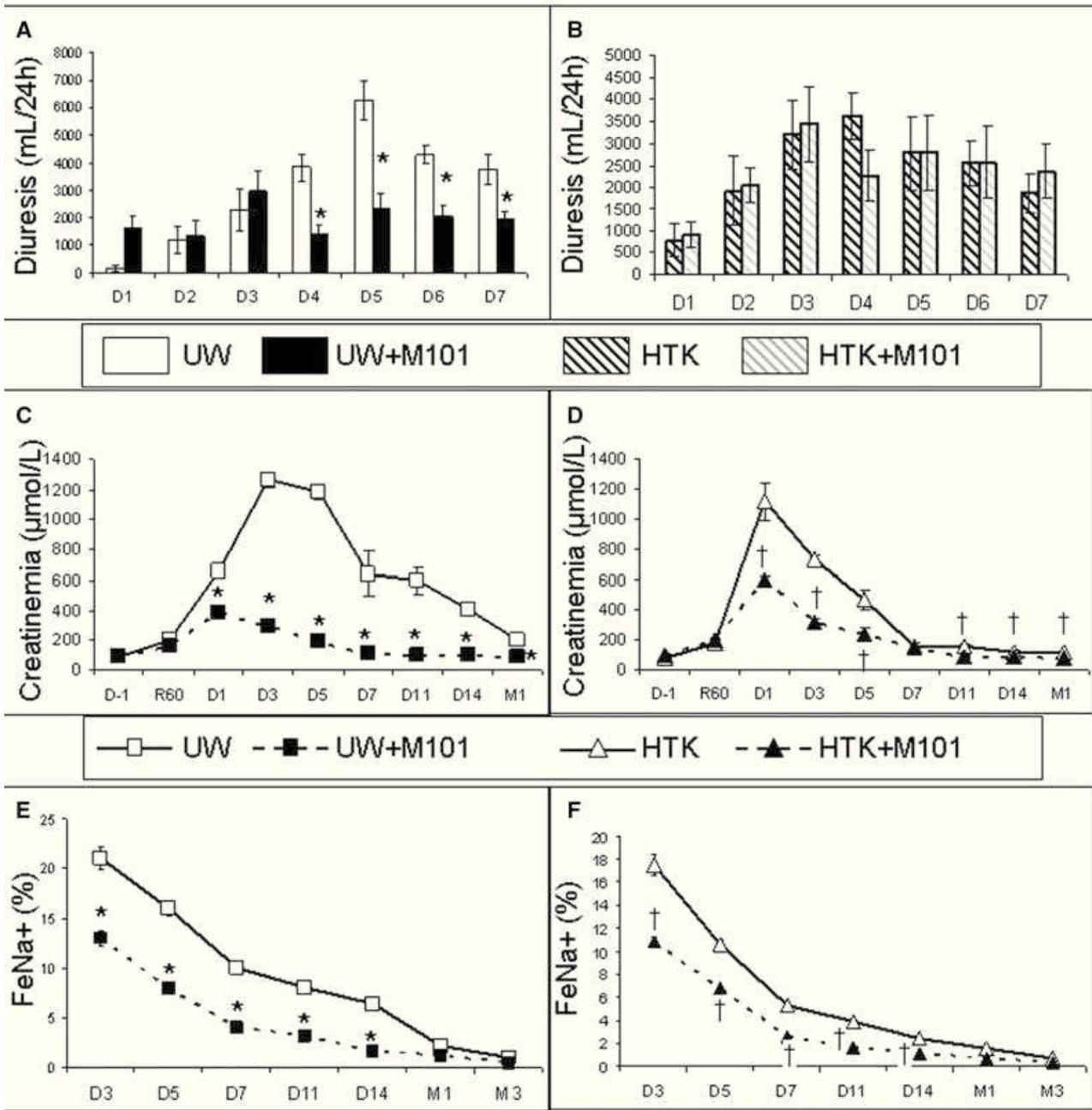
**D - IGL-1**



**E - Celsior**



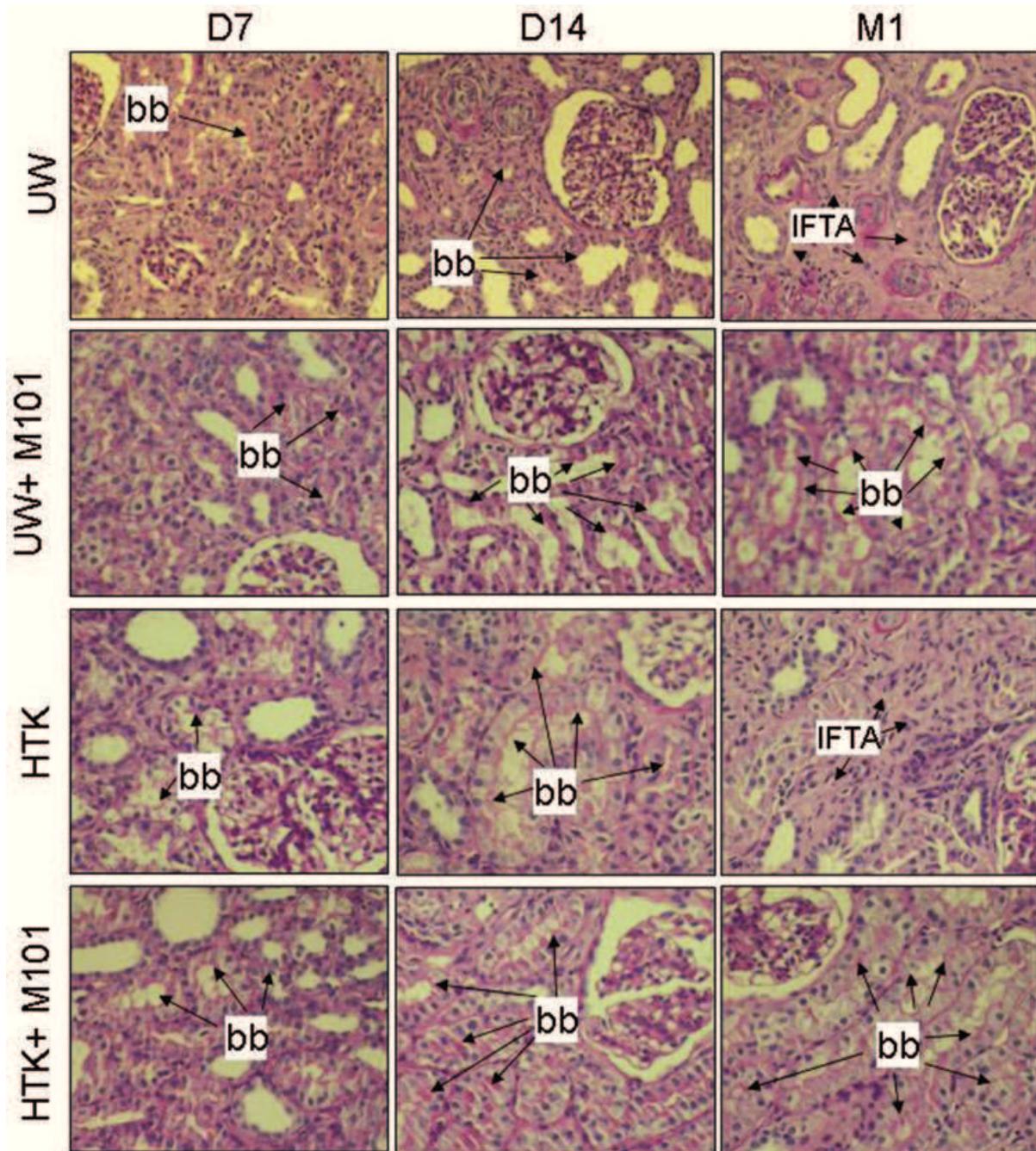
**Figure 8: Cold-stored kidney epithelial cells preserved for 24 h in different commercial preservation solutions supplemented with M101.** LLC-PK1 cells were stored at 4°C for 24 h in Ringer Lactate (A), Perfadex (B), HTK (C), IGL-1 (D) and Celsior (E), supplemented with M101 in concentrations ranging from 0 to 10 g/L. Cell damage was assayed by percentages of LDH release (a) and metabolic activity (b). Shown are mean ± SD. ND = not detected. Statistics: \* = p < 0.05 versus cells cold-stored in the preservation solution alone; n = 3.



**Figure 9: Kidney function following reperfusion.** Porcine kidneys were cold-flushed and preserved for 24 h with UW (A-C-E) or HTK (B-D-F) supplemented with M101 at a concentration of 0 g/L (UW and HTK groups) or 5 g/L (UW+M101 and HTK+M101 groups). After transplantation, kidney function was assayed by diuresis (A-B), serum creatinine (C-D) and fraction of excreted sodium (E-F). Follow-up was performed the day before transplantation (D-1) and after transplantation (at 1h = R60; from day 1 to days 14 = D1 to D14; at months 1 and 3 = M1 and M3). Shown are mean ± SEM. Statistics: \* = p < 0.05 versus UW; † = p < 0.05 versus HTK; n = 5.

therefore measured the development of IFTA in parallel with function loss at 3 months and determined that classical preservation solutions could not avoid extensive fibrosis development as well as loss of function. However, supplementation with M101 at the time of preservation correlated with diminished development of fibrosis, pre-

serving function and improving outcome. In our *in vivo* model, free of any effects due to immunosuppression (50), we observed the summated effects of damage sustained by organ preservation and reperfusion (51) and our data outlines the importance of an optimized preservation protocol.



**Figure 10: Evolution of kidney histology.** Representative PAS staining of kidney biopsies at days 7, 14 and month 1 posttransplantation for UW, UW+M101, HTK, HTK+ M101 groups. Arrows showed brush border loss (bb) and interstitial fibrosis/tubular atrophy (IFTA).

Providing O<sub>2</sub> to ischemic tissue during CS could however be a “double-edged sword,” as O<sub>2</sub> can also fuel oxidative stress if the cell is not capable of restoring oxidative respiration (52). Herein, we showed that the use of an O<sub>2</sub> carrier during static preservation was protective, allowing cold-preserved cells to maintain their stock of ATP, hence presenting a balanced energy

metabolism at reperfusion and being able to handle the sudden influx of O<sub>2</sub> without excessive oxidative stress activation.

Alternative carriers are possible, such as PFCs (14,16), which through the use of the two-layers method (53) showed interesting potential in pancreas (54) and small

**Table 2:** Histological evaluation of kidney grafts

Groups	Histological Score					
	Brush Border Loss			Endoluminal detachment		
	D7	D14	M1	D7	D14	M1
UW	3.5 ± 1.1	2.6 ± 0.9	2.1 ± 0.3	3.1 ± 0.3	2.5 ± 0.6	2.0 ± 0.1
UW + M101	2.0 ± 1.4	2.0 ± 1.5	1.8 ± 0.4	0	0	0
HTK	3.5 ± 0.6	2.3 ± 1.2	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0.1	0	0
HTK + M101	3.0 ± 1.6	1.5 ± 0.6	1.4 ± 0.5	1.0 ± 0.5	0	0
Groups	Inflammation					
	Immune Infiltration			Tubulitis		
	D7	D14	M1	D7	D14	M1
UW	3.1 ± 0.4	3.2 ± 0.3	2.6 ± 0.4	3.2 ± 0.4	3.1 ± 0.2	3.0 ± 0.3
UW+M101	0.0 ± 0.0 <sup>1</sup>	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.0	0	0	1.0 ± 0.1
HTK	1.5 ± 0.6	1.3 ± 1.2	1.2 ± 0.4	0.8 ± 0.9	0.7 ± 0.6	1.2 ± 0.4
HTK+M101	1.5 ± 0.9	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.5	0.5 ± 0.6	1.0 ± 0.1
		CD3+ at 3 month			ED1+ at 3 month	
UW		17.0 ± 2.0			12.5 ± 1.5	
UW+M101		6.9 ± 0.4 <sup>1</sup>			9.5 ± 0.4	
HTK		23.0 ± 1.4			17.3 ± 3.2	
HTK+M101		14.2 ± 3.9 <sup>2</sup>			6.6 ± 1.2 <sup>2</sup>	

<sup>1</sup>p < 0.05 to UW.

<sup>2</sup>p < 0.05 to HTK; n = 5.

Top panel: Typical IRI histological lesions, brush border loss and endoluminal detachment, were assayed for UW, UW+M101, HTK and HTK + M101 groups after 7 days, 14 days and 1 month posttransplantation. Scale: 0, no abnormality; 1, mild lesions affecting less than 25% of kidney samples; 2, lesions affecting 25–50% of kidney samples; 3, lesions affecting 51–75% of kidney samples; 4, lesions affecting more.

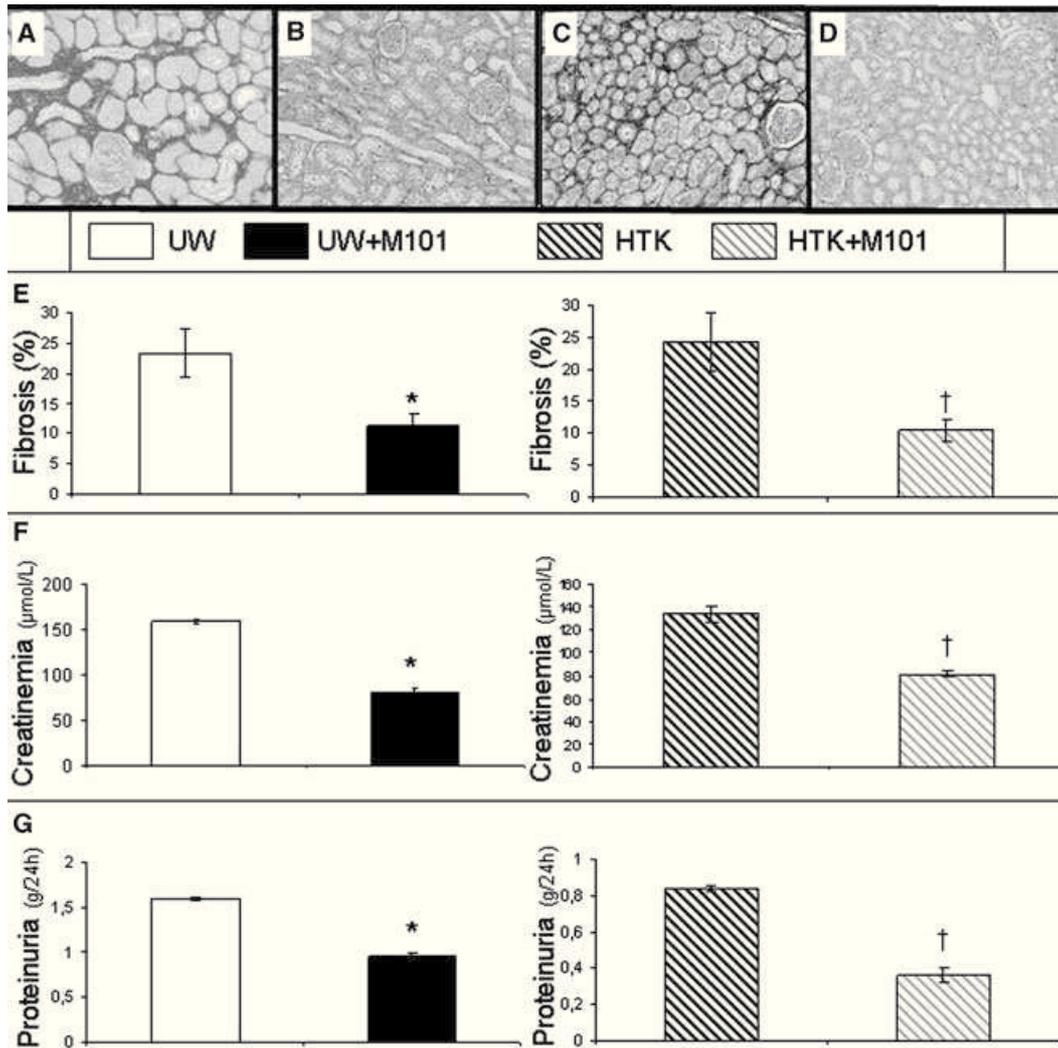
Middle panel: Inflammation was evaluated by measurement of tubulitis and immune infiltration and invasion for UW, UW + M101, HTK and HTK + M101 groups after 7 days, 14 days and 1 month posttransplantation. Quantitative determination was adapted from Banff classification: 0, no mononuclear inflammatory cell in tubules; 1, Foci with 1 to 4 mononuclear cells per tubular cross-section or 10 tubular cells; 2, Foci with 5 to 10 mononuclear cells per tubular cross-section; and 3, Foci with more than 10 mononuclear cells per tubular cross-section. Shown are mean ± SD.

Bottom panel: Inflammation was evaluated by measurement of CD3+ and ED1+ after 3 months posttransplantation: 3-month samples were specifically stained by immunofluorescence and the average number of positive cells by high-powered field (200×) was determined. Shown are mean ± SEM.

bowels (55) preservation. However, PFCs have the inconvenient of being hydrophobic, lipophilic and difficult to sterilize (56). Moreover, O<sub>2</sub> binding by PFCs needs high O<sub>2</sub> partial pressures, which implies a continuous O<sub>2</sub> supply during the preservation period and which raises the problem of hyperoxia and oxidative stress (57), possibly complicating their use in the clinic. Furthermore, recent data on pigs showed that the two layer method was not advantageous for kidney preservation (58). Another method consisting of active gaseous oxygenation by retrograde persufflation is also possible and has been shown in a small study to improve initial organ function (59); however, it might be difficult to set up in the clinic. These techniques provides O<sub>2</sub> in excess which could induce oxidative stress while a carrier such as M101 has the unique property of providing O<sub>2</sub> against a gradient, according to the physiological need of the cell and in a reversible process as we showed with functionality studies. Hemoglobin-based oxygen carriers are polymerized hemoglobin solutions from human or bovine origin first developed as blood substitute (60,61). However, they have not been used in organ preservation

and their use appears difficult, as the function of warm-blooded hemoglobin is uncertain at reduced temperatures. Nonprotein O<sub>2</sub> carriers are also included in Lifor (Lifeblood Medical, Freehold, NJ, USA), a new preservation solution, and showed promises in improving resistance to IRI in a rat model of warm ischemia (62). However, protection during hypothermia remains to be demonstrated and thus does not justify a complete change of preservation solution policy in the clinic, while the simple addition of an additive such as M101 has a higher translatability potential.

Moreover, M101 is naturally suited for hypothermic delivery of O<sub>2</sub>. Indeed, it is derived from a marine organism, produced in a safe and secure environment, subjected to important changes in temperatures and environmental conditions. Evolution has therefore honed it into a most efficient way to transport O<sub>2</sub> in an extracellular manner, at low temperatures and with the ability to withstand a harsh environment such as hypoxia. In effect, M101 has been designed by evolution to maintain life in hypoxic and hypothermic conditions for long periods of time, hence is



**Figure 11: Kidney outcome at 3 months.** A–D: Representative red Sirius staining for UW (A), UW+ M101 (B), HTK (C) and HTK+ M101 (D) groups at 3 months posttransplantation. E: Quantification of fibrosis development in each group. F: Serum creatinine in each group. G: Proteinuria in each group. Shown are mean ± SEM. Statistics: \* =  $p < 0.05$  versus UW; † =  $p < 0.05$  versus HTK;  $n = 5$ .

perfectly suited for organ preservation. M101 is thus stable in a wide range of organ preservation solutions of various ionic compositions and osmolarities, and provides both O<sub>2</sub> carrying and SOD abilities (18). This technology harnesses the product of millions of years of evolution to target the heart of IRI: lack of O<sub>2</sub>.

There is currently a rise of interest in regards to machine preservation of grafts (63,64) as it provides important improvement of graft quality and outcome (65). Although its mechanism remains unclear, the washout of metabolites and cellular waste produced during ischemia is a likely hypothesis. The presence of these products at reperfusion is indeed likely associated with the intense activation of the innate immune pathway, in accordance with the danger signal pathway (66,67). In this setting, the addition of

M101, to be cycled through the organ to deliver oxygen to its most remote territories, could be a valuable addition and provide additive or synergistic protection for the organ. This important issue is to be investigated in a future study.

In conclusion, we demonstrated herein the beneficial use of a novel O<sub>2</sub> carrier in two of the most used preservation solutions. We have demonstrated that the use of M101 in CS protocol is correlated with better short-term function recovery and reduced development of IFTA, main cause of graft loss. It is hoped that, in future, this technique will improve organ preservation not only for conventional organs but also for extended criteria and deceased after cardiac death organs, particularly as organ shortage leads centers towards increasingly marginal donors.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Prs Gérard Mauco and Michel Eugene (Inserm U927) and Séverine Deretz (INRA, Surgères) for their help and comments and William Hébrard and Catherine Henry (INRA, Surgères) and Véronique Mahy (Hemarina) for their expert technical assistance. Authors would also like to thank Pr Taveau (UMR CNRS 5248, Université de Bordeaux, France) for his courteous gift of the molecule 3D reconstruction.

**Funding Sources:** Conseil Général de la Vienne, Région Poitou Charentes, the Banque Tarneaud, Poitiers, CHU de Poitiers and Inserm, the Société Francophone de Transplantation, the French Foundation of Transplantation and the Fondation Centaure (Réseau de recherche en Transplantation). This work has obtained the label of the competitiveness cluster "Pôle Mer Bretagne" (France) and was in part financed by funds of the "Agence National de la Recherche" (France) with the programs Emergence (ANR-05-EMPB-025-01/02) and Research Innovation in Biotechnology (ANR-07-RIB-007-02).

## Disclosure

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*. Authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest. Co-authors from Inserm, CNRS and UPMC do not have shares in the capital of the company. Co-authors from Hemarina were employed by the company at the time of these studies; furthermore, Franck Zal and Morgane Rousselot are the founders and the main shareholders of HEMARINA. Other authors from HEMARINA are only employed by the company.

## References

- Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: New insights from experimental studies. *Am J Physiol* 2004; 287: F181–F187.
- Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted organs: Some new strategies against an old problem. *Am J Transplant* 2004; 4: 1.
- Faure JP, Baumert H, Han Z, et al. Evidence for a protective role of trimetazidine during cold ischemia: Targeting inflammation and nephron mass. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 2241–2250.
- Hauet T, Goujon JM, Vandewalle A, et al. Trimetazidine reduces renal dysfunction by limiting the cold ischemia/reperfusion injury in autotransplanted pig kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 138–148.
- Jayle C, Favreau F, Zhang K, et al. Comparison of protective effects of trimetazidine against experimental warm ischemia of different durations: early and long-term effects in a pig kidney model. *Am J Physiol* 2007; 292: F1082–F1093.
- Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical renal ischemia: A contemporary overview. *J Urol* 2008; 180: 19–30.
- Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: Mechanisms and prevention. *Transplant Proc* 2008; 40: 3279–3288.
- Favreau F, Thuillier R, Cau J, et al. Anti-thrombin therapy during warm ischemia and cold preservation prevents chronic kidney graft fibrosis in a DCD model. *Am J Transplant* 2011; 10: 30–39.
- Giraud S, Thuillier R, Belliard A, et al. Direct thrombin inhibitor prevents delayed graft function in a porcine model of renal transplantation. *Transplantation* 2009; 87: 1636–1644.
- Dragun D, Hoff U, Park JK, et al. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background. *Kidney Int* 2000; 58: 2166–2177.
- Koo DD, Welsh KI, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation: An immunohistochemical analysis of changes after reperfusion. *Am J Pathol* 1998; 153: 557–566.
- Cassie S, Masterson MF, Polukoshko A, Viskovic MM, Tibbles LA. Ischemia/reperfusion induces the recruitment of leukocytes from whole blood under flow conditions. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1102–1111.
- Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45: 673–676.
- Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation* 2007; 83: 1289–1298.
- Minor T, Sitzia M, Dombrowski F. Kidney transplantation from non-heart-beating donors after oxygenated low-flow machine perfusion preservation with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution. *Transpl Int* 2005; 17: 707–712.
- Matsumoto S, Kuroda Y. Perfluorocarbon for organ preservation before transplantation. *Transplantation* 2002; 74: 1804–1809.
- Jouan L, Taveau JC, Marco S, Lallier FH, Lamy JN. Occurrence of two architectural types of hexagonal bilayer hemoglobin in annelids: comparison of 3D reconstruction volumes of *Arenicola marina* and *Lumbricus terrestris* hemoglobins. *J Mol Biol* 2001; 305: 757–771.
- Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, et al. *Arenicola marina* extracellular hemoglobin: A new promising blood substitute. *Biotechnol J* 2006; 1: 333–345.
- Rousselot M, Le Guen D, Zal F. Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular haemoglobin. *FEBS J* 2006; 273: 1582–1596.
- Zal F, Green BN, Lallier FH, Vinogradov SN, Toulmond A. Quaternary structure of the extracellular haemoglobin of the lugworm *Arenicola marina*: A multi-angle-laser-light-scattering and electrospray-ionisation-mass-spectrometry analysis. *Eur J Biochem* 1997; 243: 85–92.
- Toulmond A. Blood oxygen transport and metabolism of the confined lugworm *Arenicola marina* (L.). *J Exp Biol* 1975; 63: 647–660.
- Toulmond A, Tchernigovtzeff C. Ventilation and respiratory gas exchanges of the lugworm *Arenicola marina* (L.) as functions of ambient PO<sub>2</sub> (20–700 torr). *Respir Physiol* 1984; 57: 349–363.
- Ahlenstiel T, Burkhardt G, Kohler H, Kuhlmann MK. Improved cold preservation of kidney tubular cells by means of adding bioflavonoids to organ preservation solutions. *Transplantation* 2006; 81: 231–239.
- McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl J Med* 1985; 312: 159–163.
- Chabasse C, Bailly X, Rousselot M, Zal F. The multigenic family of the extracellular hemoglobin from the annelid polychaete *Arenicola marina*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2006; 144: 319–325.
- Royer WE, Jr., Omartian MN, Knapp JE. Low resolution crystal structure of *Arenicola erythrocyruin*: Influence of coiled coils on the architecture of a megadalton respiratory protein. *J Mol Biol* 2007; 365: 226–236.
- Favreau F, Thuillier R, Cau J, et al. Anti-thrombin therapy during warm ischemia and cold preservation prevents chronic kidney graft fibrosis in a DCD model. *Am J Transplant* 2010; 10: 30–39.

28. Bernhardt WM, Gottmann U, Doyon F, et al. Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogenic kidney transplant model. *Proc Nat Acad Sci USA* 2009; 106: 21276–21281.
29. Bos EM, Leuvenink HG, Snijder PM, et al. Hydrogen sulfide-induced hypometabolism prevents renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1901–1905.
30. Hosgood SA, Nicholson ML. Hydrogen sulphide ameliorates ischaemia-reperfusion injury in an experimental model of non-heart-beating donor kidney transplantation. *Br J Surg* 2009 Epub ahead of print.
31. Kumar S, Allen DA, Kieswich JE, et al. Dexamethasone ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 2412–2425.
32. Yoshida J, Ozaki KS, Nalesnik MA, et al. Ex vivo application of carbon monoxide in UW solution prevents transplant-induced renal ischemia/reperfusion injury in pigs. *Am J Transplant* 2010; 10: 763–772.
33. Companiesandmarkets.com. Organ preservation solutions – A global strategic business report. 2010. Available at: <http://www.companiesandmarkets.com/Summary-Market-Report/organ-preservation-solutions-a-global-strategic-business-report-317184.asp>. Accessed June 1, 2010.
34. Pereira-Sampaio MA, Favorito LA, Sampaio FJ. Pig kidney: Anatomical relationships between the intrarenal arteries and the kidney collecting system. Applied study for urological research and surgical training. *J Urol* 2004; 172(5 Pt 1): 2077–2081.
35. Giraud S, Favreau F, Chatauret N, Thuillier R, Maiga S, Hauet T. Contribution of large Pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: The preclinical model. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 532127.
36. Assendelft, ed. *Spectrophotometry of haemoglobin derivatives*. Assen, The Netherlands: Charles C Thomas Publisher, Royal Van-gorcum, 1970.
37. Weber RE, Vinogradov SN. Nonvertebrate hemoglobins: Functions and molecular adaptations. *Physiol Rev* 2001; 81: 569–628.
38. Patel S, Spencer CP. Studies on the Haemoglobin of *Arenicola Marina*. *Comp Biochem Physiol* 1963; 16: 65–82.
39. Oberley LW, Spitz DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 457–464.
40. Dutheil D, Rioja-Pastor I, Tallineau C, et al. Protective effect of PEG 35,000 Da on renal cells: Paradoxical activation of JNK signaling pathway during cold storage. *Am J Transplant* 2006; 6: 1529–1540.
41. Salahudeen AK, May W. Reduction in cold ischemia time of renal allografts in the United States over the last decade. *Transplant Proc* 2008; 40: 1285–1289.
42. Hauet T, Goujon JM, Baumert H, et al. Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotransplanted pig kidneys. *Kidney Int* 2002; 62: 654–667.
43. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: Updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8: 753–760.
44. Grimm PC, Nickerson P, Gough J, et al. Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1662–1668.
45. Favreau F, Rossard L, Zhang K, et al. Expression and modulation of translocator protein and its partners by hypoxia reoxygenation or ischemia and reperfusion in porcine renal models. *Am J Physiol* 2009; 297: F177–F1790.
46. Thuillier R, Favreau F, Celhay O, Macchi L, Milin S, Hauet T. Thrombin inhibition during kidney ischemia-reperfusion reduces chronic graft inflammation and tubular atrophy. *Transplantation* 2010; 90: 612–621.
47. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*. 2006; 160: 171–177.
48. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 114–119.
49. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant*. 2009; 9: 527–535.
50. Copeland JW, Beaumont BW, Merrilees MJ, Pilmore HL. Epithelial-to-mesenchymal transition of human proximal tubular epithelial cells: Effects of rapamycin, mycophenolate, cyclosporin, azathioprine, and methylprednisolone. *Transplantation* 2007; 83: 809–814.
51. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: Current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; 81: 643–654.
52. Hart NA, van der Plaats A, 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: 1403–1411.
53. Kuroda Y, Kawamura T, Suzuki Y, Fujiwara H, Yamamoto K, Saitoh Y. A new, simple method for cold storage of the pancreas using perfluorochemical. *Transplantation* 1988; 46: 457–460.
54. Fujino Y, Kuroda Y, Suzuki Y, et al. Preservation of canine pancreas for 96 hours by a modified two-layer (UW solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 1991; 51: 1133–1135.
55. Yoshikawa T, Suzuki Y, Fujino Y, et al. Detailed analysis of mucosal restoration of the small intestine after the cavity two-layer cold storage method. *Am J Transplant* 2005; 5: 2135–2142.
56. Farrar D, Grocott M. Intravenous artificial oxygen carriers. *Hosp Med* 2003; 64: 352–356.
57. Cataldi A. Cell responses to oxidative stressors. *Curr Pharmaceut Design* 2010; 16: 1387–1395.
58. Hosgood SA, Mohamed IH, Nicholson ML. The two layer method does not improve the preservation of porcine kidneys. *Med Sci Monit* 2011; 17: BR27–BR33.
59. Rolles K, Foreman J, Pegg DE. A pilot clinical study of retrograde oxygen persufflation in renal preservation. *Transplantation* 1989; 48: 339–342.
60. Kakehata J, Yamaguchi T, Togashi H, et al. Therapeutic potentials of an artificial oxygen-carrier, liposome-encapsulated hemoglobin, for ischemia/reperfusion-induced cerebral dysfunction in rats. *J Pharmacol Sci* 2010; 114: 189–197.
61. Spahn DR, Kocian R. Artificial O2 carriers: status in 2005. *Curr Pharmaceut Design* 2005; 11: 4099–4114.
62. Regner KR, Nilakantan V, Ryan RP, et al. Protective effect of Lifer solution in experimental renal ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2010; 164: e291–e297.
63. Moers C, Smits JM, Maathuis MH, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *New Engl J Med* 2009; 360: 7–19.
64. Jochmans I, Moers C, Smits JM, et al. Machine perfusion versus cold storage for the preservation of kidneys donated after cardiac death: A multicenter, randomized, controlled trial. *Ann Surg* 2011; 252: 756–764.
65. Vaziri N, Thuillier R, Favreau FD, et al. Analysis of machine perfusion benefits in kidney grafts: A preclinical study. *J Transl Med* 2010; 9: 15.
66. Eleftheriadis T, Lawson BR. Toll-like receptors and kidney diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009; 8: 191–201.
67. Evankovich J, Billiar T, Tsung A. Toll-like receptors in hepatic ischemia/reperfusion and transplantation. *Gastroenter Res Prac* 2010; 2010.

**DOSE EFFICACY AND MECHANISM OF THE NATURAL OXYGEN  
TRANSPORTER HEMO2Life® IN ORGAN PRESERVATION**

Vanessa Mallet <sup>a,b</sup>, Delphine Dutheil <sup>b</sup>, Valérie Polard <sup>b</sup>, Raphael Thuillier <sup>a,c,d</sup>, Morgane Rousselot <sup>b</sup>, Elisabeth Leize <sup>e</sup>, Jean Michel Goujon <sup>a</sup>, Franck Zal <sup>b</sup> and Thierry Hauet <sup>a,c,d,f</sup>.

a Inserm U1082 ; Faculté de Médecine et Pharmacie ; Univ Poitiers; Poitiers, F86000, France

b HEMARINA, Aéroport centre, Morlaix, F29600, France

c CHU de Poitiers, Département de Biochimie, Poitiers, F86000, France

d FLIRT : Fédération pour L'étude de l'Ischemie Reperfusion en Transplantation

e CHU de Brest, Département de Prothèses, UFR Odontologie, Brest, F29238, France

f INRA, Plate-forme IBiSA, Unité de Transplantation Expérimentale, GEPA, Département de Génétique Animale, Domaine du Magneraud, Surgères, F17700, France

**Running Title:**

**Conflict of Interest:** F.Z. and M.R. are founders and hold stock in Hemarina which produces the substance being investigated. V.M, D.D and V.P. are employees of Hemarina and doesn't hold stock. Materials for the studies were provided by Hemarina.

All other authors declare no conflict of interest. **Word Count:**

Abstract:

Text:

**Correspondance:** Dr. Thierry Hauet, Laboratoire de Biochimie et Toxicologie, Centre Hospitalier et Universitaire, Hopital Jean Bernard, La Milétrie, 86000 Poitiers, France.

Tel: 33549444444, Fax: 3354944 443834, Email: [t.hauet@chu-poitiers.fr](mailto:t.hauet@chu-poitiers.fr)

Reprints are to be requested to the corresponding author.

**Keywords:** graft preservation; ischemia reperfusion injury; kidney transplantation; oxygen; HEMO2Life®, oxygen transporter, dose efficacy

## ABSTRACT

The intensity of the ischemia reperfusion injury of the donor organ, encountered during the preservation phase and after anastomosis, is acknowledged as being a key factor for long term graft outcome.

We previously showed that the addition of 5g/L of a dedicated natural oxygen carrier, M101 (formulated in a commercial product designed as HEMO2life®) was beneficial for the static preservation of kidney grafts both in University of Wisconsin (UW) and Histidine-Tryptophane-Ketoglutarate solutions. Herein, we refined these findings using a dose dependent approach both *in vitro* on endothelial cells preserved in UW and *in vivo* in a pig kidney autotransplantation preclinical model.

We first showed *in vitro* that cells were significantly better preserved with M101 in a dose dependent manner, the additive showing benefits in terms of survival and metabolic activity, as well as a higher level of cellular integrity as shown by electron microscopy on preserved cells. These benefits were also evident when simulating reperfusion, cells preserved with M101 displaying a better ability to recover from preservation stresses, the highest level of viability being reached with 5g/L M101.

Transferring these findings *in vivo*, we tested the addition of 1, 2 and 5 g/L of M101 in UW for 24h static cold preservation. Serum creatinine measurements at reperfusion confirmed the important benefits of M101 treatment in terms of function recovery.. In the same way, histological analysis of kidney parenchyma on day 7 biopsies confirmed the superiority of M101-supplemented UW over UW alone, and could not differentiate between the doses.

Three months follow up confirmed the trend of the first two weeks, with creatinine and fibrosis levels similar to pretransplant kidneys, with no differences between the doses.

In conclusion, this dose-efficacy study of HEMO2Life<sup>®</sup> as an additive to static organ preservation showed a significant a protection of the kidney graft from 1g/L to 5g/L dose levels, both on early function recovery and outcome.

## INTRODUCTION

Organ transplantation is the therapy of choice for end stage organ failure. The procedure, involving the transfer of an organ from a donor to a recipient, involves an unavoidable step of ischemia, which can last up to 36 hours in case of kidney transplantation from deceased donors. A variety of pathophysiological pathways are activated during this period, such as oxidative stress, mitochondrial uncoupling, or inflammation [1, 2]; an injury which will be worsened by the sudden reperfusion of the organ with oxygenated blood, the stressed parenchyma then activating the coagulation cascade [3, 4] and the innate immune response independently of allogenicity [5], involving intense immune cells invasion in the kidney and deregulation of the regenerative processes [6, 7].

Ischemia reperfusion injury (IRI) plays thus a central role in determining organ quality and is strongly correlated to early non-function or delayed graft function [8, 9], as well as chronic graft failure and late graft loss [10-12]. It is thus of paramount importance to design strategies to better preserve organs in order to limit IRI, improving graft quality and outcome substantially.

Current organ preservation protocols involve cold storage at 4°C [8, 13], with the goal of reducing metabolism and thus the organ's requirement in oxygen. However, even as the metabolism is slowed down, the cell still requires oxygen, making hypoxia one of the key hurdles to overcome on the way to improved organ quality. Several avenues of research are pursued to solve this issue, proposing both technological approaches through persufflation or direct oxygenation in the case of machine perfusion [14] as well as the use of a pharmacological approach using a carrier to deliver oxygen into the tissue. This

later concept of supplementing classical organ preservation protocols with adapted pharmaceuticals is rapidly gaining interest in the community [4, 15-20]. Indeed, simple addition of a molecule to an established protocol presents the potential of a rapid translation to the clinic, compared to the more cumbersome approach of changing the whole protocol with solutions and machines.

Several classes of materials have been studied as potential oxygen carriers, for instance perfluorocarbons (PFCs) [21, 22] with the two-layers method [23], or Hemoglobin-Based Carriers (HBOCs) which are polymerized hemoglobin solutions from human or bovine origin firstly developed as blood substitute [24, 25], or even non-protein oxygen carriers such as is found in Lifer® (liposomal nanoparticles), a new preservation solution [26]. However, although the later two solutions showed promises in several animal models, they are designed for use in normothermic conditions. Regarding PFCs, they have the inconvenient of being hydrophobic, lipophilic and difficult to sterilize [27]. There thus remain to be found a strategy that can easily be translated to the clinic, with minimal change in current protocols.

We recently reported the use of a naturally occurring respiratory pigment in cold static preservation, M101, which when used at a dose of 5g/L in Viaspan® (UW, University of Wisconsin) or Custodiol® (HTK) on preservation solutions improved significantly graft quality and outcome in a large animal preclinical model [28]. This extracellular hemoglobin is obtained from a marine invertebrate, *Arenicola marina* [29-31], a worm living in sandy beaches constantly subjected to environmental changes: from normoxia/normothermia at low tide to hypoxia/hypothermia at high tide, conditions which resemble the process of organ preservation and transplantation. M101 is

formulated in a commercial product designed as HEMO2life<sup>®</sup>. The present study is the continuation of our preliminary findings, in which we explore the protective capabilities of lower dosages used in preservation protocols with the UW solution.

We used models mimicking conditions of organ preservation, both *in vitro* using primary endothelial cells (first concerned by IRI) in a hypoxia/reoxygenation protocol and *in vivo* in a pig model of kidney autotransplantation.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***HEMO2life® (M101)***

The extracellular hemoglobin M101 is formulated in a commercial product designed as HEMO2life® (Hemarina SA, France) as an additive to preservation solutions. HEMO2life® is manufactured using GMP standards governing medicinal products [32].

### ***Cell culture***

Human primary aortic endothelium cells (HAEC) were cultured according to the manufacturer's recommendations (Fisher Bioblock, Illkirch, France). After a 12h period of synchronization in low-nutrient culture medium (M200 + 2% Fetal bovine Serum (FBS), Fisher), cells were subjected to 24 hours under hypoxia (Bactal2® gas: 0% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 95% N<sub>2</sub>, Air Liquide, Puteaux, France) at 4°C in UW solution (Bristol-Myers Squibb, Rueil-Malmaison, France), mimicking cold ischemia during organ preservation. M101 was added to UW solution at the indicated doses (0 to 10 g/L). At the end of this period, UW was removed and cells were washed four times with PBS. Cells were then cultured with fresh medium (M200 + 2% FBS) and placed in the incubator (37°C in 5% CO<sub>2</sub>, 95% air), mimicking organ reperfusion.

Control cells were cultivated for the same amount of time as tested cells in regular media (M200 + 2% FBS) and conditions (37°C in 5% CO<sub>2</sub>, 95% air).

Assays were: -Necrosis: Lactate dehydrogenase (LDH) release was tested using In Vitro Toxicology Assay Kit (Sigma-Aldrich, St Louis, USA); -Metabolic activity was determined by the XTT assay (Roche, Boulogne-Billancourt, France); -Intracellular ATP was determined using Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay Kit

(Sigma). Kits were used following the manufacturer's guidelines. Reactions were quantified with a multiplate reader (Victor3, Perkin-Elmer, France).

### ***Transmission Electron Microscopic Evaluation of cultured cells***

HAEC, subjected to 12h synchronization followed by 24h cold hypoxia in UW solution supplemented or not with various doses of M101 (0, 1, 2 or 5g/L), were fixed in 3% glutaraldehyde (Sigma) in 0.1M PBS (fournisseur) for 2h at 4°C. Cells were then 1) rinsed three times with PBS pH 7.4 (fournisseur), 2) post-fixed in osmium tetroxyde 1% (Sigma) in PBS for 1h, processed through a graded acetone (Sigma) series, 3) embedded in araldite (Fluka, Buchs, Switzerland) and 4) polymerized overnight at 60°C. Thin sections (60nm) were cut with a diamond knife on Reichert Ultracut S (Reichert, Depew, NY, USA), recovered on Cu grids and contrasted with uranyl acetate (4%) (Sigma) and lead citrate (Sigma). Slides were observed under JEOL 1010 transmission electron microscope (JSM840, JEOL S.A., Europe). Semi quantitative scoring was conducted as follows: -Necrosis: average number of necrotic bodies per field; -Autophagosomes: average number of autophagosomes in observed cell; -Lysed organelles: average number of lysed organelles by observed cell; -Swollen mitochondria: proportion of observed swollen mitochondria, showing loss of inner membrane crescents; -Intact mitochondria: average number of mitochondria by observed cell. 4 to 5 non overlapping fields were analysed for each of the 3 independent experiments.

### ***In vivo Surgical procedures and Experimental groups***

Large white male pigs (INRA/GEPA, Surgères, France) were prepared as previously described [11] in accordance with French guidelines of the Ethical Committee for Human and Animal Studies. The right kidney was harvested, cold flushed and preserved for 24

hours before transplantation at 4°C, while the left kidney was nephrectomized to mimic nephron mass in transplanted situation. Surgical teams were blinded to protocols. Time for vascular anastomoses was 30±5min, blood loss was minimal and no post operative complication was observed. Four groups were studied: **1-UW**: organ preservation with UW solution alone; **2-UW+5g M101**: UW solution supplemented with 5g/L M101; **2-UW+2g M101**: UW solution supplemented with 2g/L M101; **2-UW+1g M101**: UW solution supplemented with 1g/L M101.

### ***Functional parameters***

Pigs were placed in a metabolic cage for diuresis (mL/24h), creatininemia (µmol/L) measurements as previously described [10-12].

### ***Morphological studies***

Biopsies were processed for conventional histology. Cortical and medullary kidney tissue was collected 7, 14 days and 1 month after reperfusion. Brush border loss, histological patterns typical of proximal tubule cell injury, was assessed in the following semi-quantitative 6-point scale: 0 - no abnormality; 1 - mild lesions affecting less than 25% of kidney samples; 2 - lesions affecting 25-50% of kidney samples; 3 - lesions affecting 51-75% of kidney samples; 4 - lesions affecting more than 75% of kidney samples and 5 – extensive necrosis and renal damage [33].

Tubulointerstitial fibrosis was determined using Picro Sirius staining quantified *in silico* on 10 non overlapping microscopic kidney cortex fields (100X) [34].

### ***Statistical methods***

Results are shown as mean±SEM. For the statistical analysis among groups, we used NCSS software (NCSS LLC, USA) to perform non parametric Kruskal-Wallis Multiple-

Comparison Z-Value Test (Dunn's Test). Statistical significance was accepted for  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### ***M101 protects against cold hypoxia in a dose-dependent manner***

We investigated the effects of supplementing UW solution with M101 in an *in vitro* model of cold hypoxia and reoxygenation which reproduces the conditions of organ preservation and reperfusion with human primary endothelial cells, the first cells affected by IR in the organ.

We first proceeded to observe the effects of 24h cold hypoxia. Cells preserved in UW alone (0g/L group) demonstrated a high level of necrotic-cells-released lactate dehydrogenase (Fig1A, 32% versus 4% in Control,  $p<0.05$ ), showed a decreased level of intracellular ATP (Fig1B, 47% of Control,  $p<0.05$ ), and a lower activity of the mitochondrial respiratory chain complex II (Fig1C, 51% of Control  $p<0.05$ ). Addition of M101 to the UW was able to improve these parameters in a dose-dependent manner, particularly regarding the levels of intracellular ATP (significantly different from 0g/L for concentrations of 2.5, 5 and 10g/L) and complex II activity.

### ***M101 preserves the cell integrity during preservation***

Electron microscopy and ultrastructural analysis of cells at the end of 24h cold hypoxic preservation (Fig2 and Table 1) showed that the preservation in UW alone was very deleterious for the cellular integrity: many necrotic bodies were observed, and in the few remaining cells the organelles were severely altered, showing distended non functional endoplasmic reticulum, swollen mitochondria and nuclei with disturbed membranes, indicative of extensive stress. These cells also showed numerous myelinic figures, indicating necrotic cell death. Treatment with M101 reduced the amount of necrotic debris ( $p<0.05$  for all doses vs. UW) as well as improved mitochondrial integrity and

reticulum endoplasmic folding. Although cell structures were altered by the stresses of preservation, presence of autophagosomes rather than necrotic bodies indicated a better maintenance of essential pathways for proper resistance to stress, likely due to the maintenance of ATP production.

### ***M101 protects against IRI in a dose-dependent manner***

To refine our observation, we endeavored to explore the consequences of simulated reperfusion on cold-preserved cells. At the end of the 24h cold hypoxia period, the preservation solution was removed and cells were cultured in regular media and under regular culture conditions for 24h, to mimick graft reperfusion. After 24h of reperfusion of cells cold-preserved with UW alone, cell injuries were drastically increased: the LDH release was elevated to 51% (versus 6% in Control,  $p<0.05$ , Fig3A) while the intracellular concentration of ATP in UW alone preserved cells was down to 24% of Control (Fig3C,  $p<0.05$ ) and complex II activity was decreased to 33% of Control (Fig3C,  $p<0.05$ ). Confirming data obtained at the end of preservation, M101 preserved cells showed improved in these measurements after reperfusion in a dose dependent manner, reaching 13% LDH release, 86% of intracellular ATP, and 62% XTT activity for the 5g/L dose ( $p<0.05$  vs. 0g/L).

These results show that, in our *in vitro* model of IRI, M101 is beneficial for cell survival in a dose dependent manner, reaching high level of protection at doses ranging from 1 to 10 g/L.

### ***Dose-dependent protection in vivo***

We previously used a preclinical porcine model of kidney autotransplantation in order to demonstrate the benefits of 5g/L M101 as a supplement to the preservation solution,

using either UW or HTK. In order to determine if lower doses of M101 could be protective, as suggested by our *in vitro* data, we proceeded to reproduce these experiments by preserving kidneys in UW solution supplemented by either 1, 2 and 5g/L M101.

Measurement of serum creatinine levels after reperfusion (Fig 4, A) in animals transplanted with kidneys preserved in UW alone showed a slow recovery of function, characterized by a high peak at days 3-5 (approx. 1100 $\mu$ mol/L) and a slow recovery to lower levels over the next two weeks reaching approximately 500 $\mu$ mol/L at day 14, 5.5 times the pretransplant levels. Addition of 1 or 2 g/L of M101 in the preservation solution showed improved recovery with a lower serum creatinine peak at day 3 (approx. 900 and 700 $\mu$ mol/L respectively) and a faster recovery afterwards, reaching approximately 150 $\mu$ mol/L, about 1.7 times the pretransplant levels, at day 14.

On the other hand, addition of 5g/L M101 further improved function recovery, reaching peak at day 1 (approximately 500 $\mu$ mol/L) and showing pretransplant serum creatinine levels as early as day 11 (approximately 100 $\mu$ mol/L).

In addition, an area under the curve (AUC) analysis in the first two weeks after transplantation was also performed (Fig 4, B) and showed that AUC for the UW+1g/L and UW+2g/L groups were nearly identical (approx 4000  $\mu$ mol/L.day), while AUC for 5g/L was lower (approximately 2000  $\mu$ mol/L.day). AUCs for 1, 2 and 5 g/L were significantly lower than AUC calculated for UW animals (approx 8500 $\mu$ mol/L.day,  $p<0.05$ ). Furthermore, even though the decrease of AUC in 5 g/L group was slightly higher compared to the two others M101 treated groups, the difference between the dose levels was not significant ( $p<0.05$ ).

In order to determine the potential benefits of M101 on parenchyma injury, we performed kidney biopsies at day 7 and processed them for semi quantitative analysis of injury, measuring the intensity of brush border loss and endoluminal detachment, two major features of IRI, as well as the level of tissues invasion by immune cells (Fig 5, Table 2). We determined that after 7 days, grafts preserved with UW presented a high level of ischemia reperfusion lesions, with a concomitant cellular invasion by the immune system. On the other hand, grafts preserved with UW supplemented with M101 presented reduced levels of lesion, with significantly less brush border loss (BBL) and cellular detachment (CD) whatever the dose level. Moreover, less invading cells were found in these grafts. No significant difference in injury level was observed among M101 treated groups.

To evaluate the influence of the preservation protocol on chronic outcome, we followed the animals for 3 months. Serum creatinine measurements at months 1 and 3 showed elevated levels in UW animals, reaching approx. 380 and 160 $\mu$ mol/L respectively. On the other hand, addition of 1 or 2 g/L M101 during preservation was able to improve organ quality as translated into improved function recovery at 1 month (approx. 130 $\mu$ mol/L and 180 $\mu$ mol/L respectively) and 3 months (approx. 120 $\mu$ mol/L).. In the 5g/L group, levels at 1 month and 3 months post transplantation remained at the level reached at day 11. Significant difference was measured between UW group and 1g/L, 2g/L and 5g/L of M101 after 3 months.

### ***Chronic parenchymal injury***

We previously demonstrated development of chronic fibrosis in our models after 3 months follow up [35, 36]. To determine if supplementation of UW with either 1 or 2 g/L

M101 was protective against this chronic injury, we proceeded to analyse fibrosis development in kidneys at 3 months (Fig 6). While interstitial fibrosis in UW preserved kidneys averaged 23%, the advancement of this lesion in treated groups was lower, with 9% in the UW+1g/L group, 13% in the UW+2g/L animals and 5% in the UW+5g/L group; each M101 treated group reaching statistically significant difference with UW ( $p < 0.05$  to UW). No significant difference in fibrosis level was shown between 1g/L and 5g/L ( $p > 0.05$ ).

## DISCUSSION

Herein, we investigated the dose-dependent benefits of the natural oxygen transporter M101 (HEMO2Life<sup>®</sup>) against ischemia reperfusion injury, using two different models.

Using an *in vitro* model of IR, namely by simulating organ preservation through a hypoxia/hypothermia phase in UW solution and reproducing reperfusion conditions by transferring the preserved cells to normal culture conditions, we show that addition of M101 during storage offers benefits in terms of intracellular ATP concentration as well as improved mitochondrial respiratory chain activity, translating into increased survival. These benefits are clearly dose-dependent, the maximal effects being found between 2.5 and 5g/L depending on the test used. We confirmed the effect on cell integrity maintenance using transmission electron microscopy, showing that preservation with UW had important consequences on cell integrity, disturbing the organization of major organelles such as the endoplasmic reticulum and the mitochondria, as well as disrupting the membrane of the nucleus; inducing the cell towards necrosis as shown by the presence of myelinic structures. In contrast, use of M101 during preservation permitted a better maintenance of overall cell phenotype, with observable improvement in endoplasmic reticulum and mitochondrial structure and no effect on nuclei. Furthermore, the presence of autophagosomes shows that the cell is able to mount a response against the stress and thus suggests a better ability to recover from hypoxia/hypothermia, as confirmed by functional tests.

These findings are in line with previous work from our laboratory [28] using a model of hypothermia with a proximal tubule cell line, in which we showed similar

benefits in several preservation solutions. The present findings, improving the model through the use of non immortalized primary endothelial cells, the first cell type facing IR, and refining the simulation by using both hypoxia and hypothermia, show that the effects of M101 are robust and not limited to a single cell type. Moreover, the dose at which the effect was maximal was very similar in both models, confirming the reproducibility of the benefits.

The second objective of the study was to investigate the protective effects of M101 when used lower doses than previously published in order to evaluate the clinical translation potential of this molecule. To this end, we used a pig model of kidney transplantation, a species providing a high degree of clinical relevance to our data since its genome is close to that of humans and in particular its kidneys presents an elaborate system of inter lobular and segmental arteries to supply the numerous kidney lobes, a characteristic shared with humans and higher mammal but absent in rodents or dogs [1], making porcine models very close to human conditions [37]. Previous findings using 5g/L of M101 in UW solution showed significant benefits in terms of function recovery and chronic lesions such as fibrosis. Herein, we show that both 1 and 2 g/L of M101 added to UW during kidney preservation, using the same experimental conditions as for the higher dose, provided a significant level of protection.

We first analyzed recovery after reperfusion, using serum creatinine as a marker of kidney function. Analysis of profile over the first two weeks revealed a significant improvement for M101-preserved kidneys, lowering the area under the curve by half its level measured in UW alone animals. This indicates an improved ability for the organ to recover from the stresses of preservation and resume proper filtration of the blood. The

improvement demonstrated by 1, 2 and 5g/L was significant compared to UW alone. The level of protection seems similar, as no statistical difference among the dose level groups was demonstrated.

In order to determine the parenchymal impact of the different preservation conditions, analysis of kidney biopsies at day 7 was performed. We noted an important level of lesions in UW alone preserved graft, with high amount of brush border loss and endoluminal detachment, indicating a high level of IR stress of the proximal tubules. Moreover, these grafts displayed an important level of invasion by immune cells, likely responding to the stress signals emitted by the parenchyma. Graft preservation with M101-supplemented UW, on the other hand, showed a better level of tissue preservation, with lower levels of injury and immune invasion. This is in line with the biochemical data, as a better recovery is synonym of a higher capacity for regeneration within the organ, generally indicated better organ quality. A similar reduction of IR lesions was observed for each M101 dose. ( $p>0.05$ ).

Chronic follow up of the animals confirmed the amelioration in organ quality. Indeed, treated animals showed both lower serum creatinine and interstitial fibrosis level compared to UW alone. Considering that IFTA (interstitial fibrosis and tubular atrophy) is often the cause of chronic loss of graft function, and ultimately loss of the graft itself [38], this confirms the better organ quality obtained with M101 treatment, whatever the dose level. The levels attained with 1 and 2 g/L were slightly higher than those obtained with 5g/L, but the difference between the lower dose of 1g/L and the higher one did not reach significance. Thus, while *in vitro* experimentation showed a gradual dose response between the 1g/L and the 5g/L doses, transition to an *in vivo* setting revealed a threshold

effect, with similar outcomes between 1 and 2g/L while transition to 5g/L seems to induce a slightly improvement of the graft, but not significantly. This highlights the gap between *in vitro* and *in vivo* settings: while the former provides a versatile platform permitting extensive testing of a large number of conditions and molecules, allowing for in depth mechanistic analysis, the later is unavoidable to obtain reliable preclinical data which can guide the design of new therapeutic and diagnostic strategies.

In conclusion, we clearly demonstrate herein the beneficial use of M101 at a lower dosage than previously published: a reduced dose of M101 significantly reduce serum creatinine levels within the two first weeks and the intensity of IRI and permit an improvement in graft outcome.

**ACKNOWLEDGEMENTS:**

This work has obtained the label of the competitiveness cluster 'Pôle Mer Bretagne' (France) and was in part financed by funds of the 'Agence National de la Recherche' with the program "Recherche et Innovation en Biotechnologie" (ANR-07-BIOT-007-01).

The authors would like also to thank William Hebrard, Catherine Henri and Pierre Couturier for their invaluable help in the animal experiments.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: M101 dose-dependent benefits on cold-stored endothelial cells preserved in UW.**

Human primary aortic endothelial cells were synchronized for 12h in starving media then subjected to 24h hypoxia/hypothermia in UW solution containing an increasing concentration of M101 (0 to 10g/L), upon which analyses were conducted. Analyses were: **A:** Measurement of the amount of lactate dehydrogenase (LDH) released in the culture media by necrotic cells, expressed as percentage of the total amount of LDH present in the culture well (CTL); **B:** Quantification of intracellular ATP, represented as a percentage of the levels in **Control** cells (CTL, not subjected to hypoxia/hypothermia); **C:** Level of succinate dehydrogenase (complex II of the mitochondrial respiratory chain) activity, expressed as percentage of the activity detected in Control cells. Results are means±SEM of 3 independent experiments. \*  $p<0.05$  vs Control; †  $p<0.05$  vs UW not supplemented with M101 (0 g/L).

### **Figure 2: Electron Microscopy evaluation of M101 benefits at the end of hypoxia.**

Human primary aortic endothelial cells were synchronized for 12h in starving media then subjected to 24h hypoxia/hypothermia in UW solution containing an increasing concentration of M101 (0, 1, 2 or 5g/L), upon which cells were fixed and processed for electron microscopy analysis. Shown are representative images of 3 independent experiments. Arrows indicate the different organelles analyzed in Table 1.

### **Figure 3: M101 dose-dependent benefits on cold-stored endothelial cells after reperfusion.**

Human primary aortic endothelial cells were synchronized for 12h in starving media then subjected to 24h hypoxia/hypothermia in UW solution containing an increasing concentration of M101 (0 to 10g/L). Cells were then subjected by 24h

reoxygenation in regular media and culture conditions, after which analyses were performed. Analyses were: **A:** Measurement of the amount of lactate dehydrogenase (LDH) released in the culture media by necrotic cells, expressed as percentage of the total amount of LDH present in the culture well (CTL); **B:** Quantification of intracellular ATP, represented as a percentage of the levels in **Control** cells (CTL, not subjected to hypoxia/hypothermia); **C:** Level of succinate dehydrogenase (complex II of the mitochondrial respiratory chain) activity, expressed as percentage of the activity detected in Control cells. Results are means±SEM of 3 independent experiments. \*  $p < 0.05$  vs Control (CTL); †  $p < 0.05$  vs UW not supplemented with M101 (0 g/L).

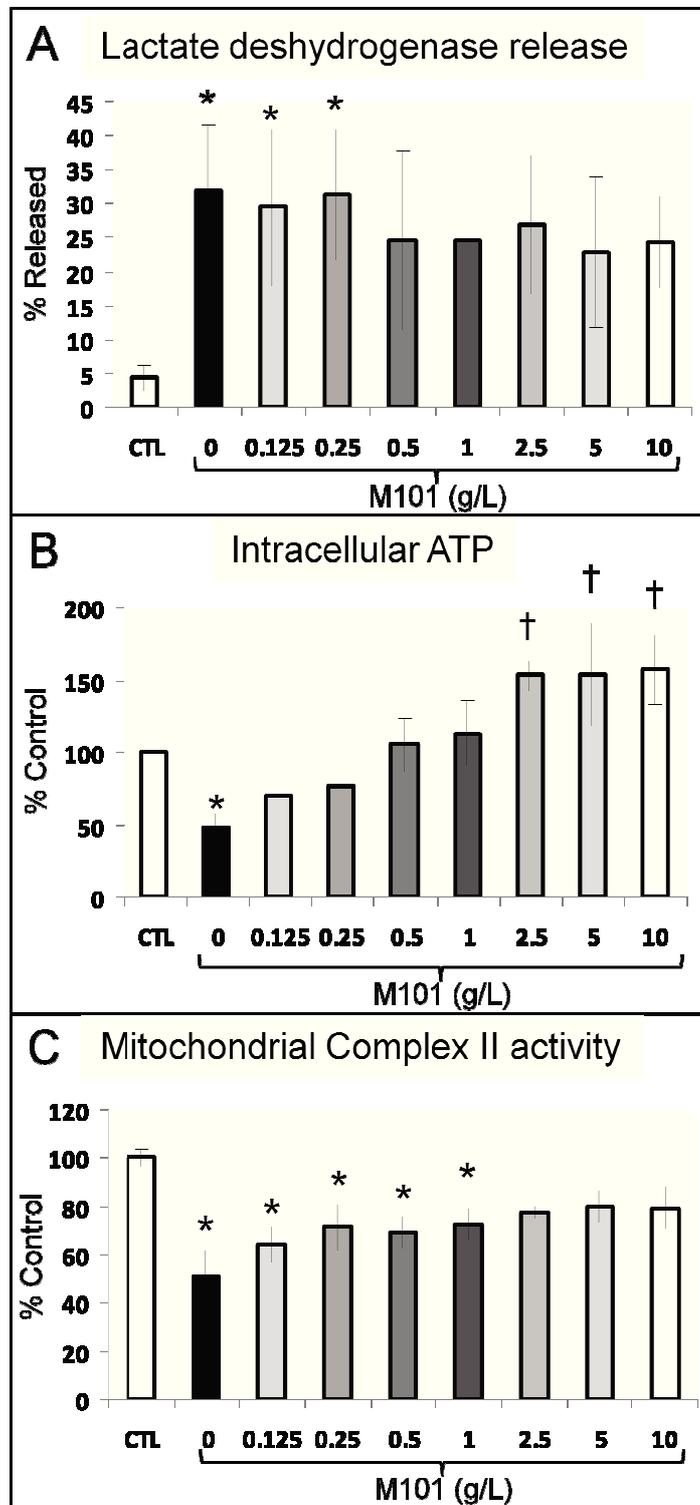
**Figure 4: Kidney function following reperfusion. A:** Sequential measurement of serum creatinine in the first two weeks following transplantation. **B:** Areas under the curve measurements in the first two weeks after transplantation. **C:** Serum creatinine levels at 1 and 3 months after transplantation. Shown are mean±SEM. Statistics: \*:  $p \leq 0.05$  UW+1g/L M101 vs UW; §:  $p \leq 0.05$  UW+2g/L M101 vs UW; #:  $p \leq 0.05$  UW+5g/L M101 vs UW. N=4-5.

**Figure 5: histologie J7**

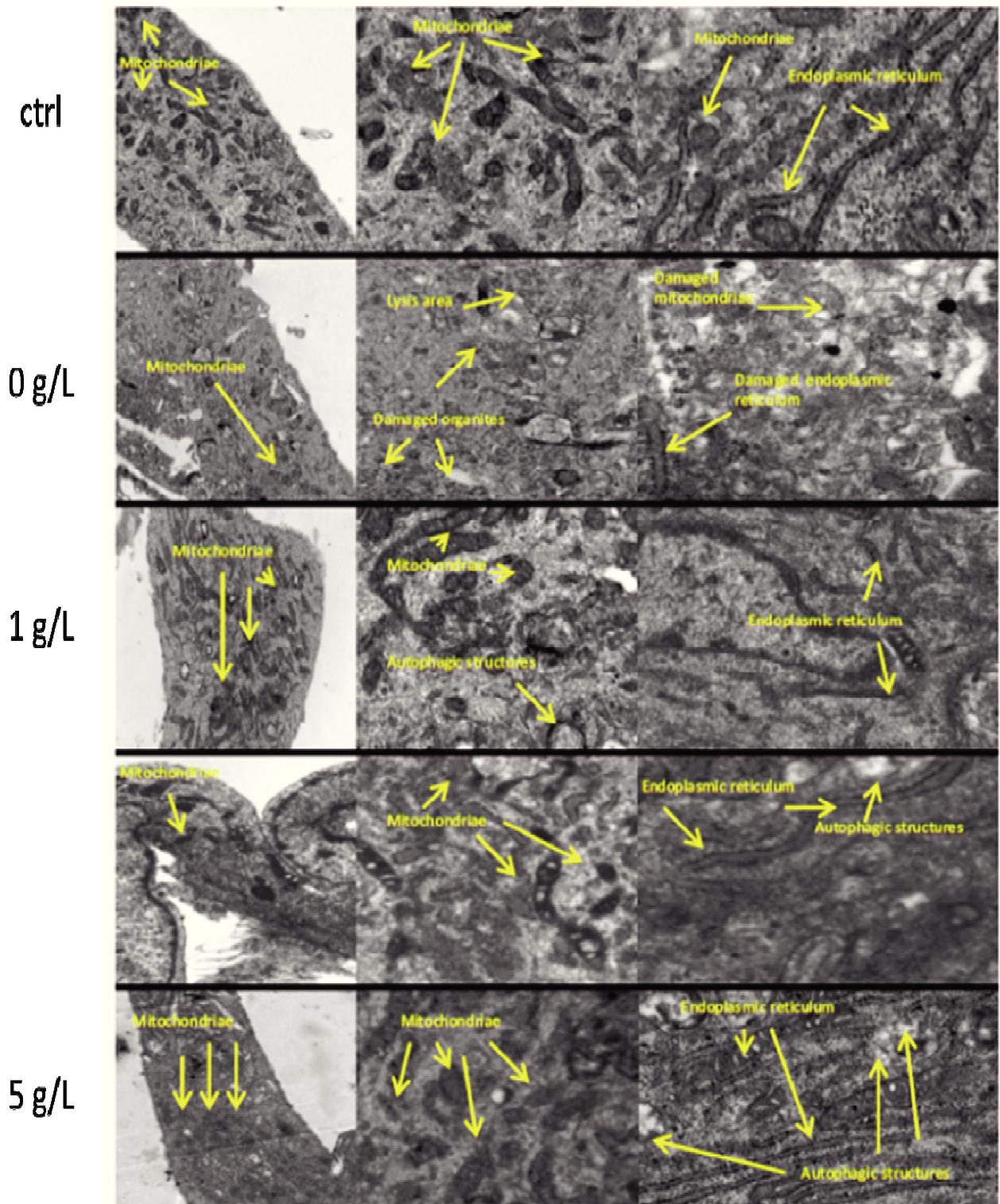
**Figure 6: Kidney outcome at 3 months. A:** Representative red Sirius staining for UW, UW+1g/L M101, UW+2g/L M101), UW+5g/L M101: **B:** Quantification of fibrosis development in each group. Shown are mean±SEM. Statistics: \*:  $p \leq 0.05$  UW+1g/L M101 vs UW; §:  $p \leq 0.05$  UW+2g/L M101 vs UW; #:  $p \leq 0.05$  UW+5g/L M101 vs UW\*:  $p < 0.05$  versus UW. N=4-5.

**Figure 1**

**24h Hypoxia**



**Figure 2**



|

**Figure 3**

**24h Hypoxia + 24h Reoxygenation**

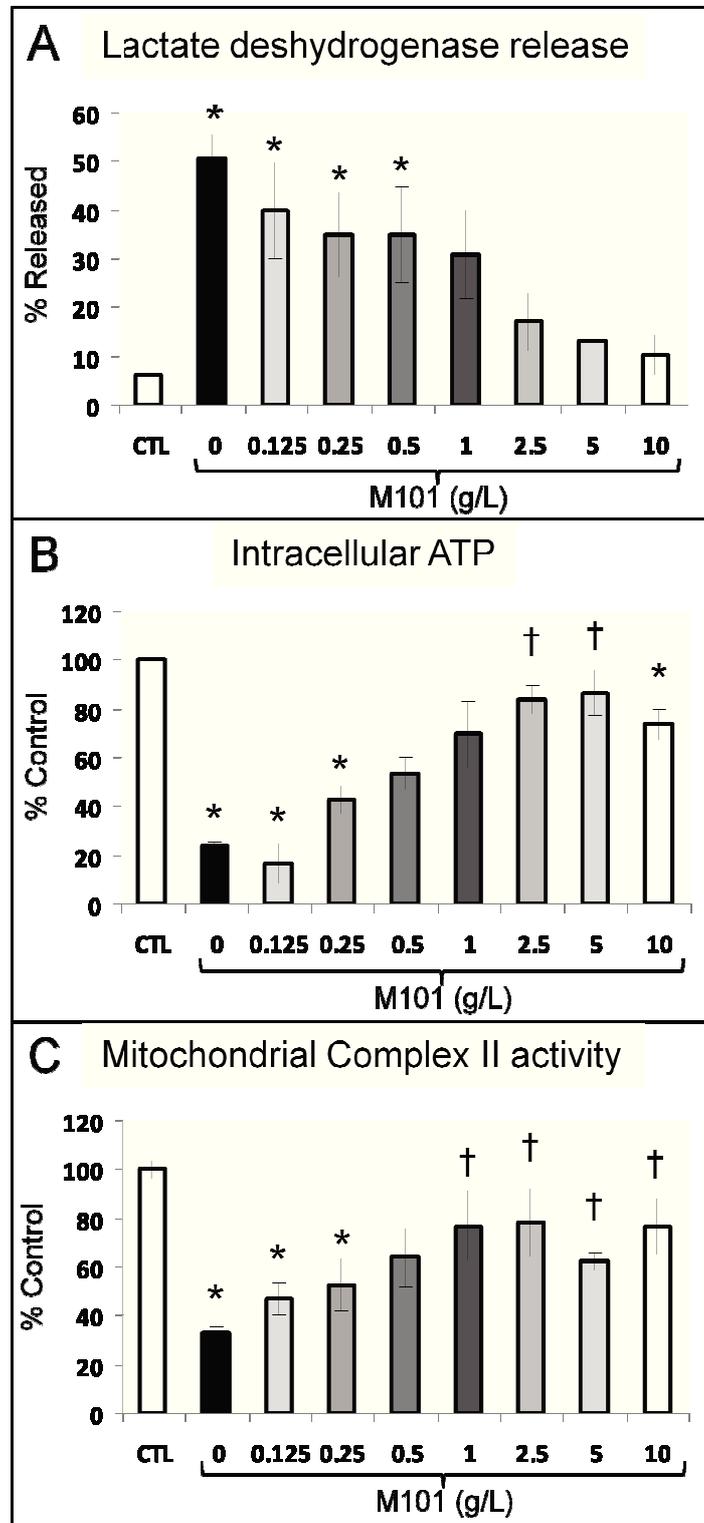
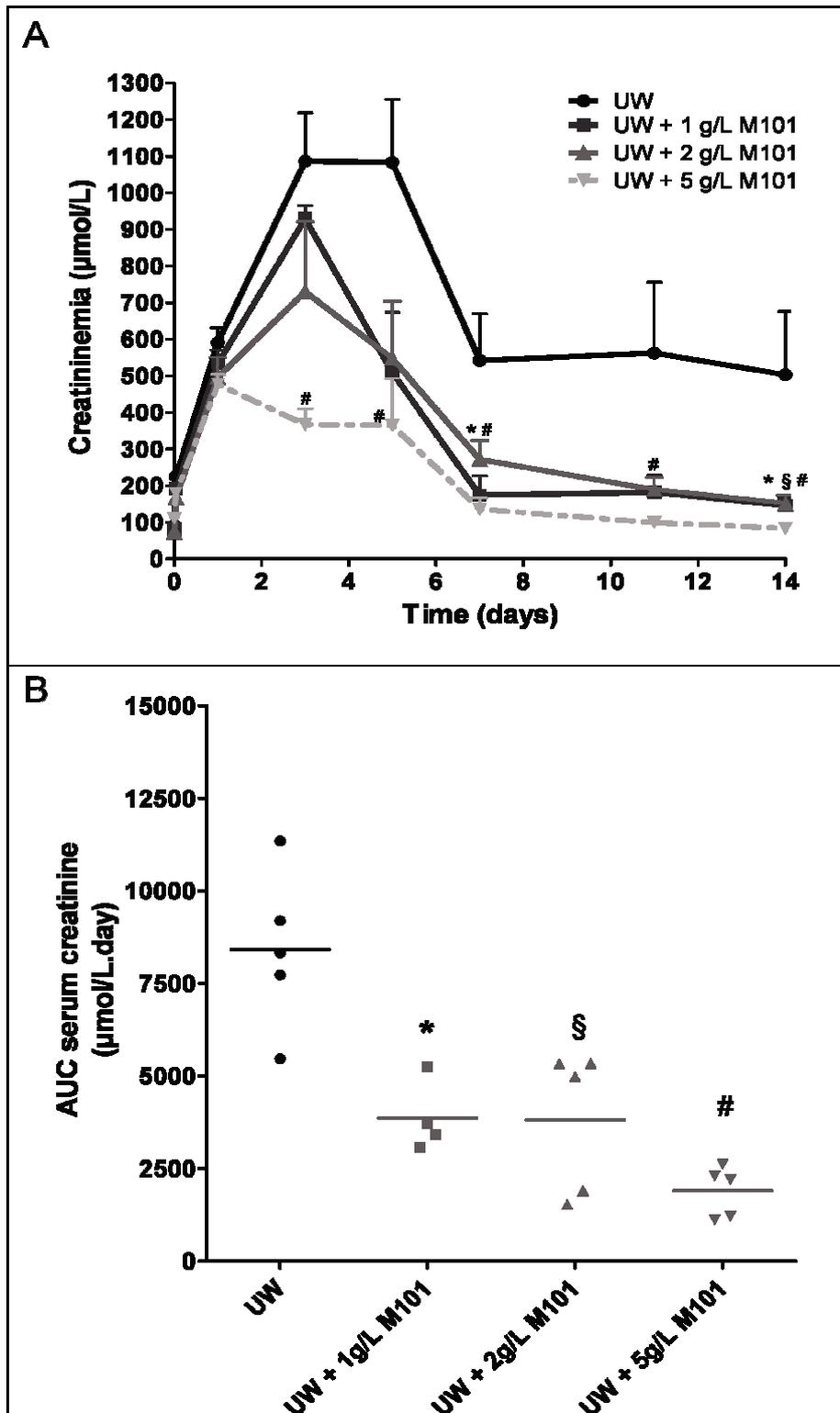


Figure 4



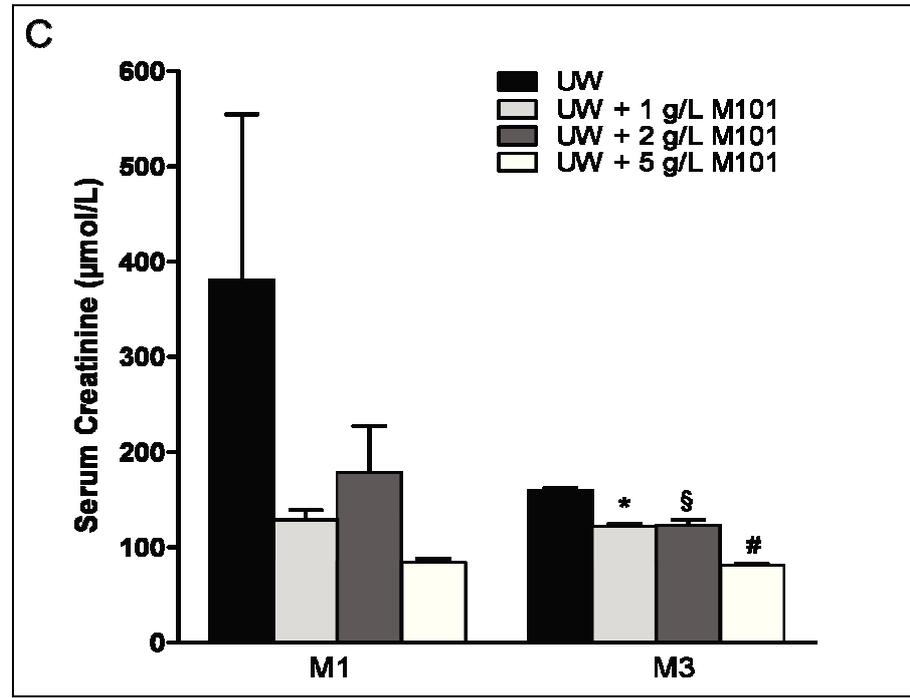


Figure 5

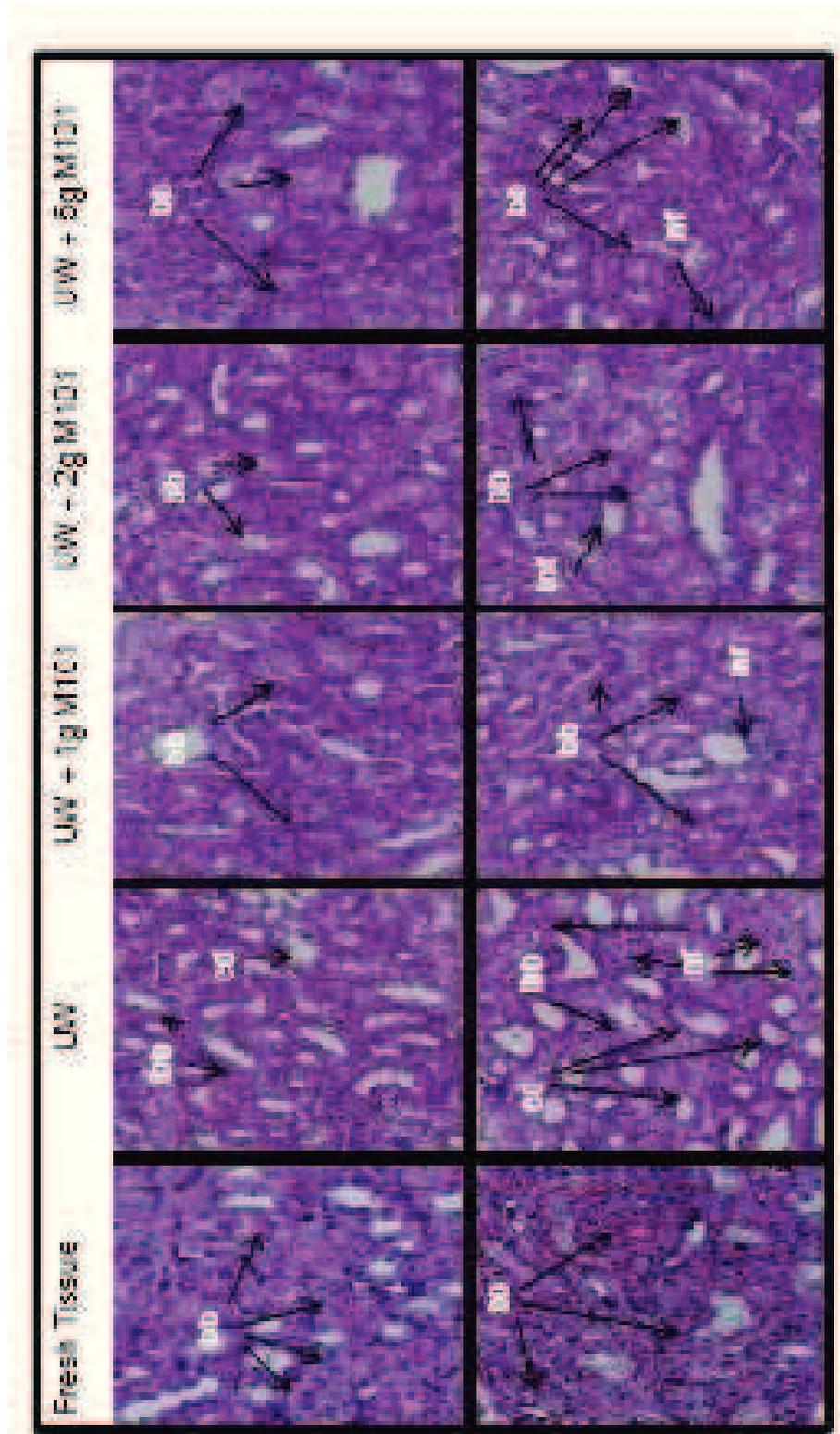
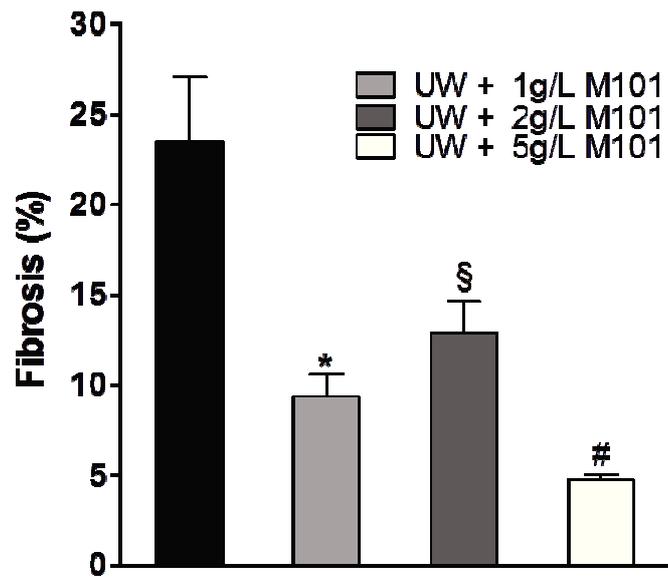
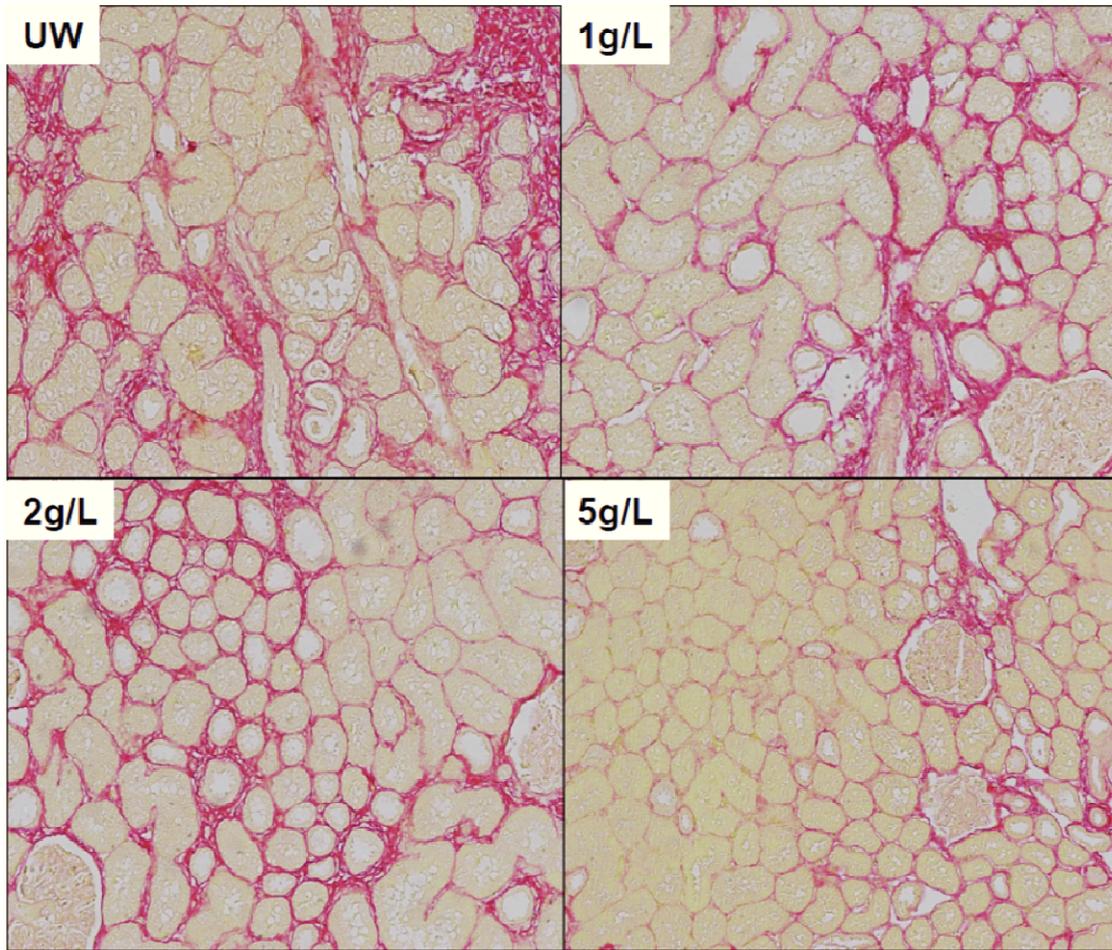


Figure 6



## TABLES

**Table 1: Semi quantitative scoring of *in vitro* lesions observed by electron microscopy in endothelial cells at the end of preservation**

Group	Necrosis	Autophagosomes	Lysed organelles	Swollen mitochondria	Intact Mitochondria
UW	2.8±0.2	0	3±0	>50%	4.8±1.2
UW+1g/L M101	1.4±0.3 *	4.3±1.5	1±1 *	<25%	10.4±0.9
UW+2.5g/L M101	1.4±0.3 *	4.0±1.4	1±0 *	<25%	11.3±1.0 *
UW+5g/L M101	1.3±0.1 *	10.0±1.8 *	1±0 *	<25%	11.2±0.9 *

Semi quantitative scoring was conducted as follows: Necrosis: average number of necrotic bodies per field; Autophagosomes: average number of autophagosomes in observed cell; Lysed organelles: average number of lysed organelles by observed cell; Swollen mitochondria: proportion of observed swollen mitochondria, showing loss of inner membrane crescents; Intact mitochondria: average number of mitochondria by observed cell. Statistics: \*: p<0.05 to UW

**Table 2: Semi quantitative scoring of ischemia reperfusion lesions in kidney grafts at day 7**

Group	BBL	CD	Inflammation
UW	3.5±1.1	3.1±0.3	3.1±0.3
UW+1g/L M101	1±0,8*	0,25±0,5*	1±0*
UW+2g/L M101	1,5±0,6*	0±0*	1±0*
UW+5g/L M101	1±0*	0±0*	0,2±0,4*

Needle biopsies were performed 7 days after transplantation and processed for PAS staining. Semi Quantitative scoring was conducted as indicated in the methods section.

Statistics: \*:  $p < 0.05$  to UW

## REFERENCES

- [1] Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical renal ischemia: a contemporary overview. *The Journal of urology*. 2008 Jul;180(1):19-30.
- [2] Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplantation proceedings*. 2008 Dec;40(10):3279-88.
- [3] Favreau F, Thuillier R, Cau J, Milin S, Manguy E, Mauco G, et al. Anti-thrombin therapy during warm ischemia and cold preservation prevents chronic kidney graft fibrosis in a DCD model. *Am J Transplant*. Jan;10(1):30-9.
- [4] Giraud S, Thuillier R, Belliard A, Hebrard W, Nadeau C, Milin S, et al. Direct thrombin inhibitor prevents delayed graft function in a porcine model of renal transplantation. *Transplantation*. 2009 Jun 15;87(11):1636-44.
- [5] Dragun D, Hoff U, Park JK, Qun Y, Schneider W, Luft FC, et al. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background. *Kidney Int*. 2000 Nov;58(5):2166-77.
- [6] Koo DD, Welsh KI, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation: an immunohistochemical analysis of changes after reperfusion. *The American journal of pathology*. 1998 Aug;153(2):557-66.
- [7] Cassie S, Masterson MF, Polukoshko A, Viskovic MM, Tibbles LA. Ischemia/reperfusion induces the recruitment of leukocytes from whole blood under flow conditions. *Free Radic Biol Med*. 2004 May 1;36(9):1102-11.
- [8] Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *American journal of physiology*. 2004 Aug;287(2):F181-7.
- [9] Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted organs: some new strategies against an old problem. *Am J Transplant*. 2004 Jan;4(1):1.
- [10] Faure JP, Baumert H, Han Z, Goujon JM, Favreau F, Dutheil D, et al. Evidence for a protective role of trimetazidine during cold ischemia: targeting inflammation and nephron mass. *Biochemical pharmacology*. 2003 Dec 1;66(11):2241-50.
- [11] Hauet T, Goujon JM, Vandewalle A, Baumert H, Lacoste L, Tillement JP, et al. Trimetazidine reduces renal dysfunction by limiting the cold ischemia/reperfusion injury in autotransplanted pig kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Jan;11(1):138-48.
- [12] Jayle C, Favreau F, Zhang K, Doucet C, Goujon JM, Hebrard W, et al. Comparison of protective effects of trimetazidine against experimental warm ischemia of different durations: early and long-term effects in a pig kidney model. *American journal of physiology*. 2007 Mar;292(3):F1082-93.
- [13] Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988 Apr;45(4):673-6.
- [14] Hosgood SA, Nicholson HF, Nicholson ML. Oxygenated kidney preservation techniques. *Transplantation*. 2012 Mar 15;93(5):455-9.
- [15] Favreau F, Thuillier R, Cau J, Milin S, Manguy E, Mauco G, et al. Anti-thrombin Therapy During Warm Ischemia and Cold Preservation Prevents Chronic Kidney Graft Fibrosis in a DCD Model. *Am J Transplant*. 2009 Dec 2.
- [16] Bernhardt WM, Gottmann U, Doyon F, Buchholz B, Campean V, Schodel J, et al. Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs

survival in an allogenic kidney transplant model. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009 Nov 23.

[17] Bos EM, Leuvenink HG, Snijder PM, Kloosterhuis NJ, Hillebrands JL, Leemans JC, et al. Hydrogen Sulfide-Induced Hypometabolism Prevents Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Jul 23.

[18] Hosgood SA, Nicholson ML. Hydrogen sulphide ameliorates ischaemia-reperfusion injury in an experimental model of non-heart-beating donor kidney transplantation. *The British journal of surgery*. 2009 Dec 23.

[19] Kumar S, Allen DA, Kieswich JE, Patel NS, Harwood S, Mazzon E, et al. Dexamethasone Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Sep 24.

[20] Yoshida J, Ozaki KS, Nalesnik MA, Ueki S, Castillo-Rama M, Faleo G, et al. Ex vivo Application of Carbon Monoxide in UW Solution Prevents Transplant-Induced Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Pigs. *Am J Transplant*. Feb 25.

[21] Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation*. 2007 May 27;83(10):1289-98.

[22] Matsumoto S, Kuroda Y. Perfluorocarbon for organ preservation before transplantation. *Transplantation*. 2002 Dec 27;74(12):1804-9.

[23] Kuroda Y, Kawamura T, Suzuki Y, Fujiwara H, Yamamoto K, Saitoh Y. A new, simple method for cold storage of the pancreas using perfluorochemical. *Transplantation*. 1988 Sep;46(3):457-60.

[24] Kakehata J, Yamaguchi T, Togashi H, Sakuma I, Otani H, Morimoto Y, et al. Therapeutic Potentials of an Artificial Oxygen-Carrier, Liposome-Encapsulated Hemoglobin, for Ischemia/Reperfusion-Induced Cerebral Dysfunction in Rats. *Journal of pharmacological sciences*. Sep 11.

[25] Spahn DR, Kocian R. Artificial O<sub>2</sub> carriers: status in 2005. *Current pharmaceutical design*. 2005;11(31):4099-114.

[26] Regner KR, Nilakantan V, Ryan RP, Mortensen J, White SM, Shames BD, et al. Protective effect of Lifer solution in experimental renal ischemia-reperfusion injury. *The Journal of surgical research*. 2010 Dec;164(2):e291-7.

[27] Farrar D, Grocott M. Intravenous artificial oxygen carriers. *Hosp Med*. 2003 Jun;64(6):352-6.

[28] Thuillier R, Dutheil D, Trieu MT, Mallet V, Allain G, Rousselot M, et al. Supplementation With a New Therapeutic Oxygen Carrier Reduces Chronic Fibrosis and Organ Dysfunction in Kidney Static Preservation. *Am J Transplant*. 2011 Sep;11(9):1845-60.

[29] Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, Lagente V, Pirow R, Rees JF, et al. *Arenicola marina* extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnology journal*. 2006 Mar;1(3):333-45.

[30] Rousselot M, Le Guen D, Zal F. Novel dissociation mechanism of a polychaetous annelid extracellular haemoglobin. *The FEBS journal*. 2006 Apr;273(7):1582-96.

[31] Zal F, Green BN, Lallier FH, Vinogradov SN, Toulmond A. Quaternary structure of the extracellular haemoglobin of the lugworm *Arenicola marina*: a multi-angle-laser-light-scattering and electrospray-ionisation-mass-spectrometry analysis. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1997 Jan 15;243(1-2):85-92.

- [32] European Commission- Enterprise and Industry: EudraLex. The rules governing medicinal products in the European Union. Vol 4. Good manufacturing practice. Medicinal products for human and veterinary use. Part II: Basic requirements for active substances used as starting materials. Brussels, Belgium, 2010. [http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol4/2007\\_09\\_gmp\\_part2\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol4/2007_09_gmp_part2_en.pdf).
- [33] Hauet T, Goujon JM, Baumert H, Petit I, Carretier M, Eugene M, et al. Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotransplanted pig kidneys. *Kidney international*. 2002 Aug;62(2):654-67.
- [34] Grimm PC, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Stern E, Jeffery J, et al. Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jun;14(6):1662-8.
- [35] Favreau F, Rossard L, Zhang K, Desurmont T, Manguy E, Belliard A, et al. Expression and modulation of translocator protein and its partners by hypoxia reoxygenation or ischemia and reperfusion in porcine renal models. *American journal of physiology*. 2009 Jul;297(1):F177-90.
- [36] Thuillier R, Favreau F, Celhay O, Macchi L, Milin S, Hauet T. Thrombin inhibition during kidney ischemia-reperfusion reduces chronic graft inflammation and tubular atrophy. *Transplantation*. 2010 Sep 27;90(6):612-21.
- [37] Pereira-Sampaio MA, Favorito LA, Sampaio FJ. Pig kidney: anatomical relationships between the intrarenal arteries and the kidney collecting system. Applied study for urological research and surgical training. *The Journal of urology*. 2004 Nov;172(5 Pt 1):2077-81.
- [38] El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant*. 2009 Mar;9(3):527-35.