

THÈSE

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

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)
Secteur de recherche : Biologie, Médecine, Santé

Présentée par :
Geraldine Allain

Greffons rénaux issus des donneurs décédés par arrêt circulatoire : optimisation du reconditionnement chez le donneur et de la conservation hypothermique

Directeur(s) de Thèse :
Christophe Jayle, Thierry Hauet

Soutenue le 21 décembre 2018 devant le jury

Jury :

Président	Pascal Thomas	Professeur et praticien hospitalier, Université d'Aix-Marseille
Rapporteur	Pascal Leprince	Professeur et praticien hospitalier, Université P. et M. Curie, Paris
Rapporteur	Olaf Mercier	Professeur et praticien hospitalier, Université de Paris Sud
Membre	Christophe Jayle	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers
Membre	Pierre Corbi	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers
Membre	Antoine Thierry	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers

Pour citer cette thèse :

Geraldine Allain. *Greffons rénaux issus des donneurs décédés par arrêt circulatoire : optimisation du reconditionnement chez le donneur et de la conservation hypothermique* [En ligne]. Thèse Biologie, Médecine, Santé. Poitiers : Université de Poitiers, 2018. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

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

Ecole Doctorale : BioSanté N°524

Secteur de Recherche : Biologie, Médecine, Santé

Présentée par :

Géraldine ALLAIN

GREFFONS RENAUX ISSUS DES DONNEURS DECEDES PAR ARRET CIRCULATOIRE : OPTIMISATION DU RECONDITIONNEMENT CHEZ LE DONNEUR ET DE LA CONSERVATION HYPOTHERMIQUE

Directeurs de Thèse :
Monsieur le Professeur Christophe JAYLE
Monsieur le Professeur Thierry HAUET

Soutenue le 21 décembre 2018

devant la Commission d'Examen

JURY

Monsieur le Professeur Pascal LEPRINCE
Monsieur le Professeur Olaf MERCIER
Monsieur le Professeur Pascal-Alexandre THOMAS
Monsieur le Professeur Antoine THIERRY
Monsieur le Professeur Pierre CORBI
Monsieur le Professeur Christophe JAYLE

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement Messieurs les Professeurs Pascal LEPRINCE et Olaf MERCIER d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également Messieurs les Professeurs Pascal-Alexandre THOMAS, Antoine THIERRY et Pierre CORBI d'avoir accepté d'examiner ce travail.

C'est un honneur que chacun d'entre vous soit membre du jury.

Je remercie Monsieur le Professeur Christophe JAYLE de s'être investi toutes ces années dans ce travail et de l'avoir dirigé ; ainsi que Monsieur le Professeur Thierry HAUET pour son accueil au sein de l'unité Inserm et son encadrement depuis mon master 2.

Un grand merci à chacun des membres de l'U1082 ... et tout particulièrement à Monsieur le Pr Benoît BARROU à l'origine de ce travail, à Monsieur le Pr Jean-Michel GOUJON pour son expertise histologique, à Messieurs les Docteurs Raphaël THUILLIER et Sébastien GIRAUD, pour sa disponibilité et son aide considérable.

Un grand merci également à toute l'équipe de Surgères : William, Catherine, Pierre, Irène, Joris, Esther ...

A Minh-Tri et Olivier pour m'avoir initiée à la greffe rénale porcine.

Et bien sûr, je remercie Thomas, Pierre-Olivier, Jérôme, Jacques et Thibaut ; ce fut un plaisir de garder les cochons avec vous.

RESUME

La transplantation est la meilleure alternative en cas d'insuffisance rénale terminale. Face à la pénurie de greffons, les équipes de transplantation se sont tournées notamment vers les donneurs décédés par arrêt circulatoire (DDAC) non contrôlés. Ces greffons soumis à une période d'ischémie chaude sont plus fragiles. Des méthodes de reconditionnement chez le donneur par refroidissement *in situ* (RIS) et circulation régionale normothermique (CRN) se sont développées afin de réduire les lésions d'ischémie-reperfusion. Le choix de la méthode est laissé à l'appréciation de chaque équipe et il existe une grande hétérogénéité des pratiques. Après prélèvement, l'utilisation des machines de perfusion hypothermique (MPH) est généralement recommandée. L'optimisation de ces phases de reconditionnement chez le donneur et de conservation hypothermique apparaît comme un enjeu majeur de santé publique. Concernant l'optimisation du mode de reconditionnement, la mise au point d'un modèle préclinique porcin parfaitement reproductible a permis de mettre en évidence une supériorité de la CRN sur le RIS. Une durée de CRN de 4 heures minimum sans dépasser 6 heures paraît optimale. Concernant la conservation hypothermique, les MPH permettent le maintien du niveau d'expression des gènes retrouvé en fin de CRN. L'ajout d'une oxygénation active en MPH ou de curcumine en solution statique améliore le devenir du greffon à court et long termes dans un modèle préclinique d'autogreffe. Ce travail pourrait s'étendre à l'étude d'autres organes, d'autres durées d'ischémie chaude et aux DDAC contrôlés afin d'élargir encore le nombre d'organes éligibles à la transplantation.

Mots clés : Transplantation rénale – Modèle préclinique – Ischémie-reperfusion – Donneurs décédés après arrêt circulatoire – Circulation régionale normothermique – Machines de perfusion hypothermique

ABSTRACT

Transplantation is the best alternative to end-stage renal disease. The shortage of grafts led the transplant teams to consider uncontrolled deceased donors after circulatory death (DCDs). These grafts suffered from a period of warm ischemia and are more vulnerable. Reconditioning methods in the donor by *in situ* cooling (ISC) and normothermic regional perfusion (NRP) have been developed to reduce the ischemia-reperfusion injuries. Each team has the choice as to the method and there are many different practices. After removal of kidneys, the use of hypothermic perfusion machines (HPM) is generally recommended. The optimization of reconditioning in the donor and hypothermic preservation appears as a major public health challenge. About optimization of the reconditioning method, the development of a high reproducible preclinical porcine model allowed to highlight the superiority of RNP over ISC. NRP duration of 4 hours minimum without exceeding 6 hours seems optimal. About hypothermic preservation, HPM allows to maintain the level of expression of the genes found at the end of RNP. The addition of active oxygenation to HPM or curcumin in static solution improves the graft outcomes in the short and long terms in a preclinical model of auto transplantation. This work could be extended to the study of other organs, other durations of warm ischemia and to controlled DCDs in order to further increase the number of transplantable grafts.

Key words: Renal transplantation – Preclinical model – Ischemia-reperfusion – Donors after circulatory determination of death – Normothermic regional perfusion – Hypothermic machine perfusion

ABBREVIATIONS

ABM	Agence de la Biomédecine
ACT	<i>Activated clotting time</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
ASAT	Aspartate amino-transférase
CDC	Cyclodextrine-curcumine
CEC	Circulation extracorporelle
CRN	Circulation régionale normothermique
DDAC	Donneur décédé après arrêt circulatoire
DME	Donneur en mort encéphalique
DV	Donneur vivant
ECMO	<i>Extracorporeal membrane oxygenation</i>
EPO	Erythropoïétine
FT	Facteur tissulaire
Glut-1	Transporteur de glucose de type 1
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i>
HMGB-1	<i>High mobility group box-1</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
HO-1	Hémoxygénase-1
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IL	Interleukine
IFN	Interféron
IR	Ischémie-reperfusion
IV	Intraveineux
KIM-1	<i>Kidney injury molecule-1</i>
KPS-1	<i>Kidney perfusion solution-1</i>
LDH	Lactate déshydrogénase
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MPH	Machine de perfusion hypothermique

NFP	Non fonction primaire
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i>
NGAL	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Oxyde nitrite synthase (e : forme endothéliale ; i : forme induite)
PAR	<i>Protease-activated receptor</i>
PARP	Poly (adénosine diphosphate ribose) polymérase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyéthylène glycol
RIS	Refroidissement <i>in situ</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RRF	Reprise retardée de fonction
SCOT	Solution de conservation des organes et des tissus
SIRS	Syndrome inflammatoire de réponse systémique
SLA	<i>Swine leucocyte antigen</i>
α -SMA	<i>α-Smooth muscle actin</i>
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
UW	<i>University of Wisconsin</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	11
1. La pénurie de greffons rénaux : un problème de santé publique.....	12
2. Stratégies d’expansion du nombre de greffons rénaux.....	14
2.1. Expansion à partir des DME	14
2.2. Expansion à partir des DV	16
3. Les donneurs décédés après arrêt circulatoire (DDAC)	17
4. Des pratiques hétérogènes à travers le monde.....	22
5. Ischémie-reperfusion (IR) en transplantation rénale	26
5.1. Les lésions d’ischémie	26
5.2. Adaptation à l’hypoxie.....	27
5.3. Les lésions de reperfusion.....	27
5.4. Réponse immunitaire innée.....	30
5.5. Réponse immunitaire adaptative.....	31
5.6. Conséquences sur le greffon rénal	32
6. Stratégies de réduction des lésions d’IR.....	33
6.1. Gestion du donneur et du receveur	33
6.2. Conservation statique hypothermique.....	33
6.3. Moyens pharmacologiques	35
6.4. Conditionnement ischémique.....	37
6.5. Conservation dynamique.....	38
7. CEC, inflammation et fonction rénale	40
7.1. CEC et inflammation	40
7.2. CEC et fonction rénale.....	43
8. Objectif du travail.....	44
PARTIE I : OPTIMISATION DU RECONDITIONNEMENT CHEZ LE DONNEUR	46
1. Mise au point d’un modèle expérimental porcin de DDAC avec reconditionnement par CRN.....	47
1.1. Introduction.....	56
1.2. Matériel et méthode (synthèse).....	56
1.3. Résultats.....	57
1.4. Discussion	58

1.5. Conclusion	60
1.6. Données complémentaires	61
1.6.1. Matériel et méthode.....	62
1.6.2. Résultats et discussion.....	63
2. Comparaison du reconditionnement par CRN et par RIS	66
2.1. Introduction.....	67
2.2. Matériel et méthode	67
2.2.1. Conditionnement préopératoire et protocole d'anesthésie	67
2.2.2. Procédure de RIS.....	68
2.2.3. Procédure de CRN.....	69
2.2.4. Procédure d'allogreffe.....	69
2.2.5. Suivi des animaux	70
2.2.6. Collecte et analyse des échantillons	71
2.2.7. Analyses statistiques	72
2.2.8. Groupes étudiés	72
2.3. Résultats.....	72
2.3.1. Paramètres de perfusion	73
2.3.2. Reprise de diurèse	73
2.3.3. Suivi de la fonction rénale jusqu'à 3 mois post-transplantation	75
2.3.4. Analyse histologique	79
2.3.5. Biomarqueurs	80
2.4. Discussion	82
2.5. Conclusion	84
3. Détermination du temps optimal de reconditionnement par CRN	86
3.1. Introduction.....	102
3.2. Matériel et méthode (synthèse)	102
3.3. Résultats.....	103
3.3.1. Suivi des paramètres hémodynamiques pendant la CRN.....	103
3.3.2. Activation de la voie de HIF-1 α au cours de la CRN	104
3.3.3. Régulation transitoire des marqueurs de souffrance rénale et de malperfusion au cours de la CRN	104
3.3.4. Régulation transitoire des paramètres de l'hémostase au cours de la CRN	105
3.3.5. Contrôle transitoire par la CRN de l'initiation d'une réponse inflammatoire... ..	105
3.3.6. Absence d'impact de la CRN sur l'histologie rénale	106

3.3.7. Amélioration de la perfusion rénale après CRN	106
3.3.8. Amélioration de la fonction rénale précoce et tardive après 4 à 6 heures de CRN	106
3.4. Discussion	107
3.5. Conclusion	112
PARTIE II : OPTIMISATION DE LA CONSERVATION HYPOTHERMIQUE	113
1. Effet des MPH sur les greffons rénaux en post-CRN.....	114
1.1. Introduction.....	115
1.2. Matériel et méthode	115
1.2.1. Protocole chirurgical	115
1.2.2. Analyses histologiques	116
1.2.3. Analyses transcriptomiques par PCR quantitative	116
1.2.4. Analyses statistiques	116
1.3. Résultats.....	117
1.3.1. Histologie standard.....	117
1.3.2. Immunohistochimie.....	117
1.3.3. Analyse transcriptomique tissulaire	119
1.4. Discussion	120
2. Apport de l'oxygénation active en MPH.....	122
2.1. Introduction.....	131
2.2. Matériel et méthode (synthèse)	132
2.3. Résultats.....	132
2.3.1. Paramètres de perfusion	132
2.3.2. Reprise de fonction.....	132
2.3.3. Fonction à long terme.....	133
2.3.4. Analyses histologiques à 3 mois	133
2.3.5. Etude de la corrélation entre les marqueurs de lésions d'IR et les paramètres fonctionnels	134
2.4. Discussion	134
2.5. Conclusion	137
3. Intérêt de la curcumine en préservation statique	138
3.1. Introduction.....	150
3.2. Matériel et méthode (synthèse)	151
3.3. Résultats.....	152

3.3.1. Absorption efficace par les cellules du complexe CDC.....	152
3.3.2. Détermination de la dose efficace de CDC <i>in vitro</i>	152
3.3.3. Etude des bénéfices du CDC contre les lésions d'IR <i>in vitro</i>	152
3.3.4. Evaluation préclinique des effets du CDC <i>in vivo</i>	153
3.4. Discussion	154
3.5. Conclusion	156
SYNTHESE ET PERSPECTIVES	157
1. Justification du travail	158
2. Concernant le reconditionnement chez le donneur.....	159
3. Concernant la conservation hypothermique	161
4. Extension aux DDAC contrôlés	162
5. Conclusion	163
VALORISATION DU TRAVAIL	164
REFERENCES	166

INTRODUCTION

1. La pénurie de greffons rénaux : un problème de santé publique

La transplantation est la meilleure alternative thérapeutique en cas d'insuffisance rénale terminale, du fait de l'amélioration de l'espérance et de la qualité de vie des patients [1]. Il s'agit également de la meilleure solution en termes de dépense de santé publique [2].

La première transplantation rénale a été réalisée il y a plus de 60 ans. Il s'agit de l'organe le plus couramment transplanté à l'échelle mondiale mais les équipes de transplantation sont confrontées à une pénurie de greffons [3].

Selon la base de données américaine *Organ Procurement and Transplantation Network* de 2016 [4], 95 459 patients étaient en attente de greffe à la fin de l'année, avec 30 869 nouveaux patients inscrits pour seulement 18 913 transplantés. L'attente est supérieure ou égale à 5 ans pour 36,1% des candidats.

A l'échelle européenne, selon le rapport de la zone Eurotransplant, fondée en 1967 et comprenant huit pays (Allemagne, Pays-Bas, Belgique, Luxembourg, Autriche, Slovaquie, Croatie et depuis 2013 la Hongrie), 1 647 donneurs de reins décédés ont été recensés en 2017 soit 5,1% de moins par rapport à 2016 et 11 105 patients restent en attente d'une greffe, soit 9,1% de plus par rapport à 2016 [5].

Au niveau national, selon le rapport annuel de l'Agence de la Biomédecine (ABM) (**tableau 1**) [6], 5 280 nouveaux patients ont été inscrits sur la liste nationale d'attente alors que seulement 3 782 greffes ont été réalisées au cours de l'année 2017. Au 1^{er} janvier 2018, 14 921 patients attendent un greffon, soit une augmentation progressive des malades restant en attente au 1^{er} janvier de chaque année de 49% (4 424 patients) en 5 ans.

	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Malades restant en attente au 1er janvier de chaque année	9 089	9 892	10 818	11 807	12 541	13 513	14 291
Nouveaux inscrits dans l'année	4 346	4 555	4 793	4 843	5 269	5 280	-
Décédés en attente dans l'année	261	284	302	307	327	352	-
Sortis de liste d'attente	238	271	270	316	355	368	-
Greffes	3 044	3 074	3 232	3 486	3 615	3 782	-
dont greffes avec donneur vivant	357	401	514	547	576	611	-
dont greffes avec DDAC MI-II	81	78	54	62	59	57	-
dont greffes avec DDAC MIII	-	-	-	27	86	178	-

Tableau 1 : Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats à la greffe rénale [6].

Sur les six dernières années, on constate une augmentation des inscriptions de 21,5% entre 2012 et 2017, soit 934 nouveaux patients. Cette augmentation peut s'expliquer par le vieillissement de la population et l'augmentation de l'incidence des maladies pourvoyeuses d'insuffisance rénale, notamment les maladies cardio-vasculaires.

L'âge moyen des nouveaux patients s'élève progressivement avec 54,2 ans en 2017 contre 51,3 ans en 2012. Les nouveaux inscrits de 70 ans et plus représentent ainsi 14,6% des patients, contre 7,5% en 2012. Parmi les nouveaux inscrits, on constate par ailleurs 15,1% de candidats à une retransplantation et 39,8% de patients non dialysés.

En parallèle, le nombre de décès sur liste d'attente reste stable avec 1,9% en 2017.

Le temps d'attente sur liste s'allonge également progressivement avec une probabilité d'être greffé à 24 mois passant de 61% à 42% entre les périodes 1996-1999 et 2012-2017. Le nombre total de candidats pour un greffon est ainsi passé de 4,4 en 2012 à 5 en 2017.

A noter que l'accès à la greffe varie significativement selon les groupes sanguins et selon les équipes, d'une région à l'autre, en fonction des politiques d'inscription sur liste et des taux de prélèvements.

2. Stratégies d'expansion du nombre de greffons rénaux

De façon générale, la lutte contre l'opposition au don est une des mesures phares. Le taux en France est depuis les années 1990 supérieur à 30% (32% contre 15,3% en Espagne en 2015 [7]). La diminution du taux de refus passe par la formation des équipes de coordination, de réanimation et la mise en place de campagnes d'information pour le grand public.

D'autres perspectives ont été étudiées spécifiquement pour chacun des trois types de donneurs actuellement éligibles au prélèvement rénal : les donneurs en mort encéphalique (DME), les donneurs vivants (DV) et les donneurs décédés après arrêt circulatoire (DDAC).

2.1. Expansion à partir des DME

Les critères de sélection des DME se sont étendus à la fin des années 1990 introduisant le concept de donneurs à critères élargis [3]. Il s'agit de donneurs plus âgés, présentant des facteurs de risque cardio-vasculaire, un certain degré d'insuffisance rénale ou dont les organes ont été exposés à une ischémie froide prolongée [8]. Les greffons rénaux peuvent être proposés à la transplantation avec l'argument que la survie des patients recevant ces greffons reste meilleure que celle des patients maintenus en dialyse [3, 8].

Aux Etats-Unis, la proportion de greffons rénaux issus de donneurs de plus de 65 ans est passée de 6,8% à 8,1% entre 1999 et 2008 et le taux de donneurs à critères élargis de 20,3% à 22,7%. Le programme américain de transplantation rénale issue de ces donneurs recommande

une évaluation histologique et la mise en machine de perfusion des greffons, ce qui fait que 40% des reins prélevés ne sont pas transplantés compte-tenu du taux de glomérulosclérose et des paramètres de perfusion lors de la conservation en machine [8].

Ce taux est plus faible en Europe. L'Eurotransplant *Seniors Program* attribut préférentiellement les reins des donneurs de plus de 65 ans aux receveurs de plus de 65 ans, à l'échelle locale ou régionale, afin de minimiser le temps d'ischémie froide. Un appariement entre la qualité du greffon et les co-morbidités du receveur est en effet nécessaire, afin de réduire le taux de greffons non transplantés [9].

En France [6], l'âge moyen des DME augmente progressivement de 41,5 ans en 2000 à 58,3 ans en 2017. L'ABM définit les donneurs à critères élargis comme les donneurs âgés de plus de 60 ans ou de 50 à 59 ans avec au moins deux des facteurs de risque suivants :

- Cause de décès vasculaire ;
- Antécédent d'hypertension artérielle ;
- Créatininémie supérieure à 130 μ mol/L.

Ces organes représentent 50,1% des reins greffés en 2017 soit 1 472 greffons. Depuis 2011, un programme national de mise en machine de perfusion est développé pour ces greffons. Ce programme vise à diminuer la proportion de non fonctions primaires (NFP) et de reprises retardées de fonction (RRF) avec pour objectif à long terme une amélioration de la survie de ces greffons. En 2017, la progression de la mise en machine de perfusion de ces reins de donneurs à critères élargis se poursuit avec un taux de 73,7% contre seulement 13% en 2012. L'utilisation des reins issus de ces donneurs à critères élargis permettrait d'augmenter le nombre de greffons disponibles, diminuant ainsi la durée d'attente sur liste et la morbi-mortalité liée au maintien sur le long terme de la dialyse [10, 11].

2.2. Expansion à partir des DV

La greffe depuis DV existe depuis plus de 60 ans. Il s'agit du transplant de choix avec des taux de survie du greffon et du patient supérieurs à ceux des donneurs décédés, surtout en cas de greffe réalisée avant le début de la dialyse (greffe préemptive) [12].

Le taux de DV varie dans le monde. Aux Etats-Unis, le nombre de DV étaient de 5 335 pour 13 501 donneurs décédés en 2016 [4]. Dans les pays d'Asie ou du Moyen-Orient, la majorité des greffes sont réalisées à partir de DV. Concernant la zone Eurotransplant, 1 293 DV ont été recensés en 2017 pour 3 126 donneurs décédés [5]. En France, toujours selon le rapport annuel de l'ABM, les greffes issues de DV ne représentent que 16,1% de l'activité de l'année 2017, soit 611 patients. Après une hausse importante de 28% en 2014, ce type de greffe poursuit une progression lente. Leur nombre a cependant doublé depuis 2010 [6].

Concernant les possibilités d'expansion de cette catégorie de donneurs, les greffes ABO et HLA incompatibles ont été étudiées [8]. En effet, la non-compatibilité en cas de DV est retrouvée dans environ 50% des cas. L'utilisation de protocoles d'immunosuppression spécifiques a permis l'obtention de meilleurs résultats en termes de survie par rapport à un maintien sur liste d'attente, et en termes économique par rapport à la poursuite d'une dialyse. Initiés aux Etats-Unis, ces protocoles ont également été adoptés en Europe.

L'autre alternative est le don croisé, où un couple donneur-receveur non compatible ABO ou HLA échange leur greffon avec un autre couple présentant le même problème, de façon à ce que chaque receveur se voit attribuer un greffon compatible. Ce programme a été initié aux Pays-Bas puis largement diffusé, au prix d'un véritable challenge logistique. L'utilisation de greffons à critères élargis issus de DV a également été étudiée [3].

3. Les donneurs décédés après arrêt circulatoire (DDAC)

Jusque dans les années 1990, concernant le don *post mortem*, seuls les DME étaient considérés pour la transplantation [8]. En Europe et plus particulièrement aux Pays-Bas, Kootstra a réintroduit le concept de don après décès par arrêt circulatoire, initialement dénommée don à cœur arrêté puis don après décès par arrêt cardiaque. Lors du premier congrès international sur les DDAC organisé par son équipe à Maastricht en 1995, quatre catégories de DDAC ont été définies [13] :

- I : Personnes faisant un arrêt cardiaque en dehors de tout contexte de prise en charge médicalisée et pour lesquelles le prélèvement d'organes ne pourra être envisagé que si la mise en œuvre de gestes de réanimation de qualité a été réalisée moins de 30 minutes après l'arrêt cardiaque (arrêt extra-hospitalier, non contrôlé) ;
- II : Personnes faisant un arrêt cardiaque en présence de secours qualifiés aptes à réaliser un massage cardiaque et une ventilation mécanique efficaces, mais dont la réanimation ne permettra pas une récupération hémodynamique (arrêt extra-hospitalier, non contrôlé) ;
- III : Personnes pour lesquelles une décision d'un arrêt de soins en réanimation est prise en raison de leur pronostic (arrêt intra-hospitalier, contrôlé) ;
- IV : Personnes décédées en mort encéphalique qui font un arrêt cardiaque irréversible au cours de la prise en charge en réanimation (arrêt intra-hospitalier, non contrôlé).

L'utilisation des reins issus de ces donneurs pourrait permettre d'augmenter de 22% à 50% le nombre de greffons disponibles [14].

Au Japon, les DDAC représentent la première source de greffons, la légalisation des prélèvements sur DME étant arrivée tardivement, en octobre 1997 [14].

Après approbation de la *World Health Organization* en 2011, le concept de don après décès par arrêt circulatoire a été de plus en plus accepté, devenant une pratique courante dans près

de la moitié des pays d'Europe, en Amérique du Nord, en partie en Amérique du Sud, en Australie et en Russie [8, 15]. Aux Etats-Unis, les DDAC non contrôlés pourraient représenter près de 22 000 donneurs supplémentaires par an [15]. En Europe, les greffons proviennent surtout des catégories contrôlées III au Royaume-Uni et non contrôlées I et II en France et en Espagne [14]. Le don après arrêt circulatoire représente 40% des greffons au Royaume-Uni. Ce chiffre est comparable dans d'autres pays d'Europe [16].

Certains pays ne pratiquent pas ce type de don comme l'Allemagne, la Hongrie, la Croatie, la Finlande ou encore la Grèce [5, 14].

En Belgique, une nouvelle catégorie de DDAC a vu le jour en 2005, le don après euthanasie, légalisée dans ce pays depuis 2002 [10]. Il est également pratiqué au Luxembourg et aux Pays-Bas [17]. Une nouvelle classification de Maastricht incluant cette catégorie V de donneurs a été validée au cours de la 6^{ème} Conférence internationale sur le don d'organes à Paris en 2013 [17].

Comparés aux reins provenant des DME, les reins issus des DDAC souffrent inévitablement d'une période d'ischémie chaude, depuis l'arrêt circulatoire jusqu'à la mise en œuvre des moyens de préservation, entraînant ainsi des lésions d'ischémie et un risque accru de NFP ou de RRF.

Historiquement, après constatation du décès, le patient était transféré au bloc opératoire où la réalisation d'une laparotomie rapide et la perfusion d'une solution de conservation hypothermique par l'intermédiaire d'un cathéter triple lumière - double ballonnet ou sonde de Gillot, permettaient le refroidissement *in situ* (RIS) des organes. Une alternative consiste à mettre en place ce cathéter par voie fémorale afin de réduire la durée d'ischémie chaude (**figure 1**) [18]. Les greffons étaient ensuite prélevés le plus rapidement possible. La phase d'ischémie froide suivant l'ischémie chaude exacerbait les lésions déjà induites, pouvant conduire à de mauvaises suites post-greffe.

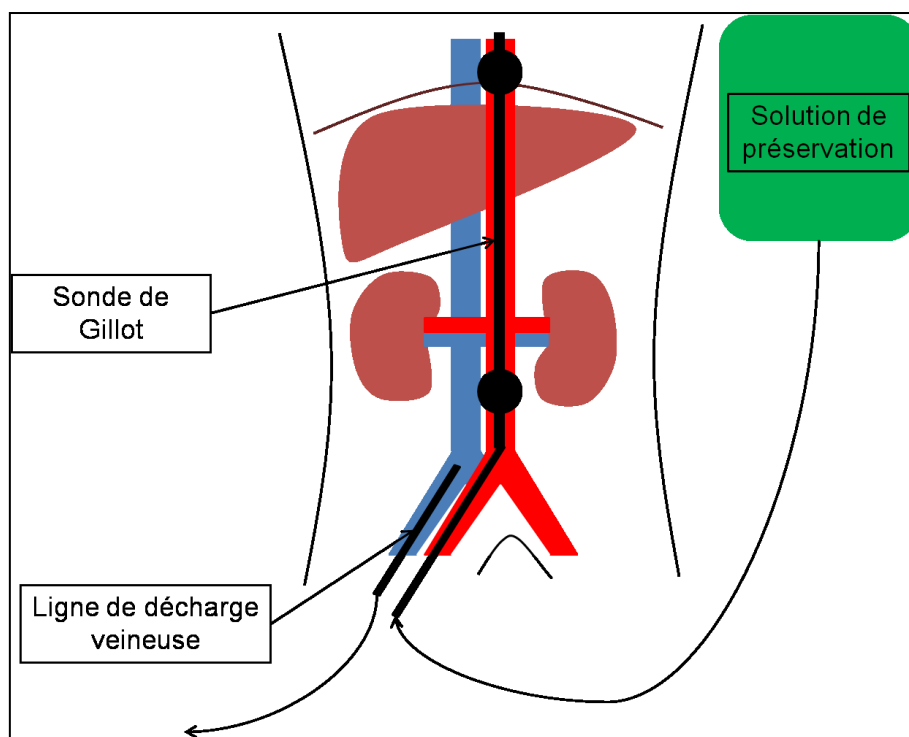


Figure 1 : Principe du refroidissement *in situ*.

Afin de minimiser les lésions liées à l'ischémie chaude, il a été proposé de restaurer une circulation de sang oxygéné au niveau des organes abdominaux, utilisant une *extra-corporeal membrane oxygenation* (ECMO). Il s'agit d'une technique de circulation extracorporelle (CEC) développée initialement pour supporter les fonctions cardio-respiratoires en cas de grande défaillance cardiaque et/ou pulmonaire. Cette technique a été utilisée par la suite pour la réanimation des patients en arrêt cardiaque réfractaire. Le circuit est constitué d'une canule veineuse de drainage reliée à une pompe centrifuge qui va injecter le sang à travers une membrane d'oxygénation et de décarboxylation puis le restituer au patient par une canule de réinjection artérielle. Un ballon d'occlusion intra-aortique est également mis en place par l'artère fémorale controlatérale et positionné au niveau de l'aorte thoracique descendante afin de limiter la circulation à la région sous-diaphragmatique (**figure 2**) [19].

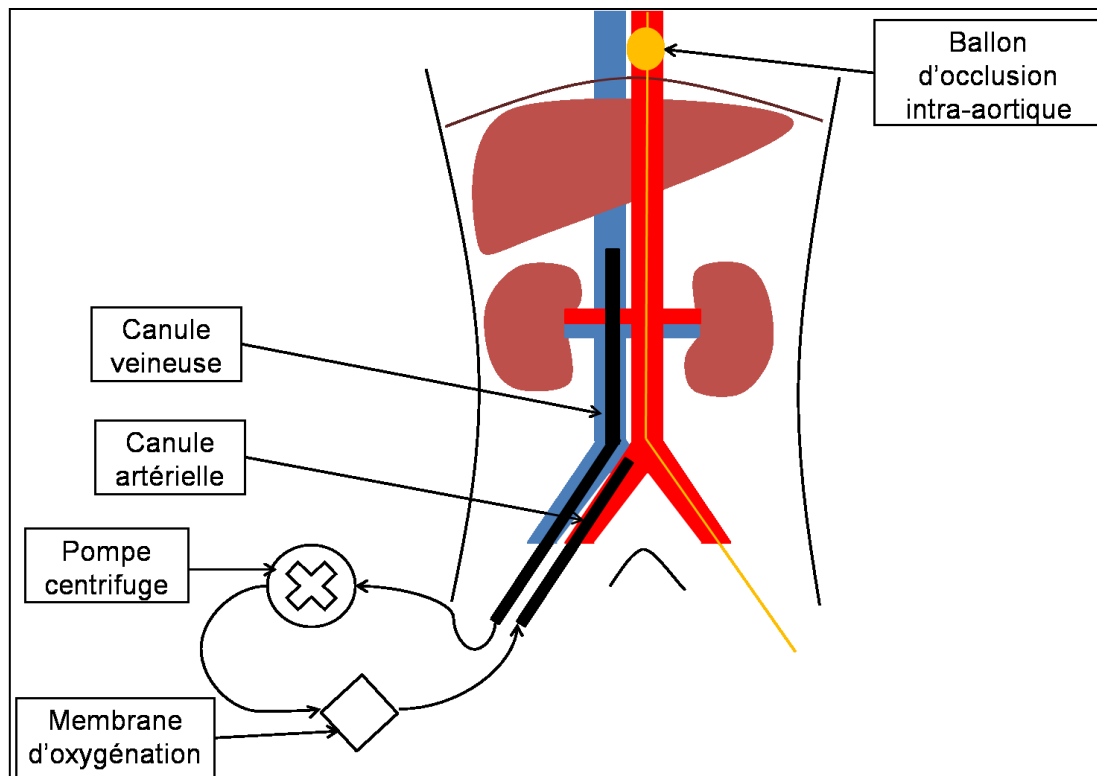


Figure 2 : Principe de la circulation régionale normothermique.

Le concept de circulation régionale normothermique (CRN) a ainsi été décrit en 1997 aux Etats-Unis dans le cadre de la transplantation hépatique [20]. Il s'est ensuite développé en Espagne pour les donneurs de la catégorie II de Maastricht en transplantation hépatique puis rénale avec des résultats encourageants [19, 21].

Après confirmation du décès, différentes manœuvres ont été proposées afin de réduire le temps d'ischémie chaude due à l'arrêt circulatoire : reprise du massage cardiaque externe, reventilation et héparinisation par voie générale avant la mise en place des canules par voie fémorale. Le choix de la normothermie découle de travaux expérimentaux précliniques [21] et cliniques avec notamment le travail réalisé en 2000 par une équipe barcelonaise qui a comparé le RIS (n=44), la CEC hypothermique (n=8) et la CRN (n=8) [22]. Une diminution significative des NFP et des RRF avec des survies de greffon satisfaisantes à long terme ont été mises en évidence pour le groupe CRN. Depuis deux études françaises rétrospectives ont

conforté ces résultats, en 2016 et 2018, avec des effectifs supérieurs (n=19 et n=32 dans les groupes CRN) [23, 24].

Actuellement en France [6], les deux méthodes de reconditionnement, CRN et RIS, sont autorisées. Sur la cohorte 2013-2016, l'ABM rapporte 67,4% de RRF et 6,4% de NFP pour les greffons issus des DDAC non contrôlés contre 19,8% et 3% pour ceux issus des DME à critères standards (**tableau 2**). La survie des greffons de DDAC non contrôlés à 1 an et 5 ans est supérieure à celle des greffons issus des DME à critères élargis (88,8% et 76,4% contre 87,5% et 68,3%) sur la cohorte 2007-2016 (**tableau 3**).

Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature [23, 25-36]. Une publication récente a mis en évidence des résultats comparables sur le devenir à long terme des reins issus de DDAC non contrôlés reconditionnés par CRN et des reins issus de DME à critères standards [37].

Type de donneur		Non fonctions primaires (% hors données manquantes)	Reprises retardées de fonction (% hors données manquantes)
Vivant		50 (2,5)	83 (6,7)
DME à critères standards		165 (3)	903 (19,8)
DME à critères élargis	Avec machine	119 (4,5)	410 (18)
	Sans machine	168 (6,2)	687 (30,4)
DDAC I-II		16 (6,4)	118 (67,4)
DDAC III		4 (3,6)	9 (9,7)

Tableau 2 : Non fonctions primaires et reprises retardées de fonction en fonction de l'origine du greffon (2013-2016) [6].

Type de donneur	n	Survie à 1 mois (%)	Survie à 1 an (%)	Survie à 5 ans (%)
DME à critères standards	14 732	96,80 [96,5 - 97,1]	94,30 [94,0 - 94,7]	84,70 [84,0 - 85,3]
nombre de sujets à risque		14 127	13 108	6 838
DME à critères élargis	11 846	94,60 [94,2 - 95,0]	87,50 [86,9 - 88,1]	68,30 [67,3 - 69,2]
nombre de sujets à risque		11 042	9 705	3 933
DDAC MI-II	643	92,40 [90,0 - 94,2]	88,80 [86,1 - 91,0]	76,40 [72,5 - 79,8]
nombre de sujets à risque		593	548	260
DDAC MIII	113	96,40 [90,7 - 98,6]	95,40 [89,3 - 98,1]	-
nombre de sujets à risque		100	65	0

Tableau 3 : Survie du greffon en fonction de son origine (2007-2016) [6].

4. Des pratiques hétérogènes à travers le monde

Les modalités de prélèvement des organes chez les DDAC non contrôlés sont très variables d'un pays à l'autre (**tableau 4**) [38-40]. Une revue de la littérature publiée en 2015 a recensé 18 articles faisant état des protocoles de prise en charge de ces donneurs, avec seulement 6 pays ayant émis des *guidelines* officiels [38] : France, Espagne, Italie, Suisse, Etats-Unis et Royaume-Uni. A noter qu'en Espagne, il existe 6 *guidelines* différents émis par 6 régions ; qu'aux Etats-Unis, le protocole établi ne concerne que la ville de New-York ; au Royaume-Uni, l'Ecosse et en Italie, la région de Pavie. Certains pays ne considèrent que les catégories I ou que les catégories II de Maastricht. La durée de *no flow*, entre l'arrêt cardiaque et le début de la médicalisation, varie de 15 à 30 minutes. La période de *no touch* permettant

Pays	Population	Catégorie Maastricht non contrôlée	Organes prélevés	No flow Arrêt non médicalisé	No touch	Low flow		ACR - canulation	Méthode de reconditionnement	Canulation - prélèvement	Machines de perfusion
						Arrêt médicalisé	MCE - canulation				
Guidelines [38]											
France (2007)	18-55 ans	I - II	Reins Foie	30' si reins 15' si foie	5'	30'	90' 120' si MAM	120' 150' si MAM	nECMO - hECMO si foie RIS	180' si RIS 240' si ECMO	+
Italie (2011)	> 15 ans	I - II	Reins	15'	20'	ns	110'	125'	nECMO	360'	+
Suisse (2011)	> 16 ans	I - II	Reins	30'	10'	20'	120'	150'	nECMO	180'	-
Etats-Unis (2011)	Adultes et enfants	I	Reins Foie	ns	ns	30'	120'	ns	nECMO	240'	+
Espagne (2012)	> 7 ou 14 ans selon les régions	I	Reins Foie +/- Poumons	15' - 30'	5'	ns	120'	150'	nECMO - hECMO RIS	120' si RIS 240'-360' si ECMO	+/-
Royaume-Uni (2013)	> 16 ans	I	Reins Foie Poumons	15'	5'	ns	105'	120'	nECMO	ns	+
Revue											
Belgique [28]	< 65 ans	II	Reins Foie	30'	ns	ns	120'	ns	ECMO RIS	ns	+ après 2005
Pays-Bas [15, 41]	< 55 ans	II	Reins +/- Foie	20'	5'	90'	Pas de reprise du MCE	90'-65' selon l'âge	RIS	120'	+/-

Tableau 4 : Conditions de prélèvement chez les DDAC non contrôlés en fonction du pays (MCE : massage cardiaque externe, ACR : arrêt cardio-respiratoire, MAM : machine à masser, nECMO : ECMO normothermique, hECMO : ECMO hypothermique, ns : non spécifié).

la déclaration du décès n'est pas toujours clairement définie. Les durées d'ischémie chaude varient entre 65 et 150 minutes. La durée de reconditionnement est différente selon l'utilisation de l'ECMO ou du RIS. La plupart des pays recommande l'utilisation de l'ECMO en normothermie. L'ECMO hypothermique est autorisée en France et en Espagne. La canulation par voie fémorale est recommandée par tous. Le RIS est encore d'actualité en France pour les reins, en Espagne, en Belgique et aux Pays-Bas [15, 28, 41]. A noter l'absence de reprise du massage cardiaque externe et de la ventilation aux Pays-Bas après déclaration du décès. Les populations concernées sont essentiellement les adultes et les adolescents, parfois les enfants comme en Espagne. Les organes éligibles sont surtout les reins et le foie, parfois les poumons. L'utilisation des machines de perfusion est recommandée dans la plupart des pays.

En France, les greffes issues des donneurs non contrôlés catégories I et II de Maastricht sont autorisées depuis 2006. L'activité est relativement stable avec un maximum atteint en 2012 de 81 greffes. En 2017, 57 greffes ont été réalisées dans ce contexte. Les équipes ont le libre choix d'utiliser la CRN ou le RIS pour reconditionner les reins.

L'ABM a défini en 2007 les conditions de prélèvement en précisant les critères d'exclusion et les durées maximales d'ischémie chaude et froide tolérées (**figure 3**) [42] :

- Critères d'arrêt cardiaque : l'hypothermie et les intoxications médicamenteuses sont exclues ;
- Critères d'âge : les donneurs de moins de 18 ans et de plus de 55 ans sont exclus ;
- Critères de cause de décès : les accidents de la voie publique et autres traumatismes violents, les anoxies (y compris post-arrêt cardiaque primitif), les suicides et les hémorragies cérébrales sont exclus ;
- Critères de donneurs : exclusion des donneurs à risque avec des antécédents connus :
 - De maladie rénale,

- De maladie hypertensive ou diabétique, y compris traitée,
 - De cancer (y compris toute pathologie tumorale cérébrale) ou de sepsis grave ;
- Critères d'ischémie chaude :
- Ne jamais dépasser 30 minutes d'asystolie complète sans massage cardiaque et ventilation ;
 - La période globale d'hypoperfusion rénale comprenant la période d'arrêt cardio-circulatoire et la période de massage cardiaque externe et de ventilation mécanique efficace, doit être inférieure ou égale à 120 minutes, délai qui peut être porté à 150 minutes si la réanimation cardio-respiratoire a été réalisée à l'aide d'une machine à masser ;
 - L'utilisation d'une machine à masser est conseillée pour optimiser la qualité du massage cardiaque.

Après prélèvement, la préservation des greffons en machines de perfusion hypothermique (MPH) est recommandée, sans dépasser 18 heures de conservation hypothermique.

Ces mesures ont pour objectif de ne pas cumuler des facteurs de risque car dans la procédure du DDAC, un facteur de risque supplémentaire est identifié : l'ischémie chaude.

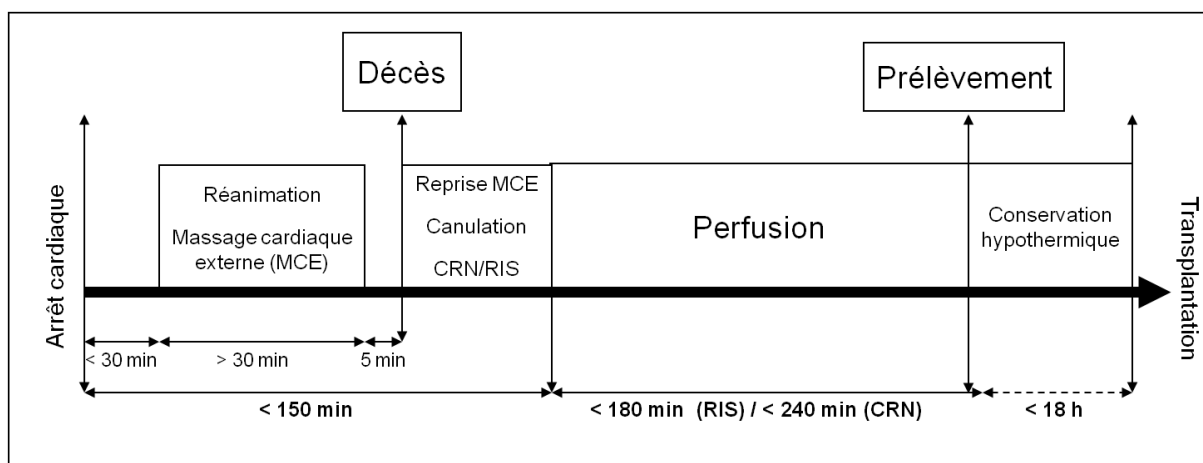


Figure 3 : Durées d'ischémie chaude et froide tolérées par l'ABM [42].

5. Ischémie-reperfusion (IR) en transplantation rénale

Les organes provenant des DDAC sont plus exposés aux lésions induites par l'IR que ceux provenant des DME. Ils sont en effet soumis à quatre séquences consécutives : ischémie chaude avant prélèvement, ischémie froide pendant la conservation hypothermique, seconde phase d'ischémie chaude pendant la greffe et finalement reperfusion au déclantage vasculaire. Les lésions d'ischémie accumulées pendant la phase de conservation hypothermique sont exacerbées par la phase préalable d'ischémie chaude [21]. Le prolongement de l'une ou l'autre de ces durées peut majorer les lésions d'IR [43].

5.1. Les lésions d'ischémie [43- 53]

L'ischémie correspond à la privation d'oxygène et de nutriments du fait de l'arrêt de l'afflux sanguin. La diminution de l'apport en oxygène va entraîner le passage d'un mécanisme aérobie (génération de 36 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à partir d'une molécule de glucose) à un mécanisme anaérobie (génération de 2 molécules d'ATP à partir d'une molécule de glucose). L'ATP va alors être consommée dans la mitochondrie pour maintenir le potentiel de membrane. Le taux d'ATP intracellulaire va diminuer avec accumulation d'acide lactique. La chute du pH intracellulaire va déstabiliser la membrane lysosomiale, relarguant des hydrolases et entraînant la destruction de la structure cellulaire. Cela va également inhiber les pompes ioniques et notamment les pompes Na^+/K^+ ATPases, conduisant à l'entrée de sodium et d'eau dans la cellule et à la formation d'un œdème cellulaire. Le taux intracellulaire de sodium est également augmenté par l'action des échangeurs Na^+/H^+ qui vont excréter des ions hydrogène pour tenter de corriger le pH. Du fait de l'accumulation de sodium dans la cellule, les pompes $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ arrêtent d'excréter du calcium et inversent leur fonctionnement. L'augmentation du calcium dans la mitochondrie est directement impliquée dans la génération des radicaux libres oxygénés ou *reactive oxygen*

species (ROS). Les ROS vont altérer les macromolécules comme les constituants membranaires, les lipides et l'acide désoxyribonucléique (ADN). Au cours de l'hypoxie, des quantités relativement faibles de ROS sont générées par rapport à la phase de reperfusion. Pendant la phase de carence en ATP, la manganèse superoxyde dismutase, un antioxydant majeur de la mitochondrie est inactivée. Les dommages mitochondriaux dus à la surcharge en calcium et à l'accumulation des ROS entraînent la perméabilité des pores de transition. Lorsque la membrane mitochondriale perd sa polarisation, nécessaire à la phosphorylation oxydative, et que le stock d'ATP est épuisé, le processus devient irréversible et il en résulte la mort cellulaire.

5.2. Adaptation à l'hypoxie

En dépit des mécanismes des lésions d'ischémie, l'organe a recours à différentes stratégies pour répondre au stress hypoxique. L'une des réponses cellulaires à l'hypoxie est médiée par *hypoxia inducible factor* (HIF), un facteur de transcription activant plusieurs cibles dont *vascular endothelial growth factor* (VEGF), érythropoïétine (EPO) et hemoxygénase-1 (HO-1). VEGF est une protéine dont le rôle est de stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales entraînant une néo-angiogenèse. EPO est bien connue pour son rôle dans l'érythropoïèse mais aurait également un rôle protecteur dans l'ischémie, les récepteurs de l'EPO activant de multiples voies de survie et anti-apoptotiques. HO-1 est une protéine impliquée dans le choc thermique et la réponse au stress et possède des propriétés anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et anti-oxydantes [43].

5.3. Les lésions de reperfusion

Les lésions de reperfusion se poursuivent dans les heures ou les jours suivant l'agression initiale [47]. Elles sont la conséquence d'un dérèglement des voies de réparation et des voies de l'inflammation en réponse aux dommages ischémiques préalables.

A la reperfusion, le taux d'oxygène augmente et le pH extracellulaire se normalise rapidement par *wash out* extracellulaire. Ainsi, il existe un gradient important d'ions hydrogène de part et d'autre de la membrane cytoplasmique qui va entraîner un échange massif Na^+/H^+ . L'augmentation du taux intracellulaire de sodium entraîne un inversement du fonctionnement des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ au niveau mitochondrial et par la brusque normalisation du pH intracellulaire, l'activation des calpaïnes. Celles-ci vont hydrolyser des protéines cibles entraînant des lésions structurelles cellulaires et des dysfonctionnements mitochondriaux. Cette activation peut conduire à terme à la mort cellulaire.

Un retour rapide à la normoxie entraîne une explosion de la production de ROS [54-57]. Pendant l'ischémie, l'adénosine est désaminée en hypoxanthine. A la réintroduction de l'oxygène au moment de la reperfusion, celle-ci est métabolisée en xanthine oxydase. La xanthine oxydase est une source majeure de production de ROS et un taux excessif dépasse rapidement les mécanismes normaux anti-oxydants. Les ROS causent directement la peroxydation lipidique dont les produits sont nocifs. L'augmentation des ROS et un taux élevé de Ca^{2+} dans la mitochondrie vont entraîner la perméabilité de la membrane mitochondriale par ouverture du pore de transition mitochondriale. L'œdème induit va conduire à l'éclatement de la mitochondrie. Le largage du cytochrome C dans le cytosol entraîne l'activation de la voie des caspases. Les caspases entraînent des lésions de la membrane nucléaire et du cytosquelette, la dégradation des protéines anti-apoptotiques impliquées dans la réparation de l'ADN et l'activation de certaines kinases et facteurs entraînant la fragmentation de l'ADN. L'ouverture permanente du pore de transition mitochondriale entraîne la mort cellulaire par apoptose, nécrose ou autophagie. En cas de nécrose, des débris cellulaires vont être relargués et induire une réaction inflammatoire [58-60].

Le phénomène d'IR entraîne également un œdème des cellules endothéliales réduisant le calibre des capillaires, augmentant la perméabilité membranaire et l'apparition d'un œdème interstitiel. L'IR provoque également une vasoconstriction par expression endothéliale de substances vasoconstrictrices comme *platelet-derived growth factor-B* et endothéline-1. Cette vasoconstriction est amplifiée par la chute de la production de monoxyde d'azote (NO) à la reperfusion par *down*-régulation de sa forme endothéliale [43-53]. Le NO est une molécule de signalisation entraînant la vasodilatation par le guanylate cyclase soluble, impliquée dans les voies anti-oxydantes et anti-apoptotiques. Il est normalement produit par plusieurs formes d'oxyde nitrite synthase (NOS) dont la forme endothéliale (eNOS) et la forme induite (iNOS). L'inhibition d'eNOS joue un rôle important dans la dysfonction endothéliale. Une régulation de la production de NO s'effectue par la thrombospondine et le CD47 (protéine associée aux intégrines). Au cours de la séquence d'IR, la thrombospondine est sécrétée par les plaquettes pour produire une vasoconstriction par l'inhibition de la guanylate cyclase soluble, médiée par CD47 et eNOS. L'inhibition d'iNOS confère quant à elle une cytoprotection aux cellules épithéliales tubulaires proximales.

Une des conséquences de l'augmentation simultanée de ce stress oxydatif et nitrosatif est la production d'anions peroxynitrites causant directement une peroxydation lipidique, des lésions ADN et des lésions protéiques. Les dommages ADN vont entraîner l'activation de la poly (adénosine diphosphate ribose) polymérase (PARP)-1 conduisant à la nécrose cellulaire par un effondrement des réserves en ATP. Il s'agit du phénomène de « *PARP suicide* » [45, 54-56, 60].

Les lésions des cellules épithéliales entraînent la production de cytokines pro-inflammatoires comme *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), interleukine-1 β (IL-1 β), interleukine-6 (IL-6), et interleukine-8 (IL-8) [58-60], activant le système immunitaire. Les cellules endothéliales vont également induire l'expression de molécules d'adhésion comme *vascular cell adhesion*

molecule-1 (VCAM-1), *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), p-sélectine et e-sélectine. Cette activation endothéliale va être responsable d'une adhérence plaquettaire et de l'accumulation de neutrophiles. La conséquence est une congestion capillaire et le phénomène de *no reflow*, aggravant l'ischémie [48, 58].

5.4. Réponse immunitaire innée

La plupart des systèmes répondant à l'invasion microbienne sont activés lors des lésions de reperfusion. Du système inné, les *Toll-like receptors* (TLR) [61, 62] vont se lier aux motifs associés au dommage cellulaire relargués par les cellules, telles que les protéines *heat shock protein* (HSP) 70 ou *high mobility group box-1* (HMGB-1), l'ADN et l'ATP. Les TLR agissent par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice de la transduction du signal MyD88 pour activer le facteur de transcription *nuclear factor-κB* (NF-κB), et de manière indépendante, les voies de l'interféron (IFN). À terme, les TLR augmentent l'expression de plusieurs cytokines et chimiokines comme IL-8, *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *epithelial neutrophil activating peptide-78*, *macrophage inflammatory proteins-1α* et 1β, et *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted* (RANTES).

L'up-régulation des TLR notamment TLR2 et TLR4 est documentée dans les lésions d'IR rénale [43-53]. Le relargage des cytokines et des chimiokines par les cellules immunitaires et endothéliales locales entraîne le recrutement des leucocytes, surtout neutrophiles dans la première heure suivant la reperfusion. Les neutrophiles augmentent la production du stress oxydatif par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, sécrètent des élastases qui sont directement cytotoxiques et entraînent le recrutement d'autres cellules immunitaires dont les monocytes suivis par les lymphocytes T. Le degré d'infiltration des neutrophiles est directement corrélé à la sévérité des lésions d'IR [43, 46, 53, 59, 61, 62]. HMGB-1 va entretenir la stimulation des TLR4 et donc maintenir l'inflammation locale. La réponse inflammatoire va ainsi être exacerbée lors de la reperfusion [46]. Les TLR4 sont

également impliqués dans la génération de la fibrose suivant les lésions d'IR par augmentation de la sensibilité et de la réponse des cellules rénales au facteur pro-fibrosant *transforming growth factor-β* (TGF-β). Ils sont donc impliqués dans le rejet à court et à long termes [62-64].

La cascade du complément est une autre partie du système inné activée pendant l'IR [65-67]. Il s'agit d'une famille de protéines circulantes, de récepteurs de surface cellulaire, d'enzymes protéolytiques et de peptides clivés jouant un rôle essentiel dans les premières lignes de défense contre les pathogènes et dans la régulation de l'inflammation. Le système du complément est activé par différents éléments comme le lipopolysaccharide, IL-1, IFN-γ ou TNF-α. Il existe 3 voies d'activation : la voie classique, la voie des lectines et la voie alternative. Toutes sont impliquées dans les lésions d'IR et conduisent à la production de la fraction C3 du complément et des produits d'activation C3a, C3b, C5a ainsi que du complexe d'attaque membranaire, responsables de lyse cellulaire et d'inflammation avec production d'IL-6, TNF-α, prostaglandines, ICAM-1, facteur tissulaire (FT) et collagène. L'expression anormale de FT est responsable de la génération de thrombine (facteur IIa). La thrombine a également un rôle direct sur le processus cellulaire et va notamment entraîner la synthèse de facteurs pro-fibrosants. Elle entraîne également la rétention des cellules inflammatoires dans le parenchyme [48]. L'IR *up*-régule la production des composants du complément par les cellules rénales endothéliales et tubulaires aussi bien que par les cellules immunitaires infiltrées. Le complément aurait également un rôle dans la régénération tissulaire et la progression de la fibrose après agression [53, 58, 65-67].

5.5. Réponse immunitaire adaptative

Le rôle exact des lymphocytes T CD4⁺/CD8⁺ n'est actuellement pas clair. Les lymphocytes T *natural killer* sont activés dans les lésions d'IR et responsables du recrutement des neutrophiles par l'IFN-γ. Les lymphocytes T régulateurs produisent des cytokines anti-

inflammatoires comme l'IL-10 et ont un phénotype immunosuppresseur. Ils ont donc un rôle protecteur dans les lésions d'IR [43, 53].

5.6. Conséquences sur le greffon rénal

C'est au niveau de la médulla externe (segment S3 du tubule proximal) que les effets de l'ischémie semblent plus marqués. Au niveau histologique, on observe une destruction partielle de l'épithélium rénal due à la nécrose et à l'apoptose, une obstruction des tubules due à la desquamation des cellules dans la lumière, une perte de la bordure en brosse du tubule proximal, une perte de la polarité des cellules et une congestion des cellules endothéliales. Ce phénomène est responsable d'une filtration et d'une réabsorption de mauvaise qualité et donc d'une diminution du débit de filtration glomérulaire [44].

Le rein a la possibilité de remplacer les cellules épithéliales perdues à partir de cellules épithéliales endogènes survivantes, de cellules stromales de moelle osseuse, de progéniteurs intra-rénaux ou de cellules rénales interstitielles. Si les lésions sont sévères, une atrophie tubulaire et une fibrose surviennent quand même, responsables d'une insuffisance rénale chronique. Les cytokines pro-inflammatoires vont attirer les monocytes-macrophages et les lymphocytes sur le site lésionnel et entraîner la production de ROS et de cytokines inflammatoires et génératrices de fibrose comme TGF- β . Les cytokines vont stimuler les cellules mésangiales, les fibroblastes et les cellules épithéliales tubulaires pour activer la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) au cours de laquelle les cellules produisent de grande quantité de composants de la matrice extracellulaire à l'origine des cicatrices fibreuses [46].

La RRF après transplantation est généralement la cause des lésions d'IR. Elle peut aussi être due à un rejet aigu ou à une néphrotoxicité médicamenteuse. Généralement, elle se définit par le recours à la dialyse dans les 7 jours suivant la greffe et se distingue de la NFP par une récupération de la fonction rénale. La RRF est associée à un risque accru de rejet aigu et

chronique. La perte du greffon est responsable d'hospitalisations prolongées et d'un recours à la dialyse, entraînant un surcoût financier [43, 52, 63, 64, 68].

6. Stratégies de réduction des lésions d'IR

L'IR en transplantation rénale reste malgré tout une séquence inévitable. Les stratégies visant à réduire les lésions d'IR peuvent concernées le donneur comme le receveur et survenir avant le prélèvement de l'organe, pendant sa conservation ou après la greffe.

6.1. Gestion du donneur et du receveur

La gestion du donneur consiste à maintenir la normothermie, l'oxygénation, la volémie, l'hémodynamique et la diurèse du patient. L'utilisation de protocoles standardisés a montré son efficacité en augmentant le nombre d'organe greffé par DME [69]. L'utilisation de dopamine pendant la réanimation diminuerait le taux de RRF chez le receveur [69, 70]. Ces mesures sont bien évidemment difficilement applicables dans le contexte de DDAC non contrôlé.

Au niveau du receveur, l'expansion volémique par colloïdes ou cristalloïdes permettrait une meilleure récupération de la fonction rénale. L'utilisation de mannitol et de furosémide est également couramment rapportée [71].

6.2. Conservation statique hypothermique

La réduction des lésions d'IR passe bien évidemment par la réduction des temps d'ischémie. Une durée incompressible reste malgré tout nécessaire sur un plan logistique, notamment pour la préparation du receveur et le transport du greffon.

La conservation statique en hypothermie à 4°C est le *gold standard*. Il s'agit d'une technique facile et reproductible d'une équipe à une autre. L'hypothermie ne prévient pas les dommages cellulaires mais permet de les atténuer en réduisant le métabolisme jusqu'à 10% de son niveau

de base. En condition d'hypoxie, la faible production d'ATP et le dysfonctionnement des pompes Na^+/K^+ ATPases entraînent un œdème cellulaire et l'arrêt du cycle cellulaire. A noter que l'ischémie froide prolongée reste corrélée à une moins bonne récupération de la fonction rénale et qu'un brusque retour à la normothermie au moment de la reperfusion peut conduire à des dysfonctions mitochondriales et à la transduction de signaux pro-apoptotiques [72].

Pour le rinçage et la conservation du greffon, de nombreuses solutions de préservation ont été développées. Le lavage du greffon avant conservation permet d'éliminer les thrombi du lit vasculaire et de diffuser l'hypothermie. Les solutions de préservation ont pour objectif de diminuer l'œdème cellulaire, maintenir une homéostasie calcique, réduire la génération de ROS et apporter un substrat énergétique.

Il existe trois types de solution en fonction du taux de potassium : intracellulaire, extracellulaire et intermédiaire [73]. L'ajout d'un tampon permet d'amortir les variations de pH et d'un colloïde comme le polyéthylène glycol (PEG), de diminuer l'œdème cellulaire par pression oncotique. Le PEG permet la réduction des lésions d'IR en préservant l'intégrité mitochondriale et en réduisant l'infiltration des cellules T. Il limite ainsi les dommages endothéliaux et l'activation de la cascade des cytokines et des molécules d'adhésion [74, 75].

Plusieurs solutions sont communément utilisées en pratique clinique en France [73] :

- Eurocollins : solution intracellulaire la plus ancienne ;
- University of Wisconsin solution of Belzer and Southard (UW) : solution de type intracellulaire de seconde génération considérée comme la solution de référence. Elle combine des substrats inertes métaboliquement comme le lactobionate et la raffinose, de l'hydroxyéthylamidon agissant comme un colloïde, un précurseur de l'ATP (adénosine) et des piègeurs de radicaux libres [76] ;

- Solutions de troisième génération qui regroupent des liquides de conservation tels que Celsior® ou histidine-tryptophane-kéoglutamate (Custodiol®), caractérisées notamment par une concentration en potassium relativement basse ;
- Solutions de quatrième génération de type extracellulaire qui utilisent comme colloïde le PEG (Institut Georges Lopez, IGL-1® et Solution de Conservation des Organes et des Tissus, SCOT15®).

6.3. Moyens pharmacologiques

De très nombreux moyens pharmacologiques ont été étudiés afin de corriger ou de réduire les lésions induites par la séquence d'IR. Ainsi, des recherches *in vitro* et *in vivo* ont tenté d'inhiber ou d'activer différentes voies impliquées dans les lésions d'IR :

- Inhibition de CD47 permettant le maintien de la synthèse de NO et donc du flux sanguin [77] ;
- Antagonisation des récepteurs à l'endothéline [71] ;
- Induction de HO-1 aux propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques [69, 71] ;
- Inhibition d'iNOS conférant une cytoprotection aux cellules épithéliales tubulaires proximales [71] ;
- Antagonisation du récepteur du facteur d'activation plaquettaire [71] ;
- Inhibition de la voie du complément [69, 71, 78-81], notamment par un anticorps monoclonal, l'eculizumab ;
- Inhibition de la production ou antagonisation de cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-1, IL-8, IL-10, IL-13, MCP-1, ICAM-1) [71, 79, 82] ;
- Inhibition de la p-sélectine sur les cellules endothéliales diminuant l'infiltration et l'adhésion des neutrophiles [83] ;
- Inhibition de p53, gène pro-apoptotique activé en cas d'hypoxie et de stress oxydant [83] ;

- Inhibition de la voie de NF- κ B par induction pharmacologique de HSP [84] ;
- Utilisation d'anti-TLR (OPN301) [85] ;
- Thérapie génique avec utilisation des *small interfering* ARN et des micros ARN (régulateurs de séquences spécifiques post-transcriptionnelles) [86].

A partir de ces voies de recherche, de nombreux additifs ont également été développés et expérimentés en préclinique et en clinique, à différentes étapes du processus de greffe, afin d'améliorer la récupération des reins :

- Anti-ischémiques comme la trimétazidine [70, 71, 79] ;
- EPO pour son rôle anti-apoptotique et cytoprotecteur [69] ;
- Vasodilatateurs : inhibiteur calcique en injection directe dans l'artère rénale après reperfusion [71], prostacycline, facteur natriurétique auriculaire [71], pentoxifylline [87] ;
- Anti-oxydants : N-acétylcystéine [71, 88], propionyl-L-carnitine (diminution de la peroxydation lipidique et de la génération de ROS permettant de préserver la structure de la cellule tubulaire) [71], intermédine [89], superoxyde dismutase (diminution des effets immunologiques en atténuant les radicaux libres lors de son injection à la reperfusion) [83], acide α -lipoïque [90], pioglitazone [91], necroX-7 [92], bioflavonoïdes [70, 71, 79] ;
- Anti-inflammatoires : statines (diminution des lésions rénales aiguës ischémiques par réduction de l'infiltration des neutrophiles et des macrophages, inhibition de l'activation de NF- κ B et *up*-régulation d'IL-6 qui possède un rôle anti-inflammatoire) [71], diannexine [83], corticoïdes et inhibiteurs de la calcineurine [69] ;
- Facteurs de croissance comme *insulin-like growth factor*-1 (accélération de la régénération des cellules tubulaires) [71] ;
- Thymoglobulines : anticorps polyclonal bloquant de multiples gènes en rapport avec les lésions d'IR et connu pour son effet dépléteur sur les lymphocytes T [83, 93] ;
- Anticoagulants [79] dont anti-Xa [94] ;

- Cellules souches : injection à la reperfusion [95-97] ou lors de la préservation en machine de perfusion [98, 99] ;
- Hemarina-M101 (HEMO₂life®), un transporteur d'oxygène en hypothermie [100] ;
- Saturation en gaz des solutions de préservation : oxygène par l'intermédiaire d'un transporteur artificiel (perfluorocarbène) ou par persufflation [79], sulfure d'hydrogène (conférant un hypométabolisme cellulaire) [79, 101-103].

Au final, peu d'agents pharmacologiques ont réellement fait la preuve de leur efficacité en clinique [104].

6.4. Conditionnement ischémique

Le conditionnement ischémique est un procédé par lequel de courtes séquences d'IR appliquées à un organe lui confèrent un certain degré de protection envers les futures lésions ischémiques [105-111]. Ce phénomène a été observé pour la première fois dans le milieu des années 1980 en chirurgie cardiaque. Plusieurs types de conditionnement ischémique existent :

- Local ou à distance (le conditionnement appliqué à un organe est supposé également conférer une protection à d'autres organes à distance) ;
- Direct (par clampage vasculaire ou inflation d'un brassard à tension au niveau d'un membre) ou pharmacologique (par induction médicamenteuse notamment avec l'utilisation des gaz d'anesthésie comme l'isoflurane ou le xénon [50]) ;
- Réalisé chez le donneur (pré-conditionnement) ou chez le receveur à la reperfusion (post-conditionnement).

Les mécanismes d'action du conditionnement ischémique sont nombreux : préservation de l'énergie de la cellule, protection contre le stress oxydatif, meilleure circulation sanguine vers les organes et protection contre l'apoptose [69]. La technique se base sur le principe de l'activation de la voie de HIF entraînant la synthèse de protéines protectrices contre l'ischémie comme VEGF, EPO et HO-1 [112]. Des résultats significatifs ont ainsi été obtenus

sur des modèles animaux de petite taille [109]. Les études utilisant des modèles animaux de plus grande taille se sont avérées par contre peu concluantes, tout comme les essais cliniques chez l'homme en transplantation rénale [106, 108]. En effet, deux grandes études ont mis en évidence des résultats peu convaincants :

- *REmote preconditioning for Protection Against Ischaemia-Reperfusion in renal transplantation (REPAIR)* : étude contrôlée randomisée multicentrique, internationale. Le pré-conditionnement consistait à inflater pendant 5 minutes puis déflater pendant 5 minutes également un brassard à tension au niveau du membre supérieur, quatre fois de suite chez 406 donneurs vivants. Un faible bénéfice faible sur la fonction rénale à 1 an a été observé [107] ;
- *Remote ischaemic conditioning on recipients of deceased renal transplants effect on immediate and extended kidney graft function: a multicentre, randomised controlled trial protocol (CONTEXT)* : le même type de pré-conditionnement était appliqué chez 225 patients. Là non plus, il n'a pas été observé d'amélioration de la fonction rénale à 1 an [110, 111].

6.5. Conservation dynamique

L'intérêt des machines de perfusion est multiple. Elles ont tout d'abord une fonction de lavage permettant l'élimination des déchets toxiques produits par le métabolisme anaérobie et permettent le maintien de l'intégrité et de la fonction des cellules endothéliales [73]. La perfusion peut être continue ou pulsatile. Il est supposé que la perfusion pulsatile permet le maintien d'un flux physiologique vasoprotecteur sur le lit endothélial [76, 113], préparant à la revascularisation par une ouverture du lit vasculaire avant la greffe (diminution du vasospasme) [73].

Les machines de perfusion sont également utilisées pour la sélection des greffons sur les paramètres de perfusion (index de résistance et débit de perfusion) [73, 114-117].



Figure 4 : Machine de perfusion LifePort™ Kidney Transporter (Organ Recovery Systems, Des Plaines, IL, USA).

Certaines machines permettent l'oxygénation active du perfusat par utilisation d'une membrane d'oxygénation [118, 119] et le reconditionnement des greffons limites grâce à l'utilisation d'additifs [114, 115].

La conservation dynamique peut se faire en hypothermie, subnormothermie ou normothermie. Les MPH se sont développées dans les années 1960. La plus classiquement utilisée est la machine LifePort™ KidneyTransporter (Organ Recovery Systems, Des Plaines, IL, USA) (**figure 4**) avec le liquide *Kidney Perfusion Solution-1* (KPS-1).

Il s'agit d'une machine pulsatile avec pression de perfusion de 30mmHg et température de 4°C. En 2017, 73,7% des reins issus des donneurs à critères élargis en France ont été conservés en machine [6]. Les études cliniques comparant la conservation en MPH par rapport à la conservation statique ont montré de meilleurs résultats pour la conservation en machine avec une meilleure reprise de fonction rénale des greffons issus des donneurs décédés tout type confondu [120-123], des DME à critères élargis [73, 113, 124, 125] et des DDAC [73, 126-128]. La persistance de l'amélioration de la fonction rénale est moins claire à

long terme [119]. Leur utilisation peut être limitée du fait du coût du matériel et de la nécessité d'un apprentissage des opérateurs.

Les machines subnormothermiques permettent la conservation du greffon à 20-25°C ou 32-34°C. Elles utilisent généralement un perfusat avec transporteur d'oxygène [129].

Les machines normothermiques ou bancs de perfusion, qui peuvent utiliser comme perfusat le sang du donneur et sont parfois équipées d'un filtre à leucocytes, permettent de rétablir un métabolisme de l'organe proche de la physiologie et d'évaluer la capacité de récupération fonctionnelle des greffons et de leurs systèmes enzymatiques. Elles sont donc intéressantes pour l'utilisation d'additifs pharmacologiques durant la perfusion afin d'améliorer la reprise de fonction des reins [73, 99, 118, 130]. Elles ont été évaluées chez l'homme dans le cadre des donneurs marginaux (DME à critères élargis et DDAC), avec des résultats encourageants [131, 132].

La mise en place de la CRN chez les DDAC se base sur ce même principe de rétablissement d'une perfusion au sang proche de la physiologie. Son implantation rapide chez le donneur permet de réduire la durée d'ischémie chaude.

7. CEC, inflammation et fonction rénale

7.1. CEC et inflammation

La technique de CEC est utilisée depuis les années 1950 afin de remplacer les fonctions cardiaque et respiratoire au cours d'interventions chirurgicales. Un circuit de CEC est classiquement composé de tubulures permettant le drainage du sang veineux, la récupération sanguine et la réinjection du sang artériel, d'un réservoir veineux ou cardiome, d'une pompe, d'une membrane d'oxygénation et de décarboxylation et de filtres. Le circuit est relié à un échangeur thermique.

Plusieurs conséquences ont été imputées à la CEC : saignement, hémodilution, modifications importantes de la volémie, traumatisme mécanique des éléments sanguins et survenue d'un syndrome inflammatoire [133, 134]. Un rôle propre de la CEC dans la survenue du syndrome inflammatoire indépendamment du traumatisme chirurgical a en effet été rapporté [134, 135]. Deux phases ont été décrites concernant ce syndrome plus connu sous le nom de SIRS pour syndrome inflammatoire de réponse systémique.

Une première phase, précoce, survient à l'initiation de la CEC et est causée par le contact des composés du sang (cellulaires et humoraux) avec le matériel synthétique du circuit. Ce contact « non endothélial » est pourvoyeur de thromboses d'où la nécessité d'une héparinisation générale. Le sang hépariné au contact du circuit va néanmoins activer les systèmes du contact, de la coagulation intrinsèque et extrinsèque, du complément, de la fibrinolyse ainsi que les cellules endothéliales, les lymphocytes, les monocytes, les neutrophiles et les plaquettes [135-139]. Les cytokines identifiées dans le sang des patients sont principalement : TNF- α , IL-1, IL-6 et IL-8 [140-142]. Ce même phénomène est retrouvé lors du contact air-sang notamment au niveau du cardiotope [143].

Une seconde phase, tardive, est constatée lorsque la durée de la CEC s'allonge. L'activation des composés du sang diminue du fait de l'adsorption des protéines à la surface du circuit rendant celui-ci plus biocompatible (phénomène de passivation). Une autre phase a été décrite en cas de clamage aortique du fait des lésions d'IR et du relargage sanguin d'endotoxines d'origine digestive (par translocation due à la vasoconstriction du territoire splanchnique) [137].

Le passage d'un flux pulsatile à un flux artériel laminaire lors de la CEC semble également en cause dans la génération de la réponse inflammatoire. La pulsatilité par le phénomène de *shear stress* est en effet nécessaire au niveau endothélial pour la génération d'eNOS [134].

De nombreuses avancées technologiques ont permis d'améliorer les circuits de CEC. Le développement de surfaces biocompatibles enduites à l'héparine et l'utilisation de circuits miniaturisés afin de réduire la surface de contact et l'hémodilution ont montré un effet positif en clinique [133, 136, 138, 144]. La « mini-CEC » ou *minimal extracorporeal circulation* (MECC), circuit ne comportant pas de réservoir veineux, permet de s'affranchir du contact air-sang au niveau du cardioteome [143]. Le remplacement des pompes à galet par les pompes centrifuges a également permis de réduire l'hémotraumatisme [137]. L'utilisation de filtres à leucocytes sur le circuit reste controversée devant l'absence de bénéfice clinique démontré malgré de nombreuses études [145].

L'administration de substances pharmacologiques anti-inflammatoires a également été expérimentée dans le contexte de la chirurgie cardiaque. L'utilisation de corticoïdes, dont les propriétés inflammatoires bien connues par augmentation d'IL-10 et réduction d'IL-6 et d'IL-8, a été largement étudiée mais son utilité clinique reste débattue [143]. D'autres études expérimentant l'utilisation des statines, de l'aspirine, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion [146], d'antioxydants (sélénium, vitamines C et E, zinc, N-acétylcystéine et glutamine) [143] et de nombreuses autres molécules bloquant la réponse inflammatoire [135, 147, 148] ont été publiées. Leur efficacité reste difficile à établir car du fait de son mécanisme plurifactoriel, la diminution d'un seul composant de la réponse inflammatoire ne suffit pas à l'anéantir et à conférer un bénéfice clinique [148].

La technique d'ECMO, dont le matériel correspond globalement à un circuit de CEC clos miniaturisé, s'est développée dans les années 1970 initialement sur des indications respiratoires. Depuis les dix dernières années, son utilisation en veino-artériel sur des défaillances cardiaques ou mixtes, s'est largement diffusée. Le même phénomène de SIRS a été décrit chez les patients assistés par ECMO. Il est à noter que, bien que s'affranchissant du

contact air-sang, le contact sang-circuit est par contre prolongé, l'ECMO pouvant rester en place plusieurs jours voire plusieurs semaines [141, 144].

7.2. CEC et fonction rénale

L'amélioration de la fonction rénale en postopératoire de chirurgie cardiaque en l'absence de CEC (revascularisation myocardique à cœur battant) plaide pour un effet délétère de la CEC sur le rein [133, 149, 150].

Comme vu précédemment, la mise sous CEC va entraîner le passage d'un système vasculaire avec compliance élastique à un système rigide [134] et d'un flux pulsatile à un flux laminaire non physiologique qui va avoir un effet délétère sur le rein du fait d'une moins bonne microcirculation [141, 147]. Sous ECMO, le flux sanguin est un mélange de flux laminaire généré par l'assistance et de flux pulsatile selon la fonction cardiaque résiduelle [141, 151, 152].

Par ailleurs, l'hypovolémie sur constitution d'un troisième secteur du fait du SIRS, la nécessité parfois de vasoconstricteurs à hautes doses, l'hypoxie et l'anémie par hémolyse sont également en cause dans l'hypoperfusion rénale prédominant au niveau de la corticale [151]. Il existe en effet une corrélation entre la profondeur de l'hémodilution et la survenue d'insuffisance rénale postopératoire [153].

Selon le registre de l'*Extracorporeal Life Support Organization*, plus d'un tiers des patients sous ECMO développe une insuffisance rénale aiguë, avec nécessité d'avoir recours à une épuration extra-rénale qui constitue un facteur pronostique péjoratif de survie [154, 155]. La défaillance rénale peut être bien entendu en lien avec la pathologie initiale mais il est prouvé que l'ECMO a des conséquences propres sur l'organe d'origine multifactorielle [151, 153-159]. En effet, en plus des altérations hémodynamiques décrites ci-dessus, les autres phénomènes invoqués sont :

- La dysrégulation hormonale au niveau du système rénine-angiotensine-aldostérone en charge du maintien de l'homéostasie hydrosodée et la *down*-régulation de l'atrial natriurétique peptide ;
- Le syndrome cardio-rénal et l'interaction poumon-rein ;
- Les phénomènes emboliques ;
- Les possibles lésions traumatiques vasculaires lors de la canulation.

Ainsi, le principe de la CRN (circuit fermé, non pulsatile, de quelques heures, limité à la région sous-diaphragmatique), va nécessairement avoir des conséquences propres sur des organes déjà fragilisés par l'ischémie chaude et dont le retentissement dans le cadre de la transplantation est à évaluer.

8. Objectif du travail

L'expansion du nombre de greffons rénaux est un véritable enjeu de santé publique. Les DDAC semblent être une source de greffons prometteuse malgré une souffrance accrue du fait de l'ischémie chaude prolongée, tout particulièrement dans les catégories non contrôlées I et II de Maastricht. Une optimisation du prélèvement et de la conservation de ces greffons est nécessaire. L'utilisation de la CRN et des MPH semblent donner de bons résultats mais les pratiques restent très hétérogènes d'une équipe de transplantation à une autre. Devant l'absence de données scientifiquement prouvées permettant de déterminer les méthodes de prélèvement et de préservation optimales, l'étude du reconditionnement et de la conservation de ces greffons paraît indispensable.

La première partie de ce travail concerne l'optimisation du reconditionnement chez le donneur avec la modélisation préclinique du DDAC avec mise en place d'une CRN, la comparaison des techniques de CRN et de RIS et la détermination de la durée optimale de reconditionnement des greffons rénaux par CRN. La seconde partie de ce travail concerne les possibilités d'optimisation de la conservation hypothermique avec l'étude des effets des MPH

sur les greffons rénaux en post-CRN, de l'apport de l'oxygénation active en MPH et de la curcumine en préservation statique.

PARTIE I : OPTIMISATION DU RECONDITIONNEMENT
CHEZ LE DONNEUR

**1. Mise au point d'un modèle expérimental porcin de DDAC avec
reconditionnement par CRN**

Development of a preclinical model of donation after circulatory determination
of death for translational application.

Allain G, Kerforne T, Thuret R, Delpech PO, Saint-Yves T, Pinsard M, Hauet T,

Giraud S, Jayle C, Barrou B.

Transplant Res. 2014 Jun 14;3:13.

RESEARCH

Open Access

Development of a preclinical model of donation after circulatory determination of death for translational application

Géraldine Allain^{1,2}, Thomas Kerforne^{1,3}, Rodolphe Thuret^{1,4}, Pierre-Olivier Delpech^{1,5}, Thibaut Saint-Yves^{1,5}, Michel Pinsard^{1,3,4}, Thierry Hauet^{1,6,7,8*}, Sébastien Giraud^{1,7}, Christophe Jayle^{1,2,6,8} and Benoît Barrou^{1,9,10}

Abstract

Background: Extracorporeal membranous oxygenation is proposed for abdominal organ procurement from donation after circulatory determination of death (DCD). In France, the national Agency of Biomedicine supervises the procurement of kidneys from DCD, specifying the durations of tolerated warm and cold ischemia. However, no study has determined the optimal conditions of this technique. The aim of this work was to develop a preclinical model of DCD using abdominal normothermic oxygenated recirculation (ANOR). In short, our objectives are to characterize the mechanisms involved during ANOR and its impact on abdominal organs.

Methods: We used Large White pigs weighing between 45 and 55 kg. After 30 minutes of potassium-induced cardiac arrest, the descending thoracic aorta was clamped and ANOR set up between the inferior vena cava and the abdominal aorta for 4 hours. Hemodynamic, respiratory and biochemical parameters were collected. Blood gasometry and biochemistry analysis were performed during the ANOR procedure.

Results: Six ANOR procedures were performed. The surgical procedure is described and intraoperative parameters and biological data are presented. Pump flow rates were between 2.5 and 3 l/min. Hemodynamic, respiratory, and biochemical objectives were achieved under reproducible conditions. Interestingly, animals remained hemodynamically stable following the targeted protocol. Arterial pH was controlled, and natremia and renal function remained stable 4 hours after the procedure was started. Decreased hemoglobin and serum proteins levels, concomitant with increased lactate dehydrogenase activity, were observed as a consequence of the surgery. The serum potassium level was increased, owing to the extracorporeal circulation circuit.

Conclusions: Our ANOR model is the closest to clinical conditions reported in the literature and will allow the study of the systemic and abdominal organ impact of this technique. The translational relevance of the pig will permit the determination of new biomarkers and protocols to improve DCD donor management.

Keywords: Animal model, Donation after circulatory determination of death, Extracorporeal membrane oxygenation, Ischemia/reperfusion injury, Organ donor management

* Correspondence: thierry.hauet@chu-poitiers.fr

¹INSERM U1082, CHU de Poitiers, rue de la Milétrie, B.P. 577, F-86021 Cedex Poitiers, France

⁶Université de Poitiers, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Poitiers F-86000, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Transplantation is the best alternative to end-stage organ disease [1]. The increasing number of patients waiting for an organ has led transplant teams to consider new sources of organs. A possible answer to this organ shortage is the use of organs from donation after circulatory determination of death (DCD) [2]. Cardiac arrest may be unexpected (type I and II of the Maastricht classification), or occur after life-sustaining care withdrawal (type III of the Maastricht classification). One of the challenges of DCD management is to correct or prevent ischemia-reperfusion injury due to the unavoidable period of warm ischemia. Warm ischemia is usually more pronounced in uncontrolled donation and it is of utmost importance to define an effective method to limit it. As this method will be applied after death certification in uncontrolled donors, it will not raise the usual ethical concerns that can be encountered in controlled donation.

In renal transplantation centers using kidneys from DCD, it has been shown that this organ source could increase the donor pool by 20 to 40% [3]. However, organs from these donors are more prone to ischemia-reperfusion injury because DCD kidneys suffer a period of warm ischemic damage (no-flow and low-flow periods) in addition to cold ischemia during *ex-vivo* conservation. Consequently, the risk of primary nonfunction and delayed graft function is higher [4,5].

Methods for conditioning abdominal organs before removal have evolved. Initially, protocols were limited to *in-situ* cooling using an intra-aortic double balloon catheter or Gillot's catheter [6,7]. This technique is referred to as cold *in-situ* perfusion. Since the middle of the 1990s, normothermic extracorporeal membrane oxygenation has been proposed, either in hypothermic conditions for total body cooling or in normothermic conditions limited to the abdomen using abdominal normothermic oxygenated recirculation (ANOR). This method has been developed and applied by several groups around the world [8-12]. This technique uses a normothermic extracorporeal

membrane oxygenation circuit with cannulae introduced by a femoral approach and an occlusive balloon positioned in the descending thoracic aorta to limit circulation to the abdominal region.

In France, a national protocol was designed to use exclusively uncontrolled donors (DCD type II of the Maastricht classification). The program started in 2007 and the protocol is summarized in Figure 1 [13]. In 2000, a team from Barcelona compared kidney preservation with cold *in-situ* perfusion, hypothermic cardiopulmonary bypass, and ANOR [8]. A significant decrease in primary nonfunction and delayed graft function with satisfactory long-term graft survival was identified for the ANOR group. Several other groups have reported their experiences with ANOR in uncontrolled and controlled donors and suggested the superiority of ANOR in DCD, as compared with cold *in-situ* perfusion (for a review, see [14]). However, no formal demonstration has been established.

Many issues remain to be addressed regarding the ideal protocol, such as ideal temperature and optimal duration. The use of additives is also a pivotal question. Clearly, experimental work is mandatory to better define the optimal conditions of this technique, which will help to limit or even repair the injuries induced by warm ischemia. The aim of our work was to develop a preclinical model of DCD based on the current recommendations of the French national regulatory authority on the study of kidneys exposed to ANOR and to optimize the conditions under which the technique is used.

Methods

Experimental model

The protocol was carried out in accordance with the regulations of the French Ministry of Agriculture, the National Institute for Agronomic Research and the regional ethics committee on animal experiments (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale en Poitou-Charentes). The animals were Large White male pigs about 3 months old and weighing between 45 and 55 kg. These animals have been

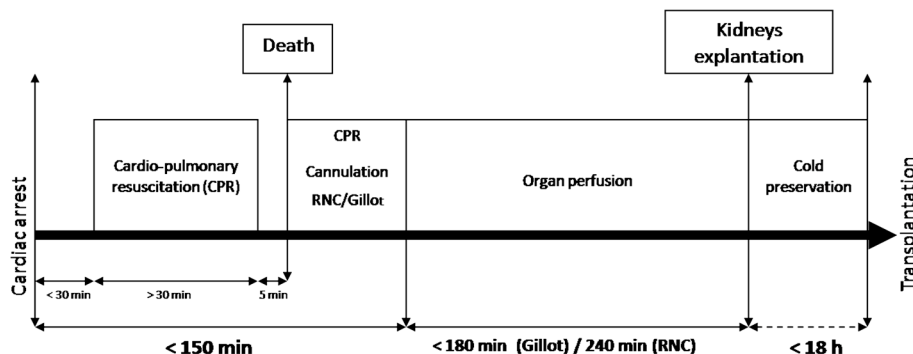


Figure 1 Recommendations for kidney removal from donation after cardiac death according to the French national regulatory authority. ANOR, abdominal normothermic oxygenated recirculation.

used in the experimental surgery laboratory for 15 years to study ischemia-reperfusion injuries with renal transplantation models [15,16]. The pig is well suited for pre-clinical studies because its anatomy and physiology are very similar to those of human beings and it has rapidly been chosen for potential applications in clinical practice [17].

We used a Rotaflow Maquet centrifugal pump with Softline Coating Maquet-Josträ pre-heparinized circuit (Maquet Cardiopulmonary AG, Hirrlingen, Germany). A thermoregulatory system is connected to maintain a temperature of 37°C. The circuit is purged with hydroxyethylamide (Restorvol® 6%, Fresenius Kabi, Sèvres, France). The priming is approximately 700 to 800 cm³.

Anesthetic procedure

Induction of the animal is performed with a Hunter mask with a mixture of nitrous oxide and oxygen 50/50 associated with 8% sevoflurane then 2.5% isoflurane. A perfusion line is set at a marginal vein of the ear. Orotracheal intubation is performed under laryngoscopic control. Controlled ventilation is performed with a respiratory rate of 16/min while maintaining expired CO₂ between 35 and 45 mmHg. Curarization of the animal is performed by initial injection of 8 mg pancuronium bromide followed by reinjection adapted to the behavior of the animal. Intra-operative analgesia is achieved by intravenous injections of 20 mg nalbuphine and 20 mg nefopam.

Surgical procedure

A video of the procedure is provided in Additional file 1. The animal is placed supine with access to the cervical, thoracic, and abdominal regions (Figure 2). First, a central venous catheter is positioned in the internal jugular vein after right cervicotomy. Then, laparotomy is performed. The abdominal aorta and inferior vena cava under the renal vessels are dissected, since the femoral vessels are too small to receive cannulae of sufficient size to ensure

the flow rate used. We chose an extraperitoneal approach to avoid lymphatic losses and to limit vascular filling and hemodilution. Indeed, the formation of a third sector is frequently encountered in renal transplants performed by a transperitoneal approach in the laboratory. A bolus of 300 IU/kg of unfractionated heparin is injected through the central venous catheter. This dosage is recommended by the French national regulatory authority. After 5 minutes, a 14 Fr arterial cannula (Medtronic Inc., Minneapolis, MN) is placed in the abdominal aorta under the renal arteries and a 21 Fr long multiperforated venous cannula (Medtronic Inc., Minneapolis, MN) is positioned at the junction of the inferior vena cava and the right auricle (Figure 3). Cannulae are introduced according to the Seldinger technique, so as to be completely sealed.

Injection of 2 g potassium chloride by the central venous catheter leads to cardiac arrest. Mechanical ventilation is stopped. The descending thoracic aorta is approached by a short left thoracotomy so as to be clamped (Figure 4). Another catheter is placed downstream from the clamp to monitor blood pressure. The laboratory model is shown schematically in Figure 5. After 30 minutes of warm ischemia, ANOR is started for 4 hours.

Abdominal normothermic oxygenated recirculation:

Procedure, progression, and data collection

Monitoring procedures with objectives and corrective actions are summarized in Table 1. Blood samples are collected via the central venous catheter before laparotomy and every hour during the ANOR on the arterial line. Plasmas from heparinized blood are stored for later biochemical analysis. At the end of 4 hours, kidneys are explanted and stored for later analysis. The ANOR is stopped. Cannulae and catheters are removed and the animal is euthanized.



Figure 2 Installation of the animal for the procedure.

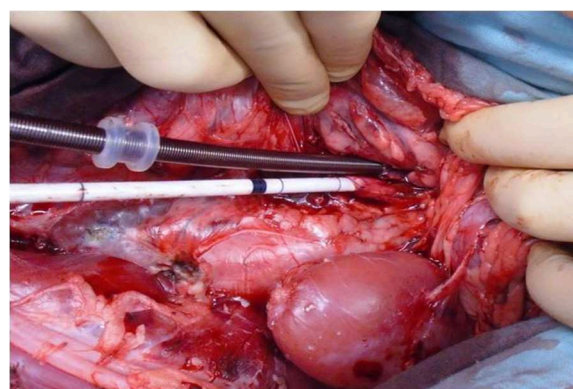


Figure 3 Cannulation of aorta and inferior vena cava under renal vessels by an extraperitoneal approach.



Figure 4 Aortic clamping and arterial catheter through left thoracotomy.

Parameters of monitoring procedures

The pump flow rate was monitored continuously during the procedure. The arterial pressure and central venous pressure were measured continuously during ANOR using a monitor HP 56S (Hewlett-Packard, Les Ulis, France). The partial pressures of oxygen and carbon dioxide, the fraction of inspired oxygen, and the pH were measured every 30 minutes during the procedure, using an i-STAT portable clinical analyzer (Hewlett-Packard, Les Ulis, France). The activated clotting time was also measured every 30 minutes, using a Hemostasis Management System (Medtronic, Boulogne-Billancourt, France).

Levels of plasma potassium, sodium, protein, lactate dehydrogenase (as an acidosis marker), and blood hemoglobin were quantified every hour during the ANOR procedure using an automated chemistry analyzer (Modular, Roche Diagnostics, France). To determine renal function, plasma creatinine was measured every hour during the ANOR, again using an automated chemistry analyzer (Modular, Roche Diagnostics, France).

Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. For the statistical analysis among groups, we used NCSS software (NCSS LLC, USA) and ANOVA or two-sample *t* test analysis in the case of normality (skewness, kurtosis, and omnibus tests) and equality of variance (modified Levene equal-variance test) and the Mann-Whitney *U* test or Kruskal-Wallis test for multiple comparison analysis where these parameters were not met. Differences with a *P* value of less than 0.05 were considered significant.

Results and discussion

Monitored parameters during abdominal normothermic oxygenated recirculation

Six 4-hour ANOR procedures were performed. Animal weight varied between 45 and 55 kg. The monitored parameters and objectives are listed in Table 1.

Results for the monitored parameters are expressed as mean $\pm$ standard deviation (Table 2). The pump flow rate, mean arterial pressure, and central venous pressure

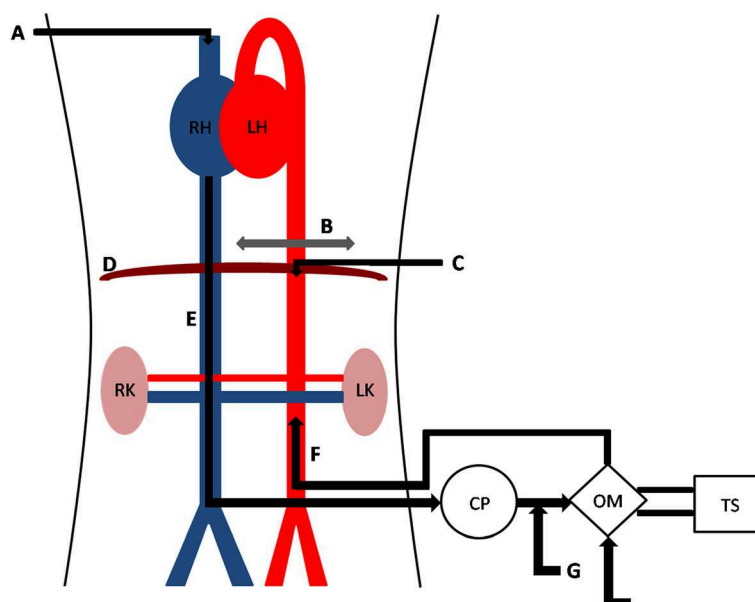


Figure 5 Abdominal normothermic oxygenated recirculation in the preclinical porcine model. A, central venous catheter; B, aortic clamp; C, arterial catheter; CP, centrifugal pump; D, diaphragm; E, venous canulae in inferior vena cava; F, arterial canulae in aorta; G, perfusion entry; H, gas entry; LH, left heart; LK, left kidney; OM, oxygenation membrane; RH, right heart; RK, right kidney; TS, thermoregulatory system.

Table 1 Monitoring procedures during abdominal normothermic oxygenated recirculation

Monitored parameters	Objectives	Type of monitoring	Corrective actions
Pump flow rate	2.5 to 3 l/min	Continuous monitoring	Vascular filling: saline and hydroxyethyl starch (10 ml/(kg h))
Mean arterial pressure	>60 mmHg		Continuous infusion of noradrenalin on the circuit
Central venous pressure	<5 mmHg		—
pH	7.5	Blood samples on the circuit every 30 minutes	Continuous infusion of sodium bicarbonate on the circuit
Partial pressure of carbon dioxide	30 to 40 mmHg		Sweeping gas flow adjustment
Partial pressure of oxygen	100 to 150 mmHg		Fraction of inspired oxygen adjustment
Activated clotting time	>200 s		Bolus of 5000 IU unfractionated heparin on the circuit

were controlled continuously during the ANOR procedure. Partial pressures of oxygen and of carbon dioxide were stabilized during the procedure, between 122 and 173 mmHg and between 30 and 37 mmHg, respectively. There was an exception for activated clotting time, which was rarely above 200 s. It was therefore often necessary to inject 5000 IU unfractionated heparin every 30 minutes during the ANOR process. The objectives, listed in Table 1, were achieved under reproducible conditions.

Evolution of biological parameters during abdominal normothermic oxygenated recirculation

The evolution of biological parameters during ANOR is summarized in Table 3. There was no significant difference between T0 and 4 hours of ANOR for pH (7.4 ± 0.01 to 7.4 ± 0.03 , respectively), serum sodium concentration (138 ± 1 to 138 ± 1 mmol/l, respectively), serum creatinine concentration (99 ± 6 to 129 ± 27 μ mol/l, respectively). Lactate dehydrogenase activity was significantly increased between T0 and 4 hours (714 ± 48 to 1041 ± 204 IU/l, respectively), and was probably related to the stresses of the surgery and muscular attrition. Serum protein and hemoglobin levels showed significant decrease between T0 and 4 hours of ANOR, demonstrating hemodilution and bleeding during surgery (56 ± 3 to 37 ± 3 g/l for serum

protein concentration and 12 ± 0.1 to 9.3 ± 0.6 g/dl for hemoglobin level). Correction of serum potassium levels was not perfect, with lower levels at 4 hours than at 1 hour; however, they remained significantly higher than at T0. This was due to the extracorporeal circulation circuit.

Discussion

The increasing demand for transplantation has created a need for additional organ sources, and acceptance criteria have been widened, not only for kidney retrieval but increasingly for other organs with a lower tolerance of warm ischemia, such as the liver, pancreas, and lungs [18,19]. This expansion of donor criteria to include the use of grafts from elderly donors, DCD, or organs from donors with other medical conditions has underlined the need for a technique that prevents any further damage during the preservation period. Previous reports strongly suggest that DCD donors are a valuable source of organs [3,14,20,21]. Reconditioning using ANOR appears to give better results than *in-situ* cooling preservation, with a reduction of primary nonfunction and delayed graft function [8]. In France, the national regulatory authority (Agence de la Biomédecine) has defined the conditions for organ removal, specifying the tolerated durations of warm and cold ischemia, for uncontrolled donors (type II of the Maastricht classification). However, no preliminary study

Table 2 Comparison of monitored parameters during abdominal normothermic oxygenated recirculation (mean $\pm$ standard deviation)

	ANOR 1	ANOR 2	ANOR 3	ANOR 4	ANOR 5	ANOR 6
Weight (kg)	49	51	55	45	50	45
Pump flow rate (l/min)	2.5 ± 0.03	2.5 ± 0.03	2.8 ± 0.03	2.7 ± 0.05	2.6 ± 0.05	2.5 ± 0.03
Mean arterial pressure (mmHg)	65 ± 6	64 ± 5	84 ± 3	86 ± 10	77 ± 3	75 ± 6
Noradrenalin (μ g/(kg min))	0.7 ± 0.05	1.1 ± 0.19	0.6 ± 0.08	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.07	0.7 ± 0.15
Fraction of inspired oxygen (%)	56 ± 3	62 ± 5	59 ± 5	45 ± 2	54 ± 1	56 ± 3
Partial pressure of oxygen (mmHg)	123 ± 25	122 ± 16	141 ± 27	173 ± 31	149 ± 13	151 ± 19
Sweeping gas flow (l/min)	3.2 ± 0.2	4 ± 0	4.3 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0
Partial pressure of carbon dioxide (mmHg)	37 ± 5	35 ± 1	35 ± 1	32 ± 2	30 ± 1	31 ± 1
Activated clotting time (s)	174 ± 32	183 ± 27	180 ± 21	198 ± 33	173 ± 20	171 ± 20

ANOR, abdominal normothermic oxygenated recirculation.

Table 3 Evolution of biological parameters during abdominal normothermic oxygenated recirculation (means $\pm$ standard deviation)

	T0	1 hour	2 hours	3 hours	4 hours	P T0 versus 4 hours
pH	7.4 $\pm$ 0.01	7.42 $\pm$ 0.06	7.42 $\pm$ 0.03	7.40 $\pm$ 0.05	7.44 $\pm$ 0.03	0.1795
Serum potassium (mmol/l)	4.1 $\pm$ 0.2	7.1 $\pm$ 0.5	7.9 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.5	6.8 $\pm$ 0.6	0.0002*
Serum sodium (mmol/l)	138 $\pm$ 1	136 $\pm$ 1	139 $\pm$ 1	137 $\pm$ 2	139 $\pm$ 3	0.4825
Serum protein (g/l)	56 $\pm$ 3	41 $\pm$ 3	45 $\pm$ 2	39 $\pm$ 2	37 $\pm$ 3	0.0002*
Hemoglobin (g/dl)	12 $\pm$ 0.1	10.9 $\pm$ 0.5	11.1 $\pm$ 0.5	10.1 $\pm$ 0.8	9.3 $\pm$ 0.6	0.0001*
Creatinine (μ mol/l)	99 $\pm$ 6	130 $\pm$ 5	132 $\pm$ 18	133 $\pm$ 21	129 $\pm$ 27	0.1673
Lactate dehydrogenase (IU/l)	714 $\pm$ 48	1,036 $\pm$ 193	1,354 $\pm$ 133	1,132 $\pm$ 233	1,041 $\pm$ 204	0.0424*

*: statistically significant.

has determined the optimal conditions for ANOR. Consequently, there is room for experimental studies to decipher the different steps of the protocol.

The development of a porcine preclinical experimental model of DCD donors allows for a study of the ANOR impact on organs without the limitations of a clinical study. Several models of DCD donors have previously been published in the literature to study the conditioning of kidney transplants by normothermic perfusion. Recently, using rats of 300 g and a warm ischemia period corresponding to clamping of the renal artery for 15 or 30 minutes, Moers *et al.* studied reperfusion for 1 to 2 hours [22]. However, the restored pulsatile flow was far from comparable to a continuous flow of ANOR. In 2008, Hosgood *et al.* used a Large White pig model weighing between 40 and 50 kg [23]. In this model, after 25 minutes of warm ischemia, kidneys were reperfused normothermically for 3 hours in an isolated organ preservation system using autologous blood. However, this experimental condition remains far from a clinical situation. In 2010, Rojas-Pena *et al.* used an extracorporeal membrane oxygenation circuit with pigs from 25 to 30 kg [24]. Both external jugular veins were cannulated in place of the inferior vena cava. In addition, the absence of clamping of the descending thoracic aorta mimicked a systemic circulation model, which was not exactly the ANOR condition. The durations of warm ischemia were 10 and 30 minutes, respectively, and 90 and 100 minutes for reperfusion.

To our knowledge, the uncontrolled DCD model presented herein is the closest to the conditions encountered in clinical practice. Indeed, we use a large animal, the pig, well accepted as a preclinical model with a size, anatomy, and cardiovascular physiology very similar to those of human beings. Our model also used truly regional circulation between the inferior vena cava and the abdominal aorta, which was limited to the subdiaphragmatic region by clamping of the descending thoracic aorta. Moreover, our model is highly reproducible. In all cases, hemodynamic and respiratory objectives were achieved with very similar conditions from one animal to

another. After 4 hours of ANOR, there was no significant difference compared with T0 for pH and plasma sodium levels. Lactate dehydrogenase levels were increased, a sign of tissue damage that was probably due to the stresses of surgery (incisions, muscular attrition, and so on); the lack of change between 1 and 4 hours of ANOR highlight the fact that this marker is not adapted for discriminant diagnosis determination. We observed an expected hemodilution, mainly due to the ANOR priming (about 700 to 800 cm³). However, hemoglobin levels remained correct, at 9.3 $\pm$ 0.6 g/dl after 4 hours of ANOR. Interestingly, in our hands, renal function likewise remained stable during ANOR and reached a steady state during the procedure.

However, the injection of heparin before cardiac arrest is a critical limit in this model. We aim to correct this easily in future protocols. Note that in previously described models, injection of heparin was likewise carried out before cardiac arrest.

It would also have been interesting to monitor urine production during ANOR. However, bladder catheterization of Large White male pigs is not possible, owing to a tortuous urethra and we consequently chose not to approach the bladder surgically, thereby avoiding the opening of the peritoneum and fluid, particularly lymph fluid, accumulation. However, we noted that at the end of ANOR, urine (about 500 cm³) was collected in the bladder. To better monitor kidney function, the implantation of a urine catheter during ANOR is envisioned for future experiments.

Conclusions

We developed a preclinical experimental model of uncontrolled DCD kidneys donors using ANOR. This model will allow the development of experimental procedures and the study of systemic and renal impact of the ANOR at different steps. Many issues could be addressed, such as optimal temperature and duration. This model could help to tailor strategies and to build clinical protocols for preservation and viability prediction and evaluate preservation protocols following ANOR. It is ideal to determine the optimal conditions for pre- and post-conditioning, which

hold the potential to reduce graft injury. It will allow comparative studies between ANOR and *in-situ* cooling preservation. This model can also facilitate the study of conditioning protocols for other abdominal organs with ANOR and the effect of additives on ischemia-reperfusion injury. The translational relevance of the pig also permits the study of relevant biomarkers for real-time evaluation of organ viability during and after ANOR. Finally, the technology is readily available and easy to handle with a relatively short learning curve. Such programs could be included in transplantation operative procedures and surgical skills taught to young European surgeons entering the field of transplantation surgery.

Additional file

Additional file 1: Video of surgical procedure.

Abbreviations

ANOR: abdominal normothermic oxygenated recirculation; ANOVA: analysis of variance; DCD: donation after circulatory determination of death.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GA wrote the article, participated in the development of the model, realized the surgical protocol, and participated in the monitoring procedure. TK participated in the development of the model, conducted anesthesia, and participated in the monitoring procedure. RT participated in the development of the model. POD and TSY participated in the surgical protocol and in the monitoring procedure. MP participated in the development of the model and the anesthetic procedure. TH supervised the work and contributed to the writing. SG contributed to the writing. CJ participated in the development of the model, the realization of the surgical protocol, and the monitoring procedure. BB contributed to the development of the model and to the writing. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Maquet for providing some materials. We also thank William Hebrard, Pierre Couturier, and Catherine Henry for their excellent technical support. Finally, we thank Raphael Thuillier PhD for his support with the editing of the manuscript.

Funding

The authors wish especially to thank the sources of funding: INSERM, European Society for Organ Transplantation, Fondation de l'Avenir, Conseil Régional Poitou-Charentes, Université de Poitiers, Centre Hospitalo-Universitaire de Poitiers, Institut National pour la Recherche Agronomique et Société Francophone de Transplantation.

Author details

¹INSERM U1082, CHU de Poitiers, rue de la Milétrie, B.P. 577, F-86021 Cedex Poitiers, France. ²CHU de Poitiers, Service de Chirurgie cardio-thoracique, Poitiers F-86000, France. ³CHU de Poitiers, Service de Réanimation chirurgicale, Poitiers F-86000, France. ⁴CHU de Montpellier, Service d'Urologie et de transplantation rénale, Montpellier F-34295, France. ⁵CHU de Poitiers, Service d'Urologie, Poitiers F-86000, France. ⁶Université de Poitiers, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Poitiers F-86000, France. ⁷CHU Poitiers, Service de Biochimie, Poitiers F-86000, France. ⁸BISA Platform 'Experimental Surgery and Transplantation', INRA, Domaine expérimental du Magneraud, Surgères F-17700, France. ⁹GH Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Service d'Urologie et de transplantation rénale, Paris F-75013, France. ¹⁰UPMC Université Paris VI, Paris F-75013, France.

Received: 8 April 2014 Accepted: 4 June 2014

Published: 14 June 2014

References

- Kugler C, Gottlieb J, Warnecke G, Schwarz A, Weissenborn K, Barg-Hock H, Bara C, Einhorn I, Haverich A, Haller H: **Health-related quality of life after solid organ transplantation: a prospective, multiorgan cohort study.** *Transplantation* 2013, **96**:316–323.
- Núñez JR, Del Rio F, Lopez E, Moreno MA, Soria A, Parra D: **Non-heart-beating donors: an excellent choice to increase the donor pool.** *Transplant Proc* 2005, **37**:3651–3654.
- Daemen JH, de Wit RJ, Bronkhorst MW, Yin M, Heineman E, Kootstra G: **Non-heart-beating donor program contributes 40% of kidneys for transplantation.** *Transplant Proc* 1996, **28**:105–106.
- Farney AC, Singh RP, Hines MH, Rogers J, Hartmann EL, Reeves-Daniel A, Gautreaux MD, Iskandar SS, Adams PL, Stratta RJ: **Experience in renal and extrarenal transplantation with donation after cardiac death donors with selective use of extracorporeal support.** *J Am Coll Surg* 2008, **206**:1028–1037.
- Barlow AD, Metcalfe MS, Johari Y, Elwell R, Veitch PS, Nicholson ML: **Case-matched comparison of long-term results of non-heart beating and heart-beating donor renal transplants.** *Br J Surg* 2009, **96**:685–691.
- Benoit G, Bensadoun H, Borie I, Vavasseur G, Gillot C: **A double balloon catheter for the procurement of abdominal organs.** *Ann Urol* 1990, **24**:199–201.
- Snoeijs MG, Dekkers AJ, Buurman WA, van den Akker L, Welten RJ, Schurink GW, van Heurn LW: **In situ preservation of kidneys from donors after cardiac death: results and complications.** *Ann Surg* 2007, **246**:844–852.
- Valero R, Cabrer C, Oppenheimer F, Trias E, Sánchez-Ibáñez J, De Cabo FM, Navarro A, Paredes D, Alcaraz A, Gutiérrez R, Manyalich M: **Normothermic recirculation reduces primary graft dysfunction of kidneys obtained from non-heart-beating donors.** *Transpl Int* 2000, **13**:303–310.
- Fondevila C, Hessheimer AJ, Ruiz A, Calatayud D, Ferrer J, Charco R, Fuster J, Navasa M, Rimola A, Taurá P, Ginés P, Manyalich M, García-Valdecasas JC: **Liver transplant using donors after unexpected cardiac death: novel preservation protocol and acceptance criteria.** *Am J Transplant* 2007, **7**:1849–1855.
- Ko WJ, Chen YS, Tsai PR, Lee PH: **Extracorporeal membrane oxygenation support of donor abdominal organs in non-heart-beating donors.** *Clin Transplant* 2000, **14**:152–156.
- Gravel MT, Arenas JD, Chenault R 2nd, Magee JC, Rudich S, Maraschio M, DebRoy M, Miller W, Punch JD: **Kidney transplantation from organ donors following cardiopulmonary death using extracorporeal membrane oxygenation support.** *Ann Transplant* 2004, **9**:57–58.
- Billault C, Godfroy F, Thibaut F, Bart S, Arzouk N, Van Glabeke E, Fehri K, Ourahma S, Nicolas-Robin A, Barrou B: **Organ procurement from donors deceased from cardiac death: a single-center efficiency assessment.** *Transplant Proc* 2011, **43**:3396–3397.
- Antoine C, Brun F, Tenaillon A, Loty B: **Organ procurement and transplantation from non-heart-beating donors.** *Nephrol Ther* 2008, **4**:5–14.
- Barrou B, Billault C, Nicolas-Robin A: **The use of extracorporeal membrane oxygenation in donors after cardiac death.** *Curr Opin Organ Transplant* 2013, **18**:148–153.
- Hauet T, Goujon JM, Baumert H, Petit I, Carretier M, Eugene M, Vandewalle A: **Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotransplanted pig kidneys.** *Kidney Int* 2002, **62**:654–667.
- Giraud S, Thuillier R, Belliard A, Hebrard W, Nadeau C, Milin S, Goujon JM, Manguy E, Maucio G, Hauet T, Macchi L: **Direct thrombin inhibitor prevents delayed graft function in a porcine model of renal transplantation.** *Transplantation* 2009, **87**:1636–1644.
- 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.
- Fondevila C, Hessheimer AJ, Flores E, Ruiz A, Mestres N, Calatayud D, Paredes D, Rodríguez C, Fuster J, Navasa M, Rimola A, Taurá P, García-Valdecasas JC: **Applicability and results of Maastricht type 2 donation after cardiac death liver transplantation.** *Am J Transplant* 2012, **12**:162–170.

19. Ausania F, White SA, Coates R, Hulme W, Manas DM: **Liver damage during organ donor procurement in donation after circulatory death compared with donation after brain death.** *Br J Surg* 2013, **100**:381–386.
20. Kootstra G, Wijnen R, van Hooff JP, van der Linden CJ: **Twenty percent more kidneys through a non-heart beating program.** *Transplant Proc* 1991, **23**:910–911.
21. Abboud I, Viglietti D, Antoine C, Gaudez F, Meria P, Tariel E, Mongiat-Artus P, Desgranchamps F, Roussin F, Fieux F, Jacob L, Randoux C, Michel C, Flamant M, Lefaucheur C, Pillebout E, Serrato T, Peraldi MN, Glotz D: **Preliminary results of transplantation with kidneys donated after cardiocirculatory determination of death: a French single-center experience.** *Nephrol Dial Transplant* 2012, **27**:2583–2587.
22. Moers C, van Rijt G, Ploeg RJ, Leuvenink HG: **The effect of normothermic recirculation before cold preservation on post-transplant injury of ischemically damaged donor kidneys.** *Transpl Int* 2012, **25**:210–217.
23. 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, **85**:88–92.
24. Rojas-Pena A, Reoma JL, Krause E, Boothman EL, Padiyar NP, Cook KE, Bartlett RH, Punch JD: **Extracorporeal support: improves donor renal graft function after cardiac death.** *Am J Transplant* 2010, **10**:1365–1374.

doi:10.1186/2047-1440-3-13

Cite this article as: Allain *et al.*: Development of a preclinical model of donation after circulatory determination of death for translational application. *Transplantation Research* 2014 **3**:13.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



1.1. Introduction

La modélisation préclinique des DDAC non contrôlés a été la première étape de ce travail. L'objectif était d'obtenir un modèle préclinique reproductible permettant d'étudier l'impact de la CRN sur le greffon rénal, en s'affranchissant des contraintes liées à la clinique. Les limites de temps appliquées à ce modèle en termes d'ischémie chaude et de reconditionnement sont basées sur les durées recommandées par l'ABM.

1.2. Matériel et méthode (synthèse)

Le protocole a été mené en respectant la réglementation du Ministère de l'Agriculture, de l'Institut National pour la Recherche Agronomique et du comité régional d'éthique sur l'expérimentation animale.

Les animaux utilisés étaient des porcs Large White mâles, âgés de 3 mois et pesant 40 à 50kg. Le matériel d'ECMO utilisé comprenait une pompe centrifuge Rotaflow Maquet et un circuit Sofline Coating Maquet-Jostrà enduite à l'héparine (Maquet Cardiopulmonary AG, Hirrlingen, Allemagne). Un groupe thermique permettait le maintien de la normothermie. Environ 800ml d'hydroxyéthylamidon était nécessaire pour amorcer le circuit.

Après anesthésie générale et mise en place d'une voie veineuse centrale, une laparotomie était réalisée avec dissection par voie extra-péritonéale de l'aorte et de la veine cave inférieure sous-rénales. Après l'injection d'une dose d'héparine non fractionnée (300UI/kg selon les recommandations de l'ABM), une canule veineuse de 21Fr et artérielle de 14Fr (Medtronic Inc. Minneapolis, MN) étaient mises en place selon la technique de Seldinger. L'arrêt cardiaque était obtenu par injection directe en intraveineux (IV) de 2g de chlorure de potassium. La ventilation mécanique était alors arrêtée. Un abord de l'aorte thoracique descendante par thoracotomie antérieure gauche permettait le clampage de l'aorte sus-diaphragmatique et la mise en place d'un cathéter artériel en aval afin de monitorer la pression

artérielle sanglante. Après 30 minutes d'ischémie chaude, la CRN était mise en route pour 4 heures.

Des prélèvements de sang circulant étaient réalisés toutes les 30 minutes. Un remplissage vasculaire par hydroxyléthylamidon et sérum physiologique en alternance (10ml/kg/h) et une perfusion continue de noradrénaline permettait de maintenir les objectifs de débit (2,5 à 3L/min) et de pression artérielle moyenne (supérieure à 60mmHg). Une gazométrie artérielle et une mesure de l'*activated clotting time* (ACT) étaient réalisées toutes les 30 minutes avec pour objectifs :

- Un pH maintenu autour de 7,5 ;
- Une pression partielle en oxygène comprise entre 100 et 150mmHg ;
- Une pression partielle en dioxyde de carbone comprise entre 30 et 40mmHg ;
- Un ACT supérieur à 200 secondes.

L'utilisation de bicarbonate de sodium en perfusion continue, d'héparine non fractionnée et l'ajustement de la fraction inspirée en oxygène et du balayage des gaz frais sur la membrane d'oxygénation permettaient de maintenir ces paramètres.

A la fin des 4 heures de CRN, les reins étaient explantés et conservés pour analyses ultérieures.

1.3. Résultats

Six CRN de 4 heures ont pu être réalisées dans des conditions parfaitement reproductibles et en respectant les paramètres précisés ci-dessus.

Il n'y avait pas de différence significative entre T0 et 4h pour le pH ($7,4 \pm 0,01$ et $7,4 \pm 0,03$ avec $p=0,1795$), la natrémie (138 ± 1 et 138 ± 1 mmol/L avec $p=0,4825$) et la créatininémie (99 ± 6 et 129 ± 27 μmol/L avec $p=0,1673$). Le taux de lactate déshydrogénase (LDH) augmentait par contre de façon significative entre T0 et 4h (714 ± 48 et 1041 ± 204 UI/L avec $p=0,0424$), probablement en lien avec le stress chirurgical. La protidémie (56 ± 3 et 37 ± 3 g/L,

avec $p=0,0002$) et le taux d'hémoglobine ($12\pm 0,1$ et $9,3\pm 0,6$ g/dl, avec $p=0,0001$) diminuait de façon significative entre T0 et 4h, témoignant de l'hémodilution induite par le volume d'amorçage de la CRN et le remplissage vasculaire, ainsi que par les pertes sanguines inhérentes à la chirurgie. Enfin, la correction de la kaliémie était difficile restant significativement plus haute à 4h par rapport à T0 ($4,1\pm 0,2$ et $6,8\pm 0,6$ mmol/L, avec $p=0,0002$).

1.4. Discussion

Les DDAC semblent être une source prometteuse de greffons rénaux afin de faire face à la pénurie actuelle. Ils souffrent cependant d'une période d'ischémie chaude pendant l'arrêt circulatoire et la période de réanimation et sont donc plus vulnérables aux lésions d'IR. Des différentes méthodes de reconditionnement développées pour palier à cette souffrance, la CRN semble donner les meilleurs résultats en termes de RRF et de NFP. En France, l'ABM encadre les prélèvements chez les DDAC non contrôlés depuis 2006. Elle a défini des durées d'ischémie chaude et froide maximales tolérées, ainsi que les durées maximales de reconditionnement par CRN et par RIS. Cependant, aucune étude préliminaire n'a été menée afin de déterminer la meilleure méthode de reconditionnement et sa durée optimale.

Le développement d'un modèle porcin préclinique permet d'étudier l'impact de la CRN sur le greffon rénal en s'affranchissant des contraintes cliniques liées à une procédure de greffe. Plusieurs modèles animaux ont déjà été publiés afin d'étudier l'impact de la perfusion normothermique sur des reins en condition de DDAC. En 2012, l'équipe de Moers a étudié l'impact de la reperfusion pendant 1 à 2 heures sur des reins de rats de 300g avec une période d'ischémie chaude de 15 à 30 minutes par clampage de l'artère rénale. La restauration d'un flux sanguin pulsatile au déclampage est bien éloignée du flux laminaire induit par la CRN. En 2008, l'équipe de Hoosgood a utilisé un modèle porcin de Large White pesant entre 40 et 50kg. Après 25 minutes d'ischémie chaude, les reins étaient reperfusés pendant 3 heures sur

un banc de perfusion en utilisant le sang de l'animal en normothermie. Cette technique de perfusion isolée d'organe *ex vivo* est là aussi très différente des conditions rencontrées au cours d'une CRN. En 2010, l'équipe de Rojas-Pena a utilisé un circuit d'ECMO chez des porcs de 25 à 30kg. Les durées d'ischémie chaude étudiées étaient de 10 et 30 minutes et de reperfusion de 90 et 100 minutes. Les deux veines jugulaires étaient canulées à la place de la veine cave inférieure et il n'y avait pas de clampage de l'aorte thoracique descendante limitant la recirculation à la région abdominale. Ce modèle correspondait ainsi à une recirculation de l'ensemble de l'organisme et différait là encore des conditions de CRN.

Le modèle porcin de DDAC non contrôlé avec mise en place de CRN que nous avons mis au point reste toujours à l'heure actuelle et à notre connaissance, le modèle le plus proche des conditions rencontrées dans la pratique clinique. La canulation de l'aorte et de la veine cave inférieure et le clampage de l'aorte thoracique descendante en font une vraie reperfusion limitée à la région sous-diaphragmatique. Notre expérience a montré que ce modèle était tout à fait reproductible.

Le porc est reconnu en tant que modèle préclinique du fait d'une physiologie très proche de l'homme. Il existe de plus une grande proximité anatomique du rein de porc, qui comme chez l'homme est multi-papillaire et multi-lobulé. Le réseau vasculaire est également très proche. Les résultats ainsi obtenus sont facilement transposables à l'homme. Parmi les gros mammifères, le porc est très accessible et présente de nombreux avantages. A 3 mois, au moment du prélèvement et de la greffe, le porc Large White pèse environ 40kg. Ce gabarit autorise l'utilisation du même matériel qu'en clinique humaine (canules, circuit de CRN, machine de perfusion). Enfin, son faible coût d'entretien parmi les gros mammifères, autorise un suivi jusqu'à 3 mois après la greffe dans l'animalerie. L'animal pèse alors environ 120kg. Ce délai de 3 mois est précieux pour suivre et évaluer le développement des lésions rénales après transplantation.

Bien sûr, ce modèle présente des limites. La reproduction parfaite des conditions cliniques n'a pas été possible et des adaptations ont été nécessaires. Les vaisseaux fémoraux étant de très petits calibres chez le porc, il a été décidé de canuler directement l'aorte et la veine cave inférieure sous-rénales par laparotomie, induisant un stress chirurgical plus important que lors d'un abord vasculaire fémoral. Nous avons également fait le choix d'hépariniser et de canuler l'animal avant l'arrêt cardiaque, afin de respecter strictement la durée d'ischémie chaude.

Par ailleurs, dans nos conditions expérimentales, cette durée d'ischémie chaude a été réduite au *no flow* maximal toléré de 30 minutes sans période de *low flow* associée. La réalisation d'une période de *low flow* avec utilisation d'une machine à masser a été étudiée (**figure 5**). Son efficacité a d'ailleurs déjà été validée chez des animaux de gabarit équivalent [160]. Mais l'anatomie du thorax de porc, avec présence des poumons entre le massif cardiaque et le rachis, a entraîné des lésions d'hémorragie intra-alvéolaire très sévères lors du massage cardiaque, compliquant par la suite l'amorçage de la CRN. On peut cependant considérer que les lésions liées à la période d'ischémie chaude sont essentiellement les conséquences du *no flow*.

1.5. Conclusion

Les DDAC semblent être une source prometteuse de greffons rénaux. En France, leur reconditionnement est encadré par l'ABM qui a arrêté des durées maximales empiriques d'ischémies chaude et froide tolérées et qui laisse le choix aux équipes entre CRN et RIS. La compréhension et l'optimisation de ce reconditionnement est indispensable. La réalisation d'études comparatives randomisées en clinique dans ce contexte de DDAC étant difficile, la modélisation chez l'animal présente un intérêt majeur. Nous avons mis au point un modèle préclinique de DDAC avec reconditionnement des organes abdominaux par CRN. De tous les modèles décrits dans la littérature, ce modèle semble être le plus proche des conditions



Figure 5 : Utilisation de la machine à masser chez le porc Large White.

rencontrées en clinique. Sa grande reproductibilité offre la possibilité de l'étude de l'impact propre d'un seul paramètre, comme la durée du reconditionnement ou l'utilisation d'un additif, les autres paramètres restant parfaitement similaires. S'affranchissant des contraintes cliniques, il permet une analyse mécanistique des événements.

Au-delà du rein, ce modèle offre par ailleurs la possibilité d'étudier le reconditionnement d'autres organes, comme le foie ou le pancréas.

Enfin, il peut également être utile pour la formation à la technique de CRN des jeunes praticiens au sein des équipes de transplantation.

1.6. Données complémentaires

La mise au point de ce modèle nous a permis d'étudier le retentissement général de la CRN dans les conditions de DDAC à travers l'étude du phénotype et l'analyse transcriptomique des leucocytes sanguins.

1.6.1. Matériel et méthode

Le phénotype des leucocytes sanguins a été déterminé par immunomarquage sur sang total à partir de 200µL auquel sont ajoutés les anticorps marqués à un fluorochrome (anticorps anti-TLR4 et anticorps anti-*Swine Leucocyte Antigen* (SLA) de classe II DR). L'expression de TLR4 et de SLAII DR à la surface des leucocytes est corrélée à un état d'activation immunitaire, ces deux molécules étant des marqueurs de l'immunité innée [62, 161]. Après 30 minutes d'incubation, les globules rouges sont lysés avec une solution hypotonique (Kit Becton Dickinson). Les cellules sont ensuite lavées puis suspendues en solution saline tamponnée au phosphate avec 1% de sérum albumine bovin. L'analyse de l'expression des protéines membranaires a été réalisée en cytométrie de flux (FACS BD CANTO II, logiciel BD FACS DIVA) par quantification de l'expression membranaire de l'antigène étudié en corrélation à la fluorescence émise par le fluorochrome couplé à l'anticorps, après sélection de la population d'intérêt selon ses caractéristiques de taille (*Side Scatter*) et de granulosité (*Forward Scatter*).

L'analyse transcriptomique des leucocytes sanguins a été réalisée après isolation des leucocytes du sang circulant par centrifugation, après lyse des globules rouges en milieu hypotonique (Kit Becton Dickinson). L'extraction d'ARN a été réalisée par la méthode utilisant le Trizol selon les recommandations du fabricant (Fischer Scientific, Illkirch, France). L'ADN génomique est éliminé par ADNase en utilisant le *DNA-free kit* (Applied Biosystems, Foster Coty, CA, USA). L'ADN complémentaire est obtenu par transcription inverse en utilisant des amorces aléatoires. La *polymerase chain reaction* (PCR) quantitative est réalisée dans des plaques optiques (96 puits) à partir de 10ng d'ADN complémentaire sur l'appareil ABI Prism 7300, selon les recommandations du fabricant (Applied Biosystems). Les amorces d'ADN porcin sont conçues par OligoPerfect™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Les transcrits étudiés, impliqués dans la réponse inflammatoire et immunitaire, sont TNF- α , TLR4 et SLAII DR, IL-6, IL-8 et IFN- γ .

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type. Après significativité observée avec le test ANOVA (analyse de variance) applicable car la population est homogène (porcs de même corpulence et de même âge), le test t de Student a été utilisé pour réaliser les tests statistiques à comparaisons multiples. Les différences pour une valeur de p inférieure à 0,05 sont considérées comme significatives.

Chaque groupe était composé de 4 animaux ($n=4$).

1.6.2. Résultats et discussion

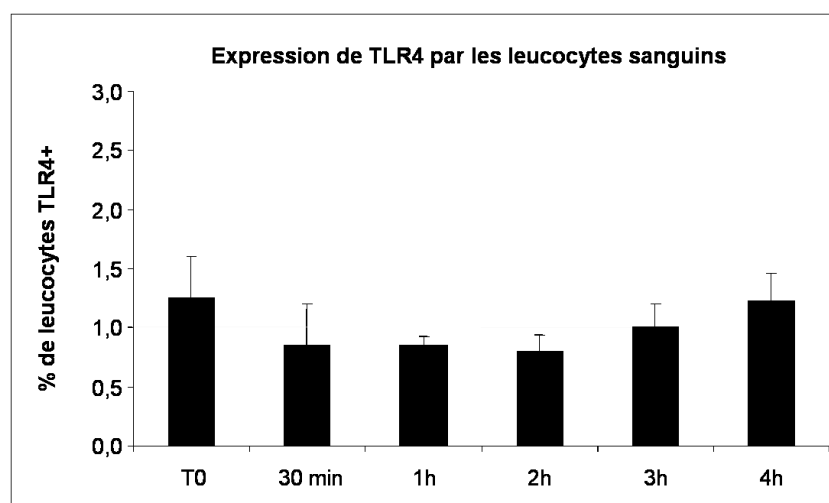


Figure 6 : Pourcentage d'expression de TLR4 par les leucocytes sanguins au cours de la CRN.

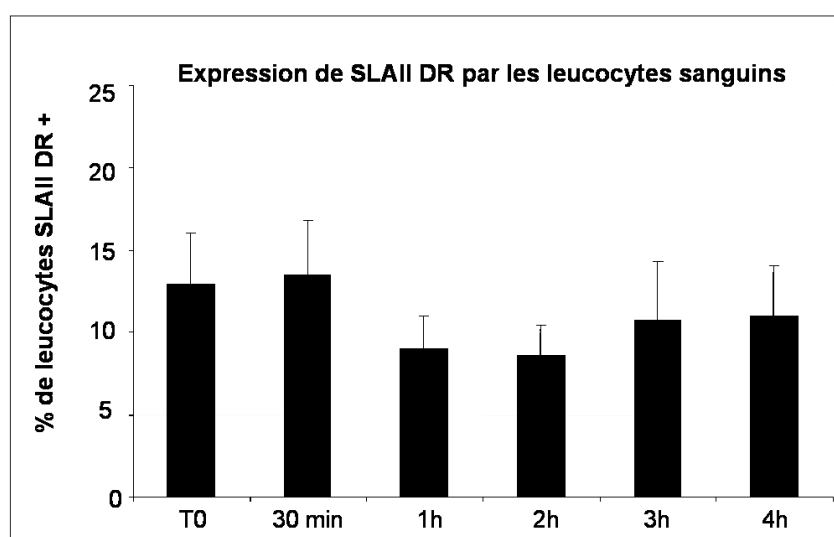


Figure 7 : Pourcentage d’expression de SLAII DR par les leucocytes sanguins au cours de la CRN.

Concernant l’étude du phénotype des leucocytes sanguins, on constate qu’il n’existe pas d’augmentation significative de leur état d’activation au cours de la CRN (**figures 6 et 7**).

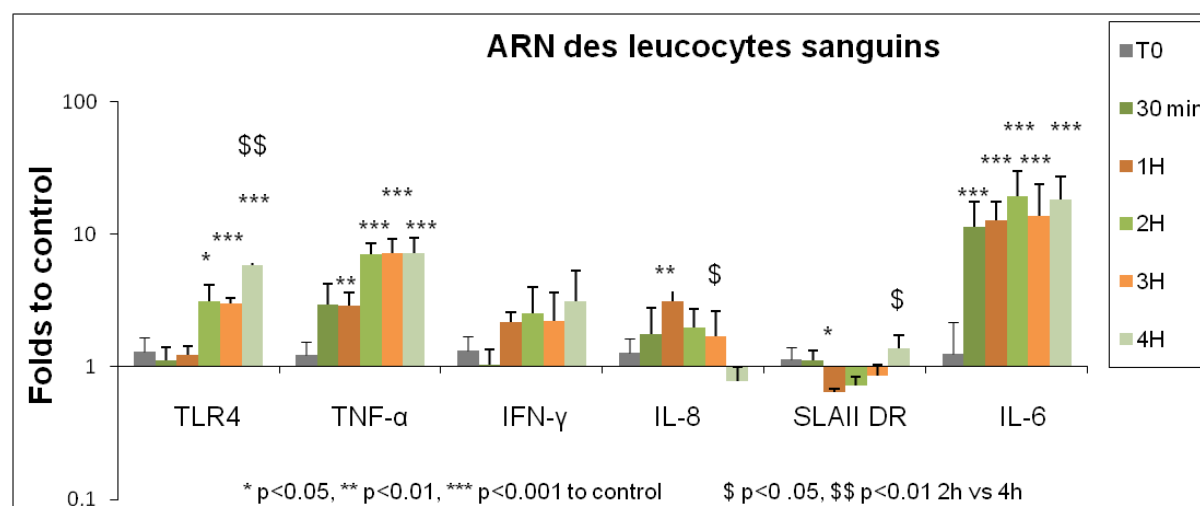


Figure 8 : Analyse transcriptomique des leucocytes sanguins au cours de la CRN.

Concernant l’analyse transcriptomique des leucocytes sanguins (**figure 8**), on observe une augmentation stable, statistiquement significative, de l’expression de TNF-α et d’IL-6 par rapport au contrôle durant la CRN. L’expression d’IL-8 augmente significativement par

rapport au contrôle à 1 heure ($p < 0,01$) pour diminuer progressivement avec un taux à 4 heures moins important qu'à 2 heures ($p < 0,05$). L'expression de TLR4 augmente progressivement pendant la CRN avec à 4 heures un taux supérieur à 2 heures ($p < 0,01$). L'expression de SLAII DR est initialement plus basse par rapport au contrôle ($p < 0,05$ à 1 heure) et son augmentation est plus tardive. Elle est également plus importante à 4 heures qu'à 2 heures ($p < 0,05$). L'INF- γ augmente non significativement pendant la CRN.

Ces premiers résultats suggèrent que si la CRN est en elle-même un facteur d'inflammation, celle-ci ne semble pas s'intensifier avec sa durée. On constate en effet une stabilité de l'expression des cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire précoce (TNF- α et IL-6), et une diminution de celle d'IL-8. Si les leucocytes ne semblent pas plus activés après 2 heures ou 4 heures de CRN, l'analyse transcriptomique suggère néanmoins que la synthèse des gènes TLR4 et SLAII DR, marqueurs de l'activation immunitaire, augmente avec la durée de la CRN. On peut donc supposer que la poursuite de la CRN au-delà de 4 heures pourrait entraîner une activation plus importante de la réponse immunitaire.

2. Comparaison du reconditionnement par CRN et par RIS

2.1. Introduction

Parallèlement à la modélisation des DDAC avec reconditionnement des organes abdominaux par CRN, le modèle de RIS chez le porc a également été mis au point au sein du laboratoire au cours d'un travail de thèse [162]. Le choix de l'utilisation de la CRN ou du RIS est laissé à l'appréciation de chaque équipe de transplantation dans le cadre des DDAC non contrôlés avec comme vu précédemment, une grande variabilité dans les pratiques d'un pays à un autre.

Devant l'absence d'arguments forts en faveur de l'une ou l'autre technique et compte-tenu des enjeux importants en termes de santé publique, il nous a paru fondamental de revenir vers des bases expérimentales pour étudier ces modes de reconditionnement et pour tenter de dégager de grandes lignes de prise en charge scientifiquement prouvées. Il paraît nécessaire de mieux préciser, en s'appuyant sur des études mécanistiques, les modalités pratiques optimales de réalisation du prélèvement d'organes à partir des DDAC.

La maîtrise de ces deux méthodes de reconditionnement sur le porc nous a permis de tenter de répondre à cette problématique.

2.2. Matériel et méthode

Le protocole a été réalisé en accord avec la réglementation en vigueur du Ministère de l'Agriculture et le comité local d'éthique sur l'expérimentation animale (Institut National pour la Recherche Agronomique).

2.2.1. Conditionnement préopératoire et protocole d'anesthésie

Dans les deux groupes, les animaux utilisés étaient des porcs Large White mâles, âgés de 3 mois et pesant 40 à 50kg.

Les animaux étaient soumis à une alimentation standard (Société Arrive, Saint-Fulgent, France) avec un accès libre à l'eau. Ils étaient placés dans des box individuels et soumis à une température ambiante constante ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). Une diète était débutée 24 heures avant l'intervention.

Le protocole d'anesthésie et la mise en condition dans le groupe RIS étaient identiques à ceux décrits dans la procédure de CRN.

2.2.2. Procédure de RIS

Après laparotomie xipho-pubienne, le rein gauche, l'aorte abdominale et la veine cave inférieure sous-rénales étaient abordés par voie extra-péritonéale. Les vaisseaux étaient disséqués sur quelques centimètres afin de préparer la canulation. Une dose d'héparine non fractionnée de 300UI/kg était réalisée en IV direct. L'aorte était canulée par une sonde de Gillot (Coloplast, Freudenberg, Danemark). Les deux ballonnets de la sonde étaient gonflés sous contrôle manuel. Le dispositif était purgé avec du SCOT15® (Macopharma, Tourcoing, France), solution de conservation de quatrième génération. La veine cave inférieure était canulée avec une sonde Rüsch (Téléflex Médical, Kernen, Allemagne) charrière 22 et reliée à une poche de décharge (Macopharma, MacoBiotech Transplant, Mouvaux, France). L'arrêt cardiaque était obtenu par injection directe en IV de 2g de chlorure de potassium. La ventilation était arrêtée.

Après 30 minutes d'ischémie chaude, le lavage des deux reins avec le liquide de perfusion SCOT15® était mis en route. Le débit initial était élevé (environ 150ml/min) de manière à obtenir en moins de 30 minutes une bonne décoloration au niveau de la décharge cave. Il était ensuite ralenti. Environ 15L de liquide de conservation étaient nécessaires pour l'ensemble de la procédure.

Après 180 minutes de perfusion, les reins étaient prélevés et mis en machine de perfusion LifePort™ Kidney Transporter en utilisant la solution KPS-1, pour 15 heures de conservation.

2.2.3. Procédure de CRN

Les CRN ont été réalisées selon les paramètres décrits précédemment. A l'issue de la CRN, les reins étaient également prélevés et mis en machine de perfusion en utilisant la solution KPS-1, pour 18 heures de conservation.

2.2.4. Procédure d'allogreffe

Les animaux receveurs étaient allo-compatibles (6 allèles des 3 gènes du SLA identiques) permettant la réalisation de greffes rénales sans adjonction de traitement immunosuppresseur [163].

Les deux greffes étaient réalisées en parallèle par deux équipes chirurgicales.

Le conditionnement préopératoire, l'anesthésie et l'installation des animaux receveurs étaient strictement identiques à celles décrites précédemment pour les donneurs.

Dans un premier temps, une cervicotomie gauche était réalisée pour la mise en place d'une voie veineuse centrale dans la veine jugulaire interne gauche. Son externalisation derrière l'oreille gauche avec fixation cutanée permettait son maintien pendant les 15 jours suivant la greffe pour l'administration des solutés de réanimation et la réalisation des prélèvements sanguins. Un cathéter artériel était mis en place par la même cervicotomie dans l'artère carotide interne gauche, permettant une surveillance continue de la pression artérielle pendant la greffe. Il était retiré en fin d'intervention. Les pertes hydro-sodées étaient compensées par 10ml/kg/h de gélofusine.

Dans un deuxième temps, une laparotomie xipho-pubienne était réalisée. Les reins étaient abordés par voie rétro-péritonéale et une néphrectomie bilatérale était réalisée. L'aorte abdominale et la veine cave inférieure sous-rénales étaient disséquées en préparation du site de greffe. Une dose de 5 000UI d'héparine était injectée dans la voie veineuse centrale 10 minutes avant le clampage.

Deux anastomoses termino-latérales sur l'aorte et la veine cave inférieure juste au-dessus de la bifurcation iliaque étaient réalisées en utilisant du polypropylène 5/0. Le déclampage était effectué 30 minutes après le début des anastomoses afin d'homogénéiser le protocole. Une anastomose urétéro-urétérale était effectuée sur une sonde double J. Le greffon était positionné en retro-péritonéal et l'abdomen était alors refermé.

2.2.5. Suivi des animaux

Après transplantation, les animaux étaient surveillés pendant 7 jours dans une cage métabolique. Le protocole postopératoire comprenait une analgésie par nalbuphine (20mg/j IV pendant 3 jours), une antibioprophylaxie par amoxicilline-acide clavulanique (1g/j IV pendant 7 jours) et une prophylaxie contre l'ulcère de stress par pantoprazole (40mg/j IV pendant 5 jours). Les apports hydro-électrolytiques étaient réalisés en IV selon le protocole suivant :

- 500ml/j de chlorure de sodium 0,9% avant reprise de la diurèse ;
- Compensation volume à volume dès la reprise de la diurèse pendant 48 heures ;
- En cas de diurèse excessive (supérieure à 4L/j), apport supplémentaire de 2g/L de chlorure de potassium.

Une supplémentation diurétique par 125mg de furosémide était réalisée à J0. Elle était secondairement adaptée à la diurèse :

- Diurèse nulle : 250mg à J1, 300mg à J2 puis 350mg à J3 en maintenant cette dose jusqu'à reprise de la diurèse ;
- Diurèse inférieure à 1,5L/j : maintien de la dernière dose de furosémide ;
- Diurèse supérieure à 1,5 L/j : dernière dose de furosémide divisée par deux le jour suivant puis arrêt.

Les porcs pouvaient boire dès J2 et manger dès J3.

Au terme de ces 7 jours, le porc quittait sa cage métabolique pour rejoindre son box individuel où il avait un accès libre à l'eau et à la nourriture.

Le suivi des animaux était de 3 mois.

2.2.6. Collecte et analyse des échantillons

La diurèse était quantifiée quotidiennement la première semaine.

Des prélèvements sanguins étaient effectués à J-1, 60 minutes après reperfusion du rein greffé (R60) puis à J1, J3, J5, J7, J11, J14, J30 et J90 de la greffe. Le dosage de la créatinine sanguine était réalisé sur un automate (Modular, Roche Diagnostics, Meylan, France) au sein du service de biochimie du centre hospitalier universitaire de Poitiers. Les normes de référence sont des valeurs connues du laboratoire, déterminées à partir de travaux expérimentaux préalables réalisés sur l'élevage de porcs Large White et non publiés.

Des échantillons tissulaires étaient également prélevés à J7, J14 (biopsies à l'aiguille) et à J90, au moment du sacrifice. Les fragments de tissu rénal étaient fixés dans une solution de formol tamponné à 4%. Ils ont été inclus en paraffine. Les lames ont été colorées à l'hématoxyline-éosine-safran, permettant d'apprécier l'architecture globale du tissu. L'intensité des lésions était évaluée de façon semi-quantitative sur une échelle de 1 à 5 selon une méthode déjà validée au laboratoire :

- 1 - Absence de lésions ;
- 2 - Lésions intéressant moins de 25% de la surface examinée ;
- 3 - Lésions intéressant de 26 à 50% ;
- 4 - Lésions intéressant de 51 à 75% ;
- 5 - Lésions intéressant plus de 76%.

2.2.7. Analyses statistiques

Les différents échantillons ont été comparés à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis et du test de comparaison multiple de Dunn.

La significativité était retenue pour une valeur de p inférieure à 0,05.

2.2.8. Groupes étudiés

Le temps maximal autorisé par l'ABM pour chaque technique de reconditionnement a été étudié : 180 minutes pour le RIS (groupe RIS) et 240 minutes pour la CRN (groupe CRN 4h). Un temps intermédiaire de 120 minutes pour la CRN (groupe CRN 2h) et deux groupes contrôles ont également été réalisés :

- Un groupe sans reconditionnement (groupe IC30), où le rein greffé a subi 30 minutes d'ischémie chaude avant d'être conservé en MPH ;
- Un groupe contrôle masse néphronique (groupe NEP), où les animaux ont subi une néphrectomie et vivent donc sur un seul rein natif.

Chaque groupe était composé de 6 animaux (n=6).

2.3. Résultats

2.3.1. Paramètres de perfusion

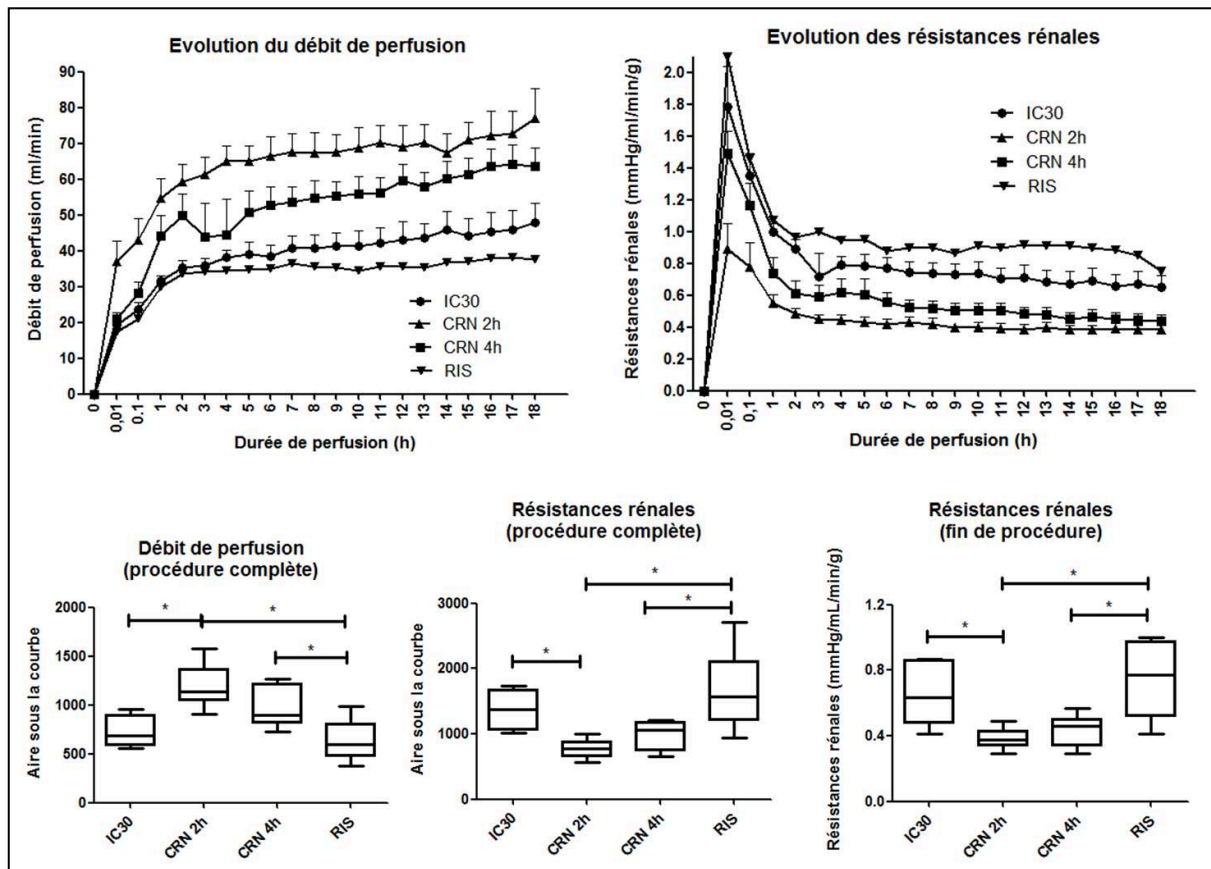


Figure 9 : Evolution des paramètres de perfusion rénale en fonction du temps.

Quelle que soit la technique de reconditionnement utilisée, on constate une augmentation rapide du débit de perfusion pendant les 2 heures suivant la mise en machine. Il existe par la suite un plateau jusqu'à la fin des 18 heures de conservation, avec néanmoins la persistance d'une discrète ascension pour les groupes CRN 2h et CRN 4h. De façon cohérente, les résistances diminuent rapidement au cours des 2 premières heures suivant la mise en machine avec une phase de plateau les 16 heures suivantes.

Concernant le débit et les résistances tout au long de la préservation en machine, il existe une meilleure perfusion statistiquement significative pour les groupes CRN 2h et CRN 4h par rapport au groupe RIS (**figure 9**).

2.3.2. Reprise de diurèse

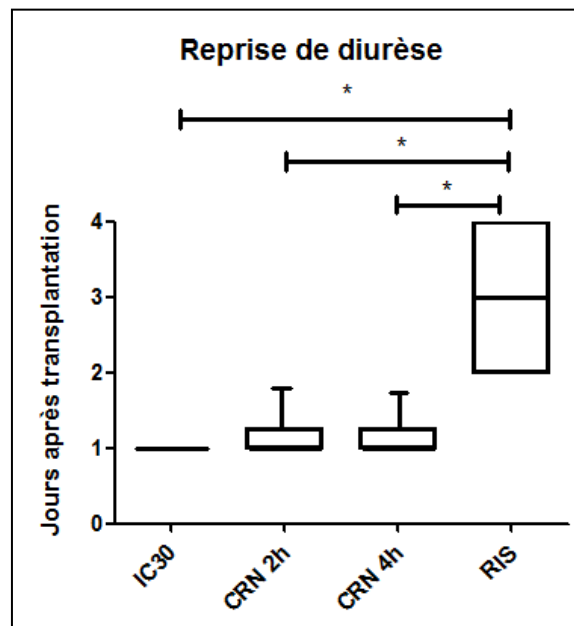


Figure 10 : Jour de reprise de diurèse après transplantation.

La reprise de diurèse s'effectue généralement à J1 pour les groupes CRN 2h et CRN 4h et à J3 pour le groupe RIS. Cette différence est statistiquement significative (**figure 10**).

2.3.3. Suivi de la fonction rénale jusqu'à 3 mois post-transplantation

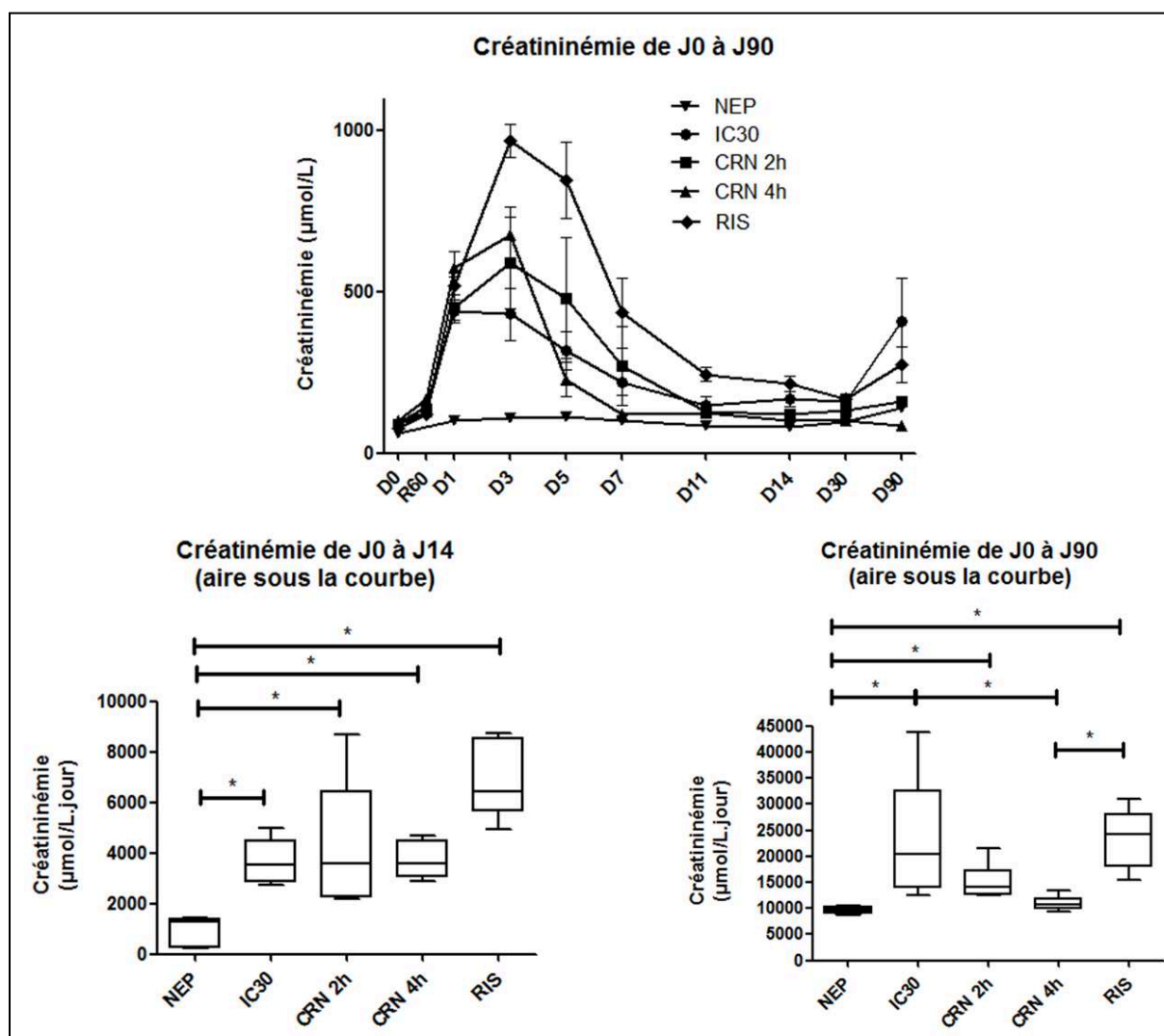


Figure 11 : Evolution de la fonction rénale pendant les 3 mois post-transplantation.

On observe globalement un pic de créatininémie à J3 post-transplantation puis une décroissance progressive jusqu'à J14. Entre J0 et J14, tous les groupes ont une créatininémie statistiquement plus élevée que le groupe contrôle NEP, sans différence significative entre eux.

Par la suite, la créatininémie reste stable entre J14 et J90 pour les groupes CRN 2h et CRN 4h. On constate par contre une ré-ascension de la créatininémie à J90 pour le groupe RIS. Entre J0 et J90, les groupes IC30, RIS et CRN 2h ont une différence significative avec le groupe

contrôle NEP. La créatininémie dans le groupe CRN 4h est statistiquement plus faible par rapport aux groupes IC30 et RIS. Il n'y a par contre pas de différence entre le groupe CRN 4h et le groupe contrôle NEP (**figure 11**).

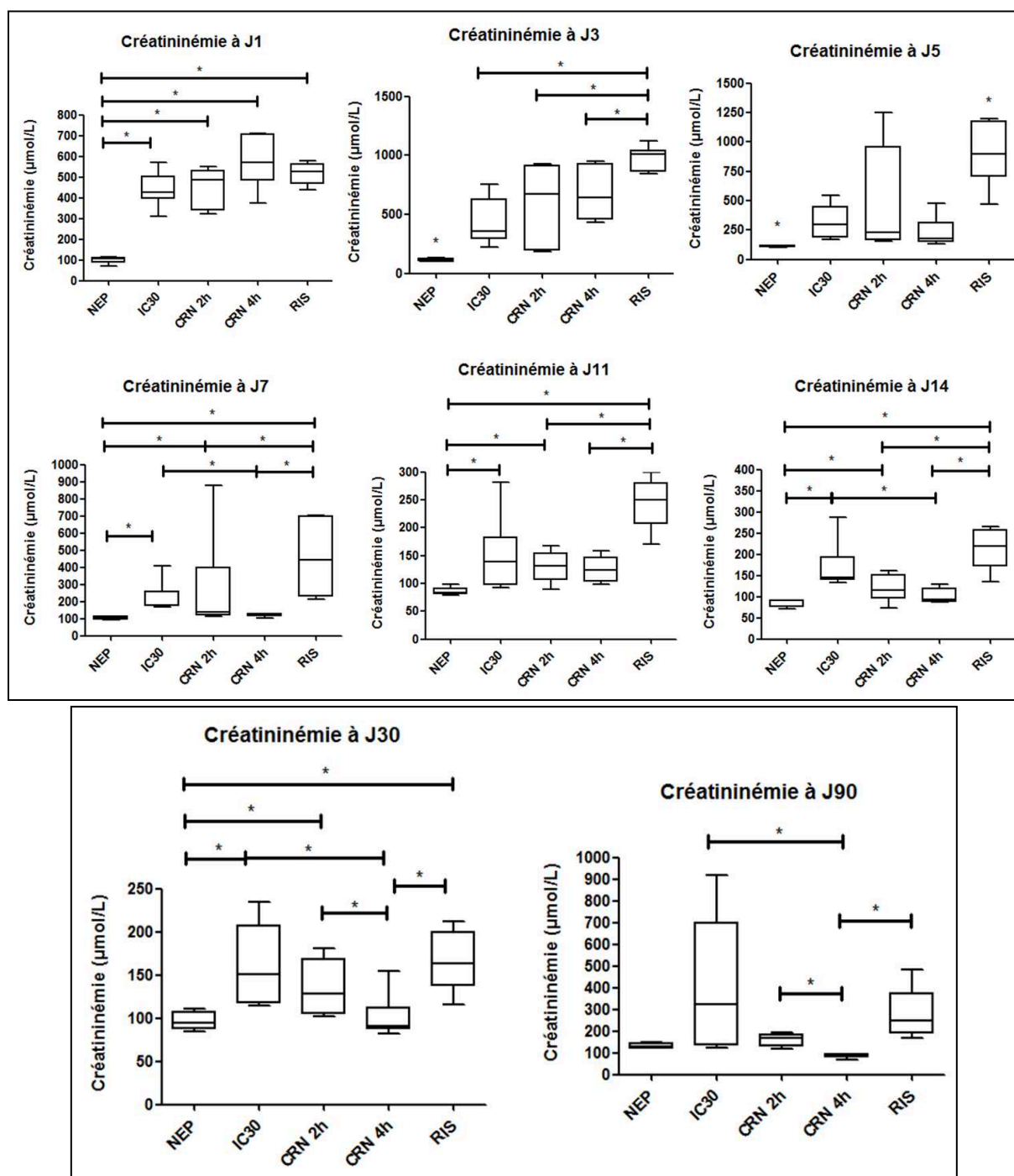


Figure 12 : Suivi de la fonction rénale détaillé par jour.

En détaillant la créatininémie par jour (**figure 12**), celle-ci est statistiquement plus faible pour les groupes CRN 2 h et CRN 4h par rapport au groupe RIS à J3, J7, J11 et J14. Cette différence n'est pas retrouvée à J1 et J5. A J30 et J90, la créatininémie du groupe CRN 4h est significativement plus faible que celle des groupes RIS et CRN 2h. Il n'y a plus de différence significative entre les groupes RIS et CRN 2h.

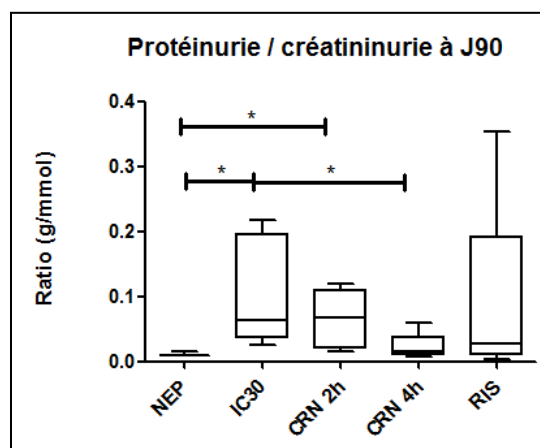


Figure 13 : Rapport protéinurie/créatininurie à 3 mois post-transplantation.

Il n'y a pas de différence entre les groupes CRN 2h, CRN 4h et RIS concernant l'analyse du rapport protéinurie/créatininurie à J90 (**figure13**).

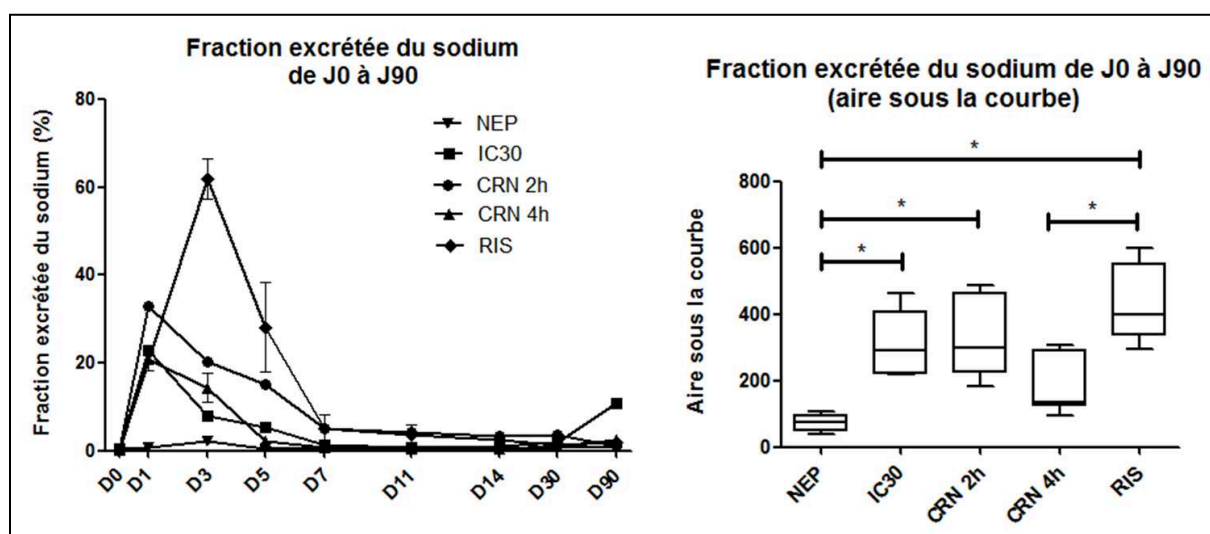


Figure 14 : Evolution de la fraction excrétée du sodium pendant les 3 mois post-transplantation.

L'étude de la fraction excrétée du sodium retrouve un pic à J1 pour les groupes CRN 2h et CRN 4h, et à J3 pour le groupe RIS (**figure 14**). Dans tous les cas, on observe par la suite une décroissance jusqu'à J7 puis un plateau de J7 à J90. Cette différence est significative en faveur du groupe CRN 4h par rapport au groupe RIS. Il n'y a pas de différence statistique entre les groupes CRN 2h et RIS.

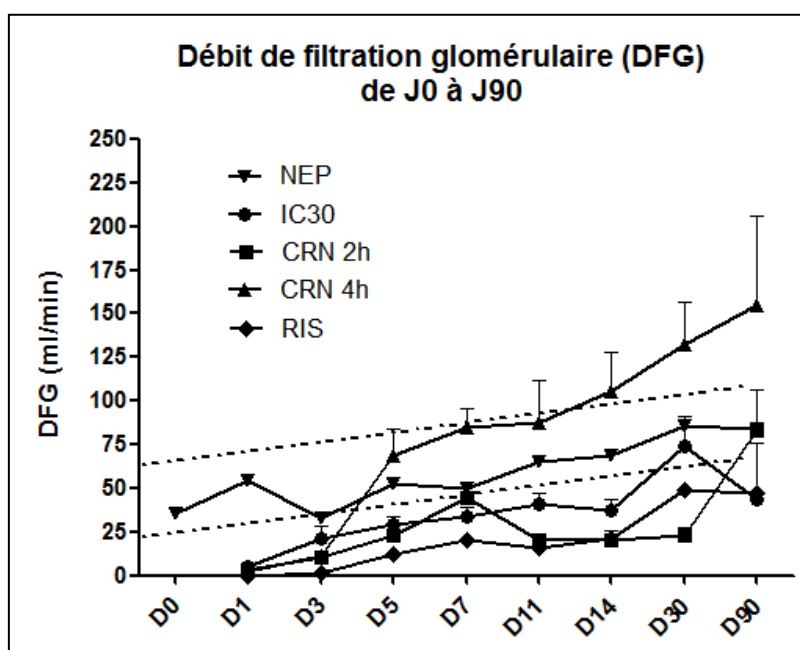


Figure 15 : Evolution du débit de filtration glomérulaire au cours des 3 mois post-transplantation.

Le suivi du débit de filtration glomérulaire montre que le groupe CRN 4h est dans la zone physiologique (définie par les pointillés) entre J5 et J14 et au-delà de cette zone de J14 à J90 (**figure 15**). Le groupe CRN 2h ne rejoint cette zone qu'à J90 alors que le groupe RIS ne l'atteint jamais.

2.3.4. Analyse histologique

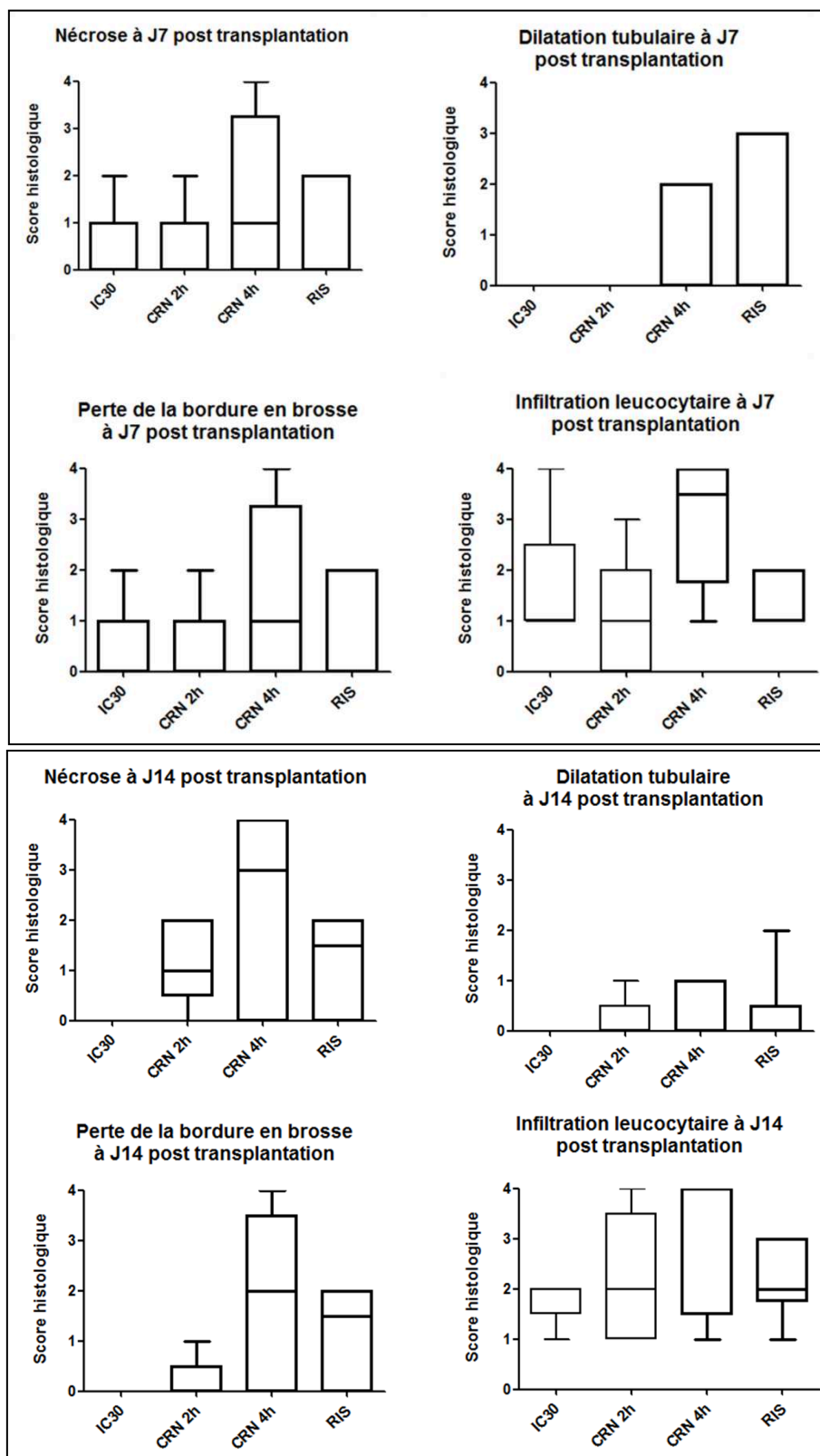


Figure 16 : Analyses histologiques à J7 et J14 post-transplantation.

On ne constate pas de différence significative entre les différents groupes sur l'analyse des biopsies à J7 et J14 concernant les scores de nécrose, de perte de la bordure en brosse, de dilatation tubulaire et d'infiltration leucocytaire (**figure 16**).

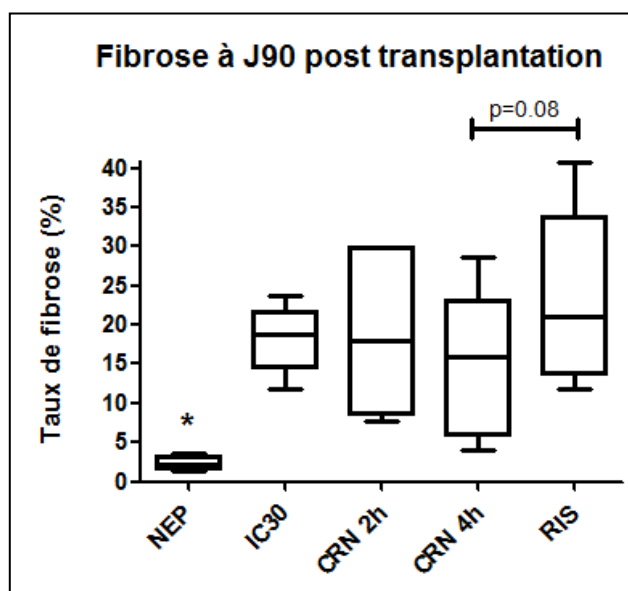


Figure 17 : Taux de fibrose rénale à 3 mois post-transplantation

A J90, le pourcentage de fibrose est statistiquement plus important pour tous les groupes par rapport au groupe contrôle NEP (**figure 17**). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes CRN 2h, CRN 4h et RIS.

2.3.5. Biomarqueurs [43]

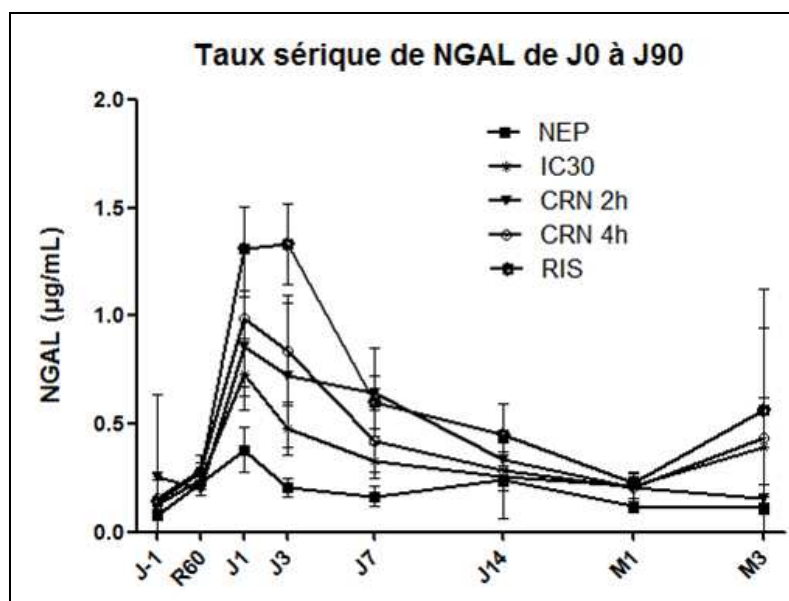


Figure 18 : Evolution du taux sérique de NGAL au cours des 3 mois post-transplantation.

Le dosage plasmatique de *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL), facteur de croissance et de différenciation notamment en réponse aux lésions rénales et au cours de la néphrogenèse, présente un pic plus important à J1 et J3 puis une ré-ascension à J90 (**figure 18**). Ces résultats ne sont pas significatifs.

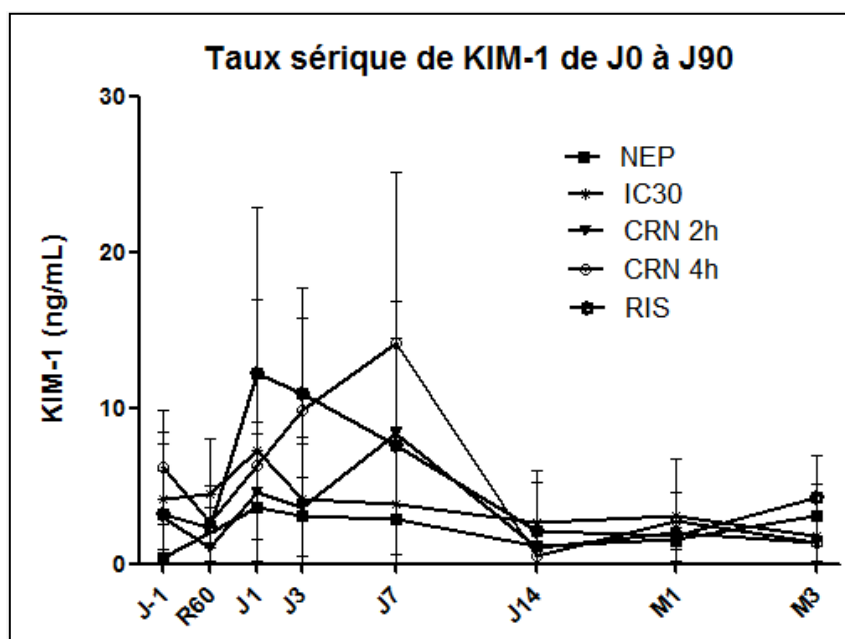


Figure 19 : Evolution du taux sérique de KIM-1 au cours des 3 mois post-transplantation.

Cette cinétique est superposable pour le dosage de *kidney injury molecule-1* (KIM-1) (**figure 19**), une glycoprotéine transmembranaire exprimée par les cellules épithéliales du tubule rénal proximal et dont l'expression est fortement augmentée en réponse à des atteintes notamment ischémiques.

2.4. Discussion

Si la préservation en machine de perfusion semble faire l'unanimité [76, 115, 118-124, 126-128, 164-166], les équipes de greffe ont le choix entre la CRN et le RIS pour reconditionner les reins avant prélèvement. En comparant ces différents modes de reconditionnement sur de petits échantillons, une équipe barcelonaise a observé une diminution significative des NFP et des RRF dans le groupe CRN (n=8) versus RIS (n=44) [22]. Les prélèvements de reins sur DDAC non contrôlés sont pratiqués en France depuis 2008. Depuis le travail de Valero en 2000, aucune étude clinique n'avait comparé ces deux méthodes de reconditionnement jusqu'en 2016. En effet, dans la plupart des études rapportant les résultats des greffes issus des DDAC, un seul mode de reconditionnement est utilisé, soit RIS [25-33, 167-171] soit CRN [34-37]. La durée de cette période de reconditionnement est rarement rapportée. Le type de reconditionnement n'est même d'ailleurs pas toujours précisé [172-173]. En 2016 et 2018, deux études françaises cliniques rétrospectives ont conforté les résultats de Valero avec des effectifs un peu plus importants dans le groupe CRN (n=19 et n=32) [23, 24].

Devant les enjeux importants en termes de santé publique, il nous a paru nécessaire de prouver le bénéfice de l'une ou l'autre technique. En effet, au-delà de leur impact sur le devenir du greffon, ces techniques sont coûteuses tant sur le plan financier (coût du circuit de CRN et des litres de solution de conservation de quatrième génération pour le RIS), que sur le plan humain (grande disponibilité des équipes de prélèvement qui doivent initier le reconditionnement des organes dans des délais très brefs).

Le modèle préclinique de RIS utilisé dans ce travail présente les mêmes limites que le modèle de CRN précédemment décrit (canulation des gros vaisseaux à la place des vaisseaux fémoraux, héparinisation et mise en place des canules avant l'arrêt cardiaque, *no flow* de 30 minutes sans période de *low flow*). Les mêmes biais sont donc retrouvés dans les deux groupes et les différences observées concernant les résultats obtenus ne sont dues qu'à la technique de reconditionnement. Ce modèle nous a également permis l'étude du groupe IC30, groupe ayant subi l'ischémie chaude mais sans reconditionnement. Bien entendu, ce groupe ne reflète pas une condition applicable en clinique car la période de reconditionnement des organes avant prélèvement est nécessaire sur le plan logistique (consultation du registre national des refus et recueil du témoignage des proches). Il présente surtout un intérêt dans l'analyse mécanistique et la compréhension des résultats.

Les données recueillies montrent que la reprise de fonction rénale est meilleure avec un reconditionnement par CRN. En effet, la reprise de diurèse survient dès le lendemain de la greffe pour les reins des groupes CRN 2h et CRN 4h alors que les reins du groupe RIS ne reprennent leur diurèse en moyenne qu'à partir du troisième jour postopératoire. La cinétique de reprise de fonction des greffons est un enjeu important en transplantation. Une reprise de fonction plus rapide est corrélée à une meilleure durée de survie des greffons [43-53]. De plus, un retour rapide à la diurèse réduit en clinique le nombre de séances de dialyse nécessaires en cas de RRF. Ces séances de dialyse représentent un surcoût financier et impactent la qualité de vie du patient.

En termes de retour à une fonction rénale d'ordre physiologique, les données sur la créatininémie montrent que le reconditionnement par CRN est également de meilleur pronostic. Le pic de créatininémie est plus élevé après reconditionnement par RIS et le retour à des valeurs physiologiques plus tardif. Les NFP ou RRF sont les principales manifestations des lésions d'IR dont les conséquences sont néfastes pour le devenir des greffons [63, 64].

La créatininémie est également le reflet des lésions histologiques tardives, pouvant aboutir à la perte du greffon à moyen ou long termes. Au sein du laboratoire, nous avons établi qu'une créatininémie supérieure à $110\mu\text{mol/L}$ chez ces animaux n'est plus physiologique et est corrélée à une perte de fonction rénale souvent associée à des lésions d'atrophie tubulaire et de fibrose interstitielle. Dans nos conditions expérimentales, l'aire sous la courbe des cinétiques d'évolution de la créatininémie au cours des 14 premiers jours post-transplantation ne retrouve pas de différence entre les différents groupes, à l'exception du groupe témoin. Ponctuellement, à J3, J7, J11 et J14, les résultats des groupes CRN 2h et CRN 4h sont significativement meilleurs que le groupe RIS. A J30 et J90, le groupe CRN 4h est statistiquement supérieur au groupes RIS mais aussi au groupe CRN 2h. Sur l'ensemble des 3 premiers mois suivant la greffe, il existe des résultats significativement meilleurs pour le groupe CRN 4h par rapport au groupe RIS et le groupe CRN 2h n'apparaît pas meilleur que le groupe RIS. Le suivi du débit de filtration glomérulaire conforte ces résultats avec un groupe CRN 4h plus rapidement et durablement dans les normes physiologiques.

Il n'y a pas, par contre, de traduction histologique de ces résultats. Même si le pourcentage de fibrose à J90 semble plus faible dans le groupe CRN 4h, il n'y a pas de différence significative ($p=0,08$).

Ces résultats mettent en avant l'intérêt du modèle porcin avec la possibilité d'un suivi prolongé jusqu'à 3 mois. Ce délai permet d'étudier le développement des lésions rénales après transplantation. La supériorité du groupe CRN 4h se dévoile progressivement par rapport au groupe RIS mais également du groupe CRN 2h, conférant un bénéfice significatif et durable de la CRN après 4 heures de reconditionnement et non pas dès 2 heures.

2.5. Conclusion

Dans nos conditions expérimentales, nous avons constaté une supériorité de la CRN par rapport au RIS dans le reconditionnement des greffons rénaux issus des DDAC, avec une

reprise plus précoce de la diurèse et un retour plus rapide et à des valeurs plus physiologiques de la créatininémie dans le groupe CRN 4h. On peut supposer que l'hypothermie, entraînant une mise au repos du métabolisme cellulaire, « fige » en quelque sorte les lésions induites par l'ischémie chaude, alors que la CRN permet d'initier une réparation précoce de ces lésions. Ces résultats laissent également supposer qu'en plus de la méthode de reconditionnement utilisée, la durée de ce reconditionnement semble avoir un impact sur le devenir des greffons.

3. Détermination du temps optimal de reconditionnement par CRN

Defining the optimal duration for normothermic regional perfusion in the kidney

donor: A porcine preclinical study.

Kerforne T, Allain G, Giraud S, Bon D, Ameteau V, Couturier P, Hebrard W,

Danion J, Goujon JM, Thuillier R, Hauet T, Barrou B, Jayle C.

Am J Transplant. 2018 Aug 9.

ORIGINAL ARTICLE

Defining the optimal duration for normothermic regional perfusion in the kidney donor: A porcine preclinical study

Thomas Kerforne^{1,2,3} | Geraldine Allain^{1,2,4} | Sebastien Giraud^{1,2,5} |
Delphine Bon^{1,2} | Virginie Ameteau^{1,2} | Pierre Couturier^{1,5,6} | William
Hebrard⁷ | Jerome Danion^{1,8} | Jean-Michel Goujon^{1,2,9} | Raphael Thuillier^{1,2,5} |
Thierry Hauet^{1,2,5,6,10} | Benoit Barrou^{1,11,12} | Christophe Jayle^{1,2,4,6}

¹INSERM U1082, (IRTOMIT), Poitiers, France

²Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Poitiers, Poitiers, France

³Anesthesia and Intensive Care Department, Poitiers Regional and Academic Teaching Hospital Center, Poitiers, France

⁴CardioVascular Surgery Division, Poitiers Regional and Academic Teaching Hospital Center, Poitiers, France

⁵Biochemistry Department, Poitiers Regional and Academic Teaching Hospital Center, Poitiers, France

⁶IBISA 'plate-forme MODélisation Préclinique - Innovations Chirurgicale et Technologique (MOPICT)', Domaine Expérimental du Magneraud, Surgères, France

⁷Unité expérimentale Génétique, Expérimentations et systèmes innovants (GENESI), INRA, Domaine Expérimental du Magneraud, Surgères, France

⁸Visceral Surgery Department, Poitiers Regional and Academic Teaching Hospital Center, Poitiers, France

⁹Pathology Department, Poitiers Regional and Academic Teaching Hospital Center, Poitiers, France

¹⁰FHU SUPORT 'SURvival oPTimization in ORgan Transplantation', Poitiers, France

¹¹Service d'Urologie et de transplantation rénale, AP-HP, GH Pitié-Salpêtrière, Paris, France

¹²Pierre and Marie Curie Paris VI University, Paris, France

Correspondence

Thierry Hauet, INSERM U1082, CHU de Poitiers, 2 rue de la Miletie, BP 577, 86021 Poitiers Cedex, France.
Email: thierry.hauet@gmail.com

Funding information

European Society for Organ Transplantation (ESOT); Fondation de l'Avenir; INSERM; Université de Poitiers; CHU Poitiers; Conseil Régional Poitou-Charentes; Société Francophone de Transplantation

Kidneys from donation after circulatory death (DCD) are highly sensitive to ischemia-reperfusion injury and thus require careful reconditioning, such as normothermic regional perfusion (NRP). However, the optimal NRP protocol remains to be characterized. NRP was modeled in a DCD porcine model (30 minutes of cardiac arrest) for 2, 4, or 6 hours compared to a control group (No-NRP); kidneys were machine-preserved and allotransplanted. NRP appeared to permit recovery from warm ischemia, possibly due to an increased expression of HIF1 α -dependent survival pathway. At 2 hours, blood levels of ischemic injury biomarkers increased: creatinine, lactate/pyruvate ratio, LDH, AST, NGAL, KIM-1, CD40 ligand, and soluble-tissue-factor. All these markers then decreased with time; however, AST, NGAL, and KIM-1 increased again at 6 hours. Hemoglobin and platelets decreased at 6 hours, after

Abbreviations: AST, aspartate aminotransferase; AUC, area under the curve; CD40L, CD40 ligand; DCD, donation after circulatory death; DGF, delayed graft function; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; EPO, erythropoietin; E-Selectin, endothelial-selectin; Glut-1, glucose transporter 1; Hb, hemoglobin; HCO₃⁻, bicarbonate; HIF-1 α , Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha; HMP, Hypothermic Machine Perfusion; HO-1, Heme Oxygenase-1; Ht, Hematocrit; ICAM-1, InterCellular Adhesion Molecule-1; iNOS, inducible Nitric Oxide Synthase; IRI, Ischemia-Reperfusion Injuries; KIM-1, Kidney Injury Molecule-1; KPS-1, Kidney Perfusion Solution-1; LDH, Lactate Dehydrogenase; MAP, Mean Arterial Pressure; MCP-1, Monocyte Chemoattractant Protein-1; NE, Norepinephrine; NGAL, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin; NMR spectroscopy, Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy; NO, Nitric Oxide; NRP, Normothermic Regional Perfusion; PaO₂, Arterial Blood Oxygen Partial Pressure; PAR, Protease-Activated Receptor-2; PFR, Pump Flow Rate; PNF, Primary Nonfunction; SaO₂, Arterial Oxygen Saturation; sTF, soluble Tissue-Factor; SvO₂, mixed Venous Oxygen Saturation; TNF- α , Tumor Necrosis Factor- α ; VCAM-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor; WI, Warm Ischemia; α -SMA, α -Smooth Muscle Actin.

T Kerforne, G Allain, and S Giraud have contributed equally to this work.

T Hauet, B Barrou, and C Jayle have contributed equally to this work.

which the procedure became difficult to maintain. Regarding inflammation, active tissue-factor, cleaved PAR-2 and MCP-1 increased by 4-6 hours, but not TNF- α and iNOS. Compared to No-NRP, NRP kidneys showed lower resistance during hypothermic machine perfusion (HMP), likely associated with pe-NRP eNOS activation. Kidneys transplanted after 4 and 6 hours of NRP showed better function and outcome, compared to No-NRP. In conclusion, our results confirm the mechanistic benefits of NRP and highlight 4 hours as its optimal duration, after which injury markers appear.

KEYWORDS

animal models, basic (laboratory) research/science, donors and donation: donation after circulatory death (DCD), extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), ischemia-reperfusion injury (IRI), kidney transplantation/nephrology

1 | INTRODUCTION

Growing organ shortages lead to an increased use of donors after circulatory death (DCD) organs.¹⁻⁴ These organs are more prone to ischemia-reperfusion injuries (IRIs), which have a negative impact on outcome. Warm ischemia (WI), added to cold preservation, is correlated with increased primary nonfunction (PNF) and delayed graft function (DGF) rates.^{5,6} Hence, these organs must be reconditioned. One of the available approaches is normothermic regional perfusion (NRP), with circulation limited to the abdomen.⁷⁻¹³ NRP is beneficial for organ reconditioning,^{4,7,14-16} in terms of donor pool expansion and graft function,¹⁷⁻²¹ and superior to cold in situ cooling⁷ and hypothermic cardiopulmonary bypass.¹⁰

Nevertheless, data are lacking to understand the mechanistic impact, mainly because of the variability of current procedures. Such knowledge on the potential benefits and the practical use of NRP is of paramount importance to both standardize clinical practices and facilitate application procedures. In European countries, NRP duration varies,^{18,22} from 2 hours in England,²³ to 4 hours in Spain and France,⁷ and 6 hours in Italy,²⁴ with no convincing evidence as to which is optimal. Consequently, a unified protocol for the procedure itself is not clearly established. In addition, determination of reconditioning mechanisms is mandatory to optimize NRP procedure. This variability prevents the clear demonstration and understanding of NRP benefits.

With this background, the main objectives of the present study were to understand the mechanisms underlying the benefits of NRP and to determine the optimal duration. To this end, we adapted a previously developed porcine preclinical model to mimic kidney transplantation from DCD donor reconditioned by NRP.²⁵ We explored the impact of NRP on renal injury markers and major IRI pathways such as hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α), inflammation, and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation. Kidney allotransplantation was performed to determine the impact of NRP duration on outcome. Our findings highlight that NRP significantly improves graft quality, but only if the procedure lasts at least 4 hours; however, injury markers reveal that NRP should not last 6 hours.

2 | METHODS

2.1 | Experimental model

Animal experiments were conducted at the MOPICT platform (Surgeres, France) in accordance with the Animal Research guidelines, the French Government, and the institutional Committee on the Ethics of Animal Experiments (France) (Committee accreditation number: C2EA-84, Protocol approval number: CE2012-11).

We used 3-month-old large white male pigs (40-45 kg), a pertinent preclinical model, as its anatomy and physiology are very close to that of humans.²⁶

2.1.1 | Surgical procedures

As described previously,²⁵ we used a Rotaflow Maquet centrifugal pump with Softline Coating Maquet-Jostra preheparinized closed circuit (Maquet Cardiopulmonary AG, Hirrlingen, Germany) with a hollow fiber membrane oxygenator (Quadrox-D Oxygenator; Maquet). This setup is different from cardiac surgery extracorporeal pumps (typically an open circuit with a reservoir), which is not used for NRP in the clinic. We made the decision to closely mimic the clinical situation.

The circuit was primed with 700-800 cc hydroxylethyl-starch (a volume expander) (Restorvol 6%; Fresenius Kabi, Sèvres, France). After laparotomy, the abdominal aorta and inferior vena cava caudal to the renal vessels were dissected, since femoral vessels are too small to receive cannulae of sufficient size to ensure the target flow rate. We choose an extraperitoneal approach to avoid lymphatic losses to limit vascular filling and hemodilution, as ascites formation is frequent in trans-peritoneal renal transplantation. unfractionated heparin (Sanofi-Aventis) bolus (300 UI/kg) was injected through the central venous catheter. During NRP, unfractionated heparin administration, recommended by the French Biomedicine Agency, was added continuously to limit the activation of coagulation on the extracorporeal pump plastic, to obtain an activated clotting time >200 seconds. After 5 minutes,

circulatory arrest was induced by injection of 2 g KCl through the central venous catheter, and mechanical ventilation was stopped. A 14Fr arterial cannula (Medtronic-Inc, Boulogne-Billancourt, France) was placed in the abdominal aorta under the renal arteries and a 21Fr long multiperforated venous cannula (Medtronic) was positioned at the junction of the inferior vena cava and the right auricle. The descending thoracic aorta was approached by a short left thoracotomy so as to be clamped. Another catheter was placed downstream of the clamp to monitor blood pressure. After 30 minutes of cardiac arrest, NRP was run. References on NRP settings (pump flow, fresh gas clearing, FiO_2) are poor and there are no comparative studies. Thus we relied on observational data of patient cohorts.^{22,23,27} FiO_2 was set at 55% and then adapted to target partial pressure of oxygen between 100 and 150 mmHg; in our hands FiO_2 varied between 45% and 55%. Pump flow rates (PFRs) are specified in Table 1 and were chosen at 2.6 L/minute, based on 50% of the theoretical flow rate of a pig weighing 40–45 kg. During the procedure, a MAP of 70 mmHg was reached through volume correction (0.9% saline and hydroxyethyl-starch, 10 mL/kg/h) and norepinephrine infusion. Oxygen fraction was adjusted to reach 100% saturation. Temperature was maintained at 37°C during the procedure.

2.1.2 | Experimental groups

Five experimental groups were designed: CTL group (healthy kidneys at T0 before WI), No-NRP group (end of WI), 2 h-NRP group (WI + 2 h-NRP), 4 h-NRP group (WI + 4 h-NRP), and 6 h-NRP group (WI + 6 h-NRP) ($n = 6$).

Blood samples were collected at T0 (CTL group), No-NRP (end of the WI, in the first minute of blood recirculation), 1 h-NRP, 2 h-NRP, 3 h-NRP, 4 h-NRP, and 6 h-NRP. We performed immediate hemodynamic evaluation, hemoglobin, and platelet quantification. Plasma was stored at -80°C for biochemistry, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy analysis, and protein quantification. After 2, 4, or 6 hours, the right kidney was collected for cortex sampling to perform mRNA, protein, and histology analyses (see Supplemental Material and Methods).

The left kidney was collected and preserved on a perfusion machine (LifePort, Organ-Recovery-System, Brussels, Belgium) for 18 hours at 4°C in Kidney Perfusion Solution-1 (KPS-1) under 35 mmHg perfusion pressure. Organ resistance (mmHg/mL/min/g) and flow rate in mL/min were measured throughout.

2.1.3 | Kidney transplantation

At the end of machine preservation, the left kidney was allotransplanted in a bilaterally nephrectomized recipient, littermate of the donor, and compatible on SLA 1 to 3,^{28,29} permitting graft survival with low-grade acute rejection and avoiding the use of immunosuppressive drugs and their inherent biases. Heterotopic allotransplantation was performed via a midline incision. End-to-side aorta and inferior vena cava anastomoses, were performed just above the iliac bifurcation. Ureteroneocystostomy was performed. Five

groups were studied: AlloTx No-NRP, AlloTx 2 h-NRP, AlloTx 4 h-NRP, and AlloTx 6 h-NRP (Figure 1), compared to the control uninephrectomized group (CTL) (right kidney removed to mimic reduced nephron mass) ($n = 6$). Follow-up was performed for 90 days (see Supplemental Material and Methods).

2.2 | Statistical analysis

Results are expressed either in Tukey boxplot or in mean $\pm$ standard deviation (SD). We performed Kruskal-Wallis multiple-comparison Dunn's test or repeated-measures Newman-Keuls multiple-comparison test using NCSS software and R; statistical significance was fixed at $P < .05$.

3 | RESULTS

3.1 | Hemoglobin, PaO_2 , and SvO_2 decreased at 6 hours NRP

PFR, MAP, and arterial blood oxygen saturation (SaO_2) were stable during the entire procedure. Partial pressure of oxygen (PaO_2) increased from 35 mmHg at No-NRP to 144 mmHg at 1 hour, and then decreased to 110 mmHg at 4 hours until 6 hours. Venous blood oxygen saturation (SvO_2) decreased from 78% at 1 hour to 62% at 6 h-NRP. Hemoglobin and hematocrit levels decreased from 9.9 g/dL and 25% respectively to 7 g/dL and 13% at 6 h-NRP (Table 1). Metabolic acidosis was observed in all animals at the beginning of the procedure, correlated with warm ischemia, and thereafter HCO_3^- levels increased rapidly as soon as 1 h-NRP and remained stable until the end of the procedure. Of interest HCO_3^- concentration did not strictly recover to normal levels (26.4 ± 3.4 mmol/L).

3.2 | HIF-1 α pathway response was activated by NRP

At No-NRP, renal cortex HIF-1 α protein tended to decrease compared to CTL; then it increased at 2 and 4 hours ($P < .05$ vs No-NRP, Figure 2A). At No-NRP, vascular endothelial growth factor (VEGF), erythropoietin (EPO), and Heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA renal cortex expression tended to decrease compared to CTL. At 2 and 4 hours, VEGF expression increased compared to No-NRP ($P < .05$) (Figure 2B). From 2 to 6 hours, EPO, HO-1, and glucose transporter 1 (Glut-1) mRNA levels increased compared to CTL or No-NRP ($P < .05$) (Figure 2C–E). However, EPO was not detected in the plasma at any time during the NRP procedure.

3.3 | Blood kidney injury markers and perfusion quality were regulated transiently by NRP

Plasmatic lactate/pyruvate ratio peaked at 1 and 2 hours ($P < .05$ vs CTL), decreased at 4 hours, and stabilized until 6 hours (Figure 3A). Plasma lactate dehydrogenase (LDH) increased at 1 h-NRP to peak at 2 hours ($P < .05$ vs CTL and No-NRP) and returned to physiologic

TABLE 1 Evolution of hemodynamic parameters during NRP

Time of NRP (h)	NRP-onset	1 h-NRP	2 h-NRP	3 h-NRP	4 h-NRP	6 h-NRP
PFR ⁶ , (L/min)	0.0 [0; 0]	2.4 [2.4; 2.5] ^{\$}	2.3 [2.3; 2.4] ^{\$}	2.3 [2.3; 2.4] ^{\$}	2.4 [2.4; 2.5] ^{\$}	2.3 [2.3; 2.4] ^{\$}
PFR ⁴ , (L/min)	0.0 [0; 0]	2.4 [2.4; 2.5] ^{\$}	2.4 [2.4; 2.5] ^{\$}	2.4 [2.4; 2.5] ^{\$}	2.4 [2.4; 2.5] ^{\$}	
PFR ² , (L/min)	0.0 [0; 0]	2.3 [2.3; 2.4] ^{\$}	2.4 [2.4; 2.5] ^{\$}			
MAP ⁶ , (mmHg)	0.0 [0; 0]	66 [66; 71] ^{\$}	73 [74; 76] ^{\$}	69 [69; 73] ^{\$}	64 [66; 70] ^{\$}	65 [66; 71] ^{\$}
MAP ⁴ , (mmHg)	0.0 [0; 0]	65 [73; 88] ^{\$}	71 [78; 90] ^{\$}	90 [82; 94] ^{\$}	78 [78; 82] ^{\$}	
MAP ² , (mmHg)	0.0 [0; 0]	67 [67; 86] ^{\$}	69 [69; 86] ^{\$}			
SaO ₂ ⁶ , (%)	50 [50; 56]	100 [100; 100] ^{\$}	100 [100; 100] ^{\$}	100 [100; 100] ^{\$}	100 [100; 100] ^{\$}	100 [100; 100] ^{\$}
SaO ₂ ⁴ , (%)	53 [53; 56]	100 [100; 100] ^{\$}	100 [100; 100] ^{\$}	100 [100; 100] ^{\$}	100 [100; 100] ^{\$}	
SaO ₂ ² , (%)	51 [50; 54]	100 [100; 100] ^{\$}	100 [100; 100] ^{\$}			
PaO ₂ ⁶ , (mmHg)	35 [35; 42]	144 [144; 165] ^{\$}	100 [100; 132] ^{\$}	110 [110; 121] ^{\$}	116 [116; 125] ^{\$}	110 [110; 136] ^{\$}
PaO ₂ ⁴ , (mmHg)	36 [35; 46]	101 [101; 106] ^{\$,£}	109 [109; 125] ^{\$}	113 [113; 127] ^{\$}	106 [106; 132] ^{\$}	
PaO ₂ ² , (mmHg)	34 [33; 44]	302 [302; 312] ^{\$}	126 [126; 209] ^{\$}			
SvO ₂ ⁶ , (%)	50 [50; 56]	78 [78; 81] ^{\$}	77 [77; 81] ^{\$}	74 [74; 82] ^{\$}	72 [72; 83] ^{\$}	62 [62; 69]
SvO ₂ ⁴ , (%)	53 [53; 56]	79 [79; 82] ^{\$}	76 [76; 83] ^{\$}	73 [73; 79] ^{\$}	73 [73; 85] ^{\$}	
SvO ₂ ² , (%)	51 [50; 54]	77 [77; 85] ^{\$}	73 [73; 77] ^{\$}			
Hb ⁶ , (g/dL)	11.1 [11.1; 11.2]	9.9 [9.9; 10.5]	9.2 [9.2; 9.9]	8.5 [8.5; 9.6]	8.7 [8.7; 9.6]	7 [7; 7.2] ^{\$}
Hb ⁴ , (g/dL)	10.2 [10.2; 10.2]	8.8 [8.8; 8.8]	8.5 [8.5; 8.8]	7.8 [7.8; 8.5]	7.8 [7.8; 8.6]	
Hb ² , (g/dL)	9 [9; 10.3]	8.8 [8.8; 9.2]	8.3 [8.3; 8.9]			
Hematocrit ⁶ , %	28 [25; 31]	25 [23; 25]	23 [22; 25]	22 [19; 23]	18 [14; 22]	13 [10; 14] ^{\$}
Hematocrit ⁴ , %	25 [24; 26]	23 [20; 25]	23 [21; 24]	20 [19; 21]	20 [19; 21]	
Hematocrit ² , %	20 [14; 22] [£]	22 [20; 22]	19 [18; 23]			
HCO ₃ ⁻⁶ , mmol/L	15.9 [15.9; 16.0]	20.0 [20.5; 21.4] ^{\$}	22.0 [22.0; 23.7] ^{\$}	22.7 [22.7; 23.1] ^{\$}	22.1 [22.1; 23.1] ^{\$}	23.4 [23.4; 24] ^{\$}
HCO ₃ ⁻⁴ , mmol/L	14.1 [14.1; 14.5]	19.8 [19.8; 20.75] ^{\$}	22.25 [22.3; 24.6] ^{\$}	22.1 [22.1; 24.3] ^{\$}	22.1 [22.1; 24.5] ^{\$}	
HCO ₃ ⁻² , mmol/L	15.4 [14.1; 18.8]	20.0 [20.0; 21.8] ^{\$}	20.1 [20.1; 20.7] ^{\$}			
Cumulative fluid infusion ⁶ , (mL)	0.0 [0; 0]	375 [375; 407] ^{\$}	750 [750; 813] ^{\$}	1125 [1125; 1218] ^{\$}	1500 [1500; 1625] ^{\$}	1875 [1875; 2030] ^{\$}
Cumulative fluid infusion ⁴ , (mL)	0.0 [0; 0]	406 [406; 438] ^{\$}	812 [812; 875] ^{\$}	1218 [1218; 1313] ^{\$}	1615 [1625; 1750] ^{\$}	
Cumulative fluid infusion ² , (mL)	0.0 [0; 0]	438 [438; 532] ^{\$}	875 [875; 1063] ^{\$}			
NE ⁶ , (µg/kg/min)	0.0 [0; 0]	0.5 [0.5; 0.6] ^{\$}	0.5 [0.5; 0.6] ^{\$}	0.3 [0.3; 0.9] ^{\$}	0.3 [0.3; 0.6] ^{\$}	0.5 [0.4; 0.9] ^{\$}
NE ⁴ , (µg/kg/min)	0.0 [0; 0]	0.5 [0.5; 1.0] ^{\$}	0.4 [0.4; 1.0] ^{\$}	0.5 [0.5; 1.0] ^{\$}	0.5 [0.5; 1.0] ^{\$}	
NE ² , (µg/kg/min)	0.0 [0; 0]	0.3 [0.3; 0.6] ^{\$}	0.4 [0.4; 0.9] ^{\$}			

NRP, normothermic regional perfusion; PFR, pump flow rate; MAP, mean arterial pressure; SaO₂, arterial saturation of oxygen; PaO₂, arterial blood partial pressure of oxygen; SvO₂, mixed venous oxygen saturation; Hb, hemoglobin; HCO₃⁻, bicarbonate; NE, norepinephrine. For each parameter: ⁶ = 6 h of NRP group; ⁴ = 4 h of NRP group; ² = 2 h of NRP group. Bicarbonate supplementation was not added during the procedure. Results are expressed as median + [lowest datum still within 1.5 interquartile range of the lower quartile; and the highest datum still within 1.5 interquartile range of the upper quartile]. Statistics: ^{\$}P < .05 vs time No-NRP; [£]P < .05 vs other group.

value at 6 hours (Figure 3B). Creatininemia increased at 1 hour (P < .05 vs CTL and vs No-NRP) and stayed stable until 6 hours (Figure 3C). Aspartate aminotransferase (AST) was high in the No-NRP group, decreased until 4 hours (P < .05 vs No-NRP), and

increased again at 6 hours (P < .05 vs 4 hours) (Figure 3D). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) peaked at 2 hours (P < .05 vs CTL and vs No-NRP), decreased until 4 hours, and here also increased at 6 hours (Figure 3E). Kidney injury molecule-1 (KIM-1)

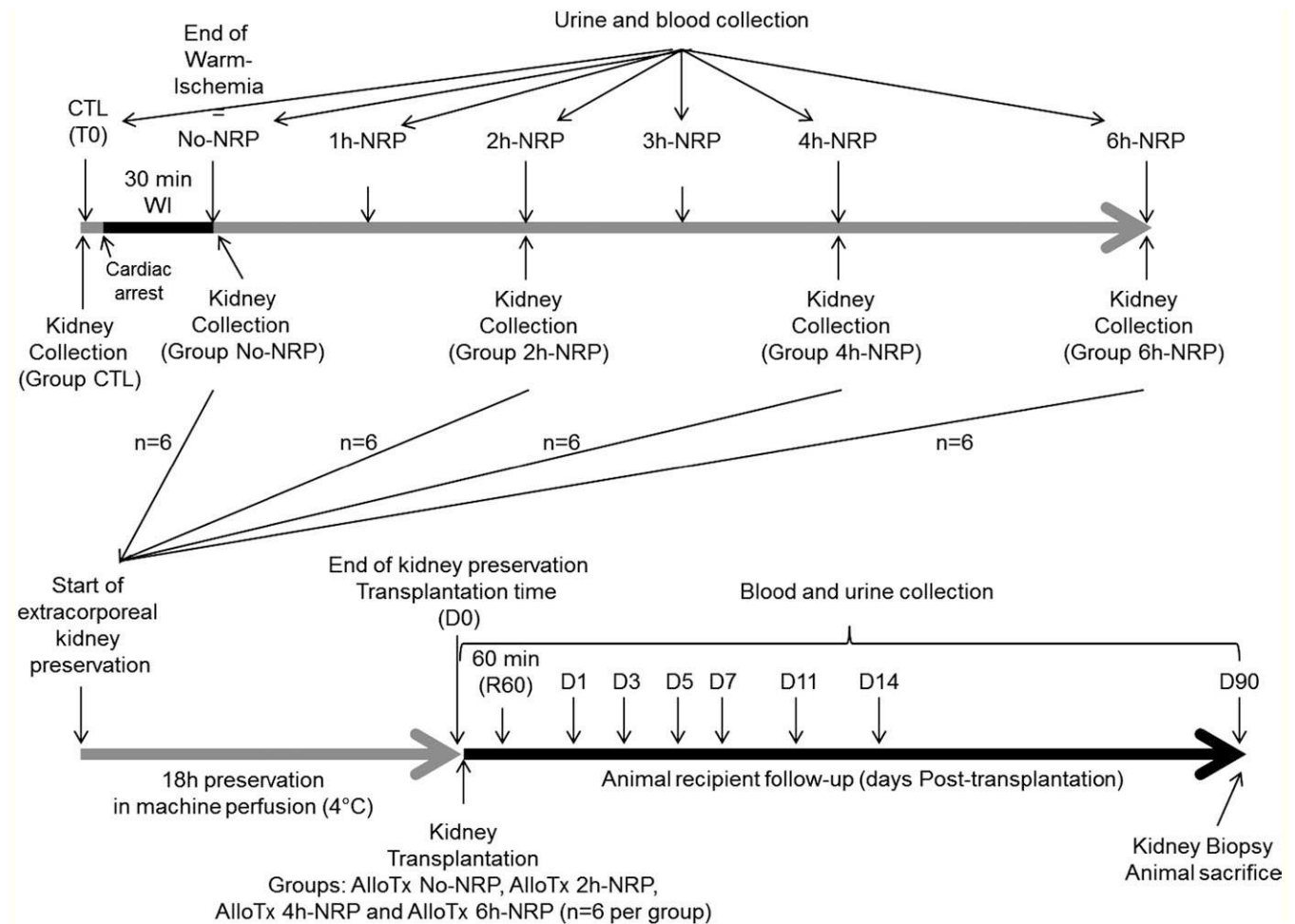


FIGURE 1 Experimental design of the study

peaked earlier (1 hours, $P < .05$ vs CTL and vs No-NRP), decreased until 4 hours, to finally increase at 6 hours (Figure 3F).

3.4 | Hemostasis parameters were regulated transiently by NRP

Platelet count decreased after 1 hour to approximately 200.000/mm³ and remained stable until 6 h-NRP (181.000/mm³, 0.7-fold from CTL) (Figure 4A). Concomitantly, plasma cluster of differentiation 40 ligand (CD40L) concentration increased during the first 2 hours, and decreased at basal levels at 4-6 hours (Figure 4B). Plasma soluble P-selectin was not detected. Plasmatic soluble tissue-factor (sTF) level increased at 1 hour, remained elevated until 4 hours ($P < .05$ vs CTL and No-NRP), and then decreased to baseline at 6 hours (Figure 4C). Regarding natural anticoagulation in the renal cortex, thrombomodulin protein levels decreased after WI, increased at 2 hours, and plateaued at 4 and 6 hours ($P < .05$ vs No-NRP, Figure 4D). Tissue-factor (TF) and protease-activated-receptor-2 (PAR-2), linking coagulation, and inflammation, were investigated. Renal cortex TF protein level increased between 4 and 6 hours ($P < .05$

vs CTL, Figure 4E), whereas active TF increased at 2 hours and remained high until the end ($P < .05$ vs CTL and No-NRP, Figure 4F). Activation of PAR-2 was observed at 6 hours ($P < .05$ vs CTL and vs No-NRP, Figure 4G).

3.5 | Induction of a pro-inflammatory milieu were controlled transiently by NRP

IL-6 mRNA levels increased after 2 hours then 4 hours ($P < .05$ vs CTL and No-NRP), then decreased to CTL level at 6 hours (Figure 5A). IL-1 β mRNA increased at 6 hours ($P < .05$ vs No-NRP) (Figure 5B). IL-8 mRNA increased at 2 hours and stayed stable until 6 hours ($P < .05$ vs CTL, Figure 5C). Plasma IL-8 was not detected. Of interest, the immunosuppressive cytokine IL-10 mRNA increased at 2 and 6 hours ($P < .05$ vs CTL or vs No-NRP, Figure 5D). Renal monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) increased at 4 hours and peaked at 6 hours ($P < .05$ vs CTL, vs No-NRP, and vs 2 h-NRP, Figure 5E). The pro-inflammatory tumor necrosis factor- α (TNF- α) and inducible nitric-oxide synthase (iNOS) proteins remained unchanged from 2 h to 6 h-NRP (Figure 5F-G). Renal MCP-1 expression was associated with macrophage infiltration at 6 hours ($P < .05$ vs No-NRP, 2 h and 4 h-NRP, Figure 6A).

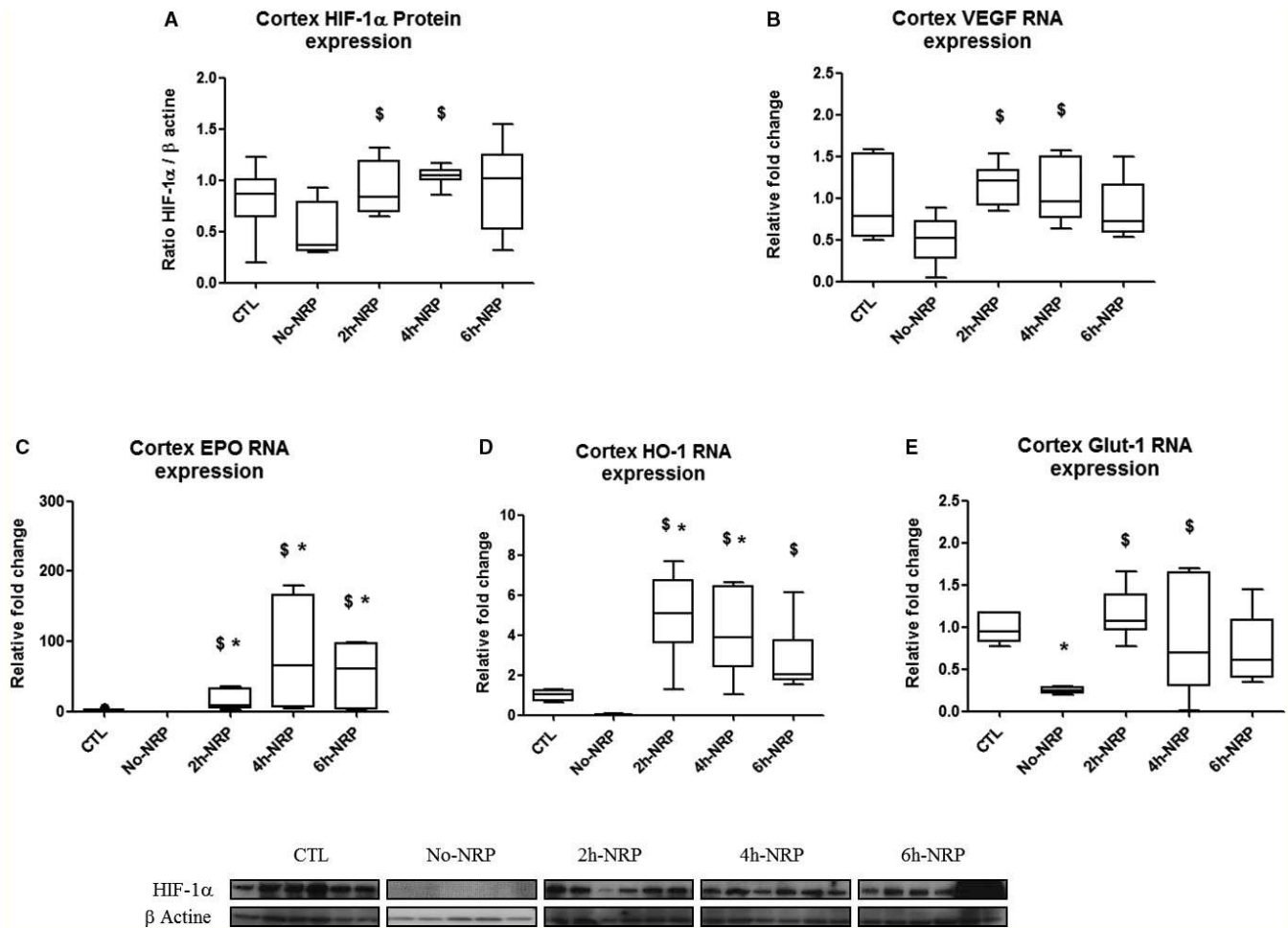


FIGURE 2 Reconditioning role of NRP after warm ischemia (WI). HIF-1 α protein expression detected by western blot (A), and VEGF (B), EPO (C), HO-1 (D), and Glut-1 (E) mRNA were investigated from renal tissue at control time (CTL) to No-NRP (end of WI), 2 h, 4 h, and 6 h of NRP. $n = 6$ measures per time (group), except for western blot at No-NRP, which is $n = 5$. Results are expressed as Tukey boxplot (median + lowest datum still within 1.5 interquartile range of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 interquartile range of the upper quartile); statistical analyses were performed with Kruskal-Wallis multiple-comparison Dunn's test; * $P < .05$: NRP time vs CTL, $^{\$}P < .05$: NRP time vs No-NRP, and $^{\text{E}}P < .05$: NRP differences between 2 h, 4 h and 6 h NRP

3.6 | Renal histology was not affected by NRP

Evaluation of kidney histologic lesions showed no differences on brush border loss, cell detachment, and tubular dilatation injuries compared to CTL (Figure 6B).

3.7 | Kidney perfusion was improved after NRP

For NRP kidneys, flow rates increased rapidly to 50-70 mL/min (Figure 7A) and renal resistance decreased rapidly to 0.5 mmHg/mL/min/g (Figure 7B). Area under the curve (AUC) analyses confirmed significant improvements for perfusion rate ($P < .05$, Figure 7C) and vascular resistance ($P < .05$, Figure 7D). End-of-perfusion renal resistance was approximately 0.40 mmHg/mL/min/g in NRP kidneys compared to 0.67 ± 0.2 in No-NRP kidneys ($P < .05$, Figure 7E).

This prompted investigation of the nitrite oxide (NO) pathway. Plasmatic NO production increased at 1 h-NRP ($P < .05$ vs No-NRP) and remained high at 2 h and 4 h-NRP and then decreased at

6 h-NRP (Figure 7F). NO level was likely due to eNOS activation, as phosphorylated eNOS/total eNOS ratio increased during the early part of NRP ($P < .05$) and then decreased at 6 hours ($P < .05$ to 2 h-NRP, Figure 7G).

3.8 | Early and late kidney functions were improved by 4 h to 6 h-NRP

All animals produced urine at day 1, except for 1 in the 2 hour group with recovery at day 2. We evaluated kidney function recovery though kidney GFR measurement. Although GFR remained far beneath baseline (dotted line) in the AlloTx No-NRP and AlloTx 2 h-NRP animals, both AlloTx 4 h-NRP and AlloTx 6 h-NRP animals reached baseline (D7 and D5 respectively, Figure 8A). Analysis of GFR AUC between D0 and D14 showed that AlloTx 4 h-NRP and AlloTx 6 h-NRP animals had significantly better function than animals transplanted with kidneys from AlloTx No-NRP and AlloTx 2 h-NRP groups (Figure 8B).

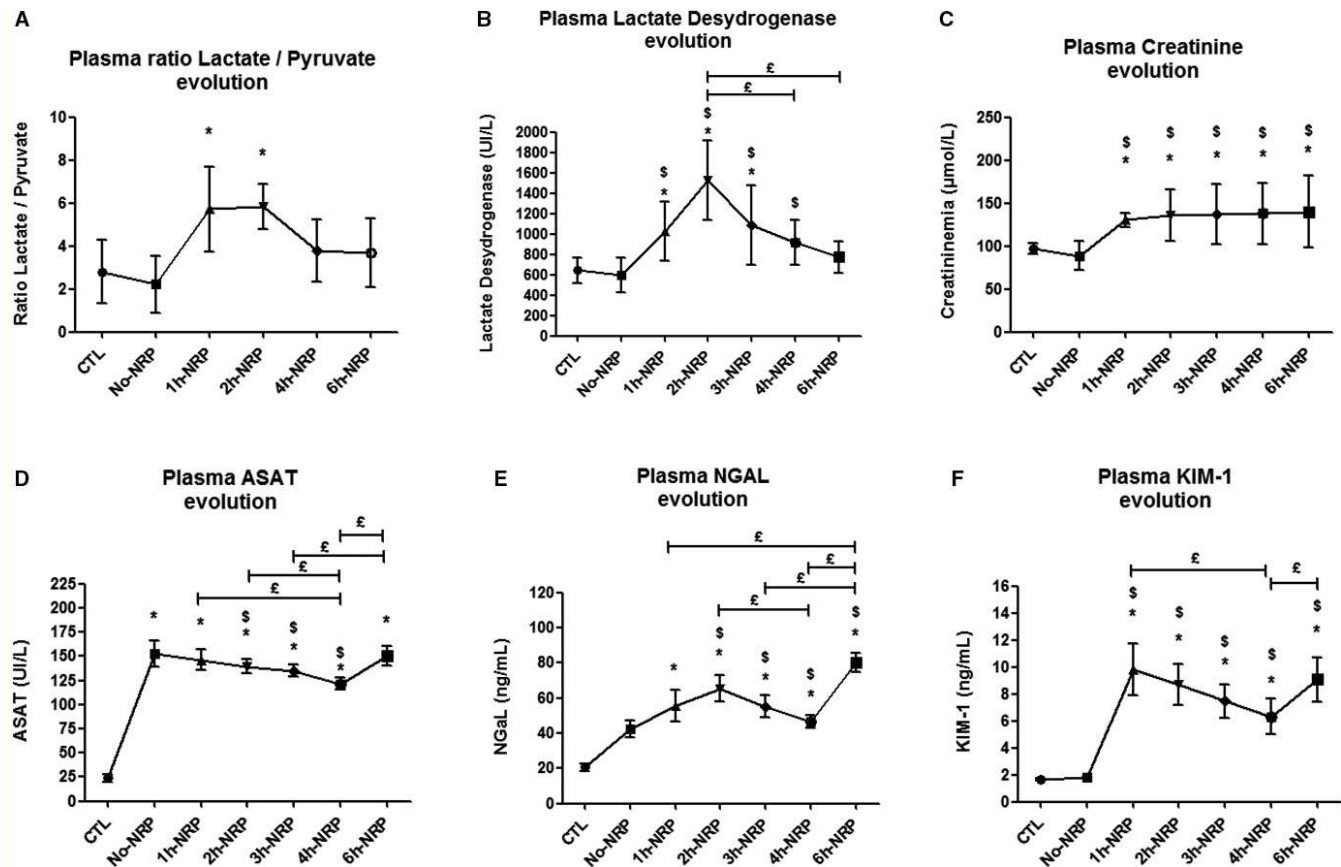


FIGURE 3 Effect of NRP on plasma biomarkers. Ratio of lactate/pyruvate (A), LDH (B), creatininemia (C), AST (D), NGAL (E), and KIM-1 (F) measurement in the plasma, investigated at control time (CTL) to No-NRP (end of WI), 2 h, 4 h, and 6 h of NRP. $n = 6$ measures per time (group). Results are expressed as mean $\pm$ SD; statistical analyses were performed with repeated-measure Newman-Keuls multiple-comparison test; * $P < .05$: NRP time vs CTL, $^{\$}P < .05$: NRP time vs No-NRP, and $^{\epsilon}P < .05$: NRP differences between 2 h, 4 h, and 6 h-NRP

This superiority was confirmed at D90, when AlloTx 4 h-NRP and AlloTx 6 h-NRP animals showed better GFR and reduced proteinuria/urinary creatinine ratio, compared to AlloTx No-NRP and AlloTx 2 h-NRP ($P < .05$, Figure 8C,D). Finally, the lowest level of α -smooth muscle actin (α SMA) and fibrosis was measured in AlloTx 4 h-NRP and AlloTx 6 h-NRP animals (Figure 8F-J).

4 | DISCUSSION

Clinical reports have demonstrated the benefits of NRP,^{4,18} but critical parameters such as optimal duration and the underlying mechanism remain to be clarified to properly optimize this procedure, justifying the objectives of the present study in a highly reproducible preclinical model mimicking clinical conditions.

During NRP, hemodynamic parameters (PFR, MAP) and SaO_2 remained stable; however, hemoglobin, PaO_2 , and SvO_2 decreased at 6 hours, probably due to hemodilution through fluid injection and hemolysis, typical side effects of extracorporeal circulation,^{30,31} and by the gradual expansion of peritoneal effusion.

HIF-1 α is an important pathway of IRI.³²⁻³⁴ NRP induced an HIF-1 α pathway response: while warm ischemia did not increase

HIF-1 α protein expression in renal tissue, NRP restored it at 2 hours. Moreover, NRP induced expression of EPO, HO-1, Glut-1, and VEGF, all targets of HIF-1 α . EPO upregulation is important for hypoxia adaptation,³⁵ improving renal function and structure in rats.³⁶ HO-1 expression attenuates IRI and improves survival in rat renal allografts.³⁷ In cadaveric and living donor kidneys, a positive correlation between renal function and HO-1 and VEGF levels was reported.³⁸

Lactate/pyruvate ratio and LDH levels increased from No-NRP to 2 hours NRP, likely due to the metabolism disturbances of WI,^{39,40} suggesting ischemic impairment.^{41,42} These markers returned to basal values between 4 and 6 hours NRP, suggesting a better balance in supply and demand in organ perfusion and an efficient adjustment of tissue oxygenation and adequate perfusion. Collectively, these markers are related to tissue hypoperfusion, but the observed return to normal values highlights the potential benefits of NRP in re-establishing sustained aerobic metabolism, supporting the reconditioning role of NRP through maintenance of oxygenated blood circulation and normothermia.

Nevertheless, WI also induced an increase of blood kidney injury markers creatinine, AST, NGAL, and KIM-1, biomarkers correlated to renal IRI.^{43,44} Creatinine was not discriminant between groups,

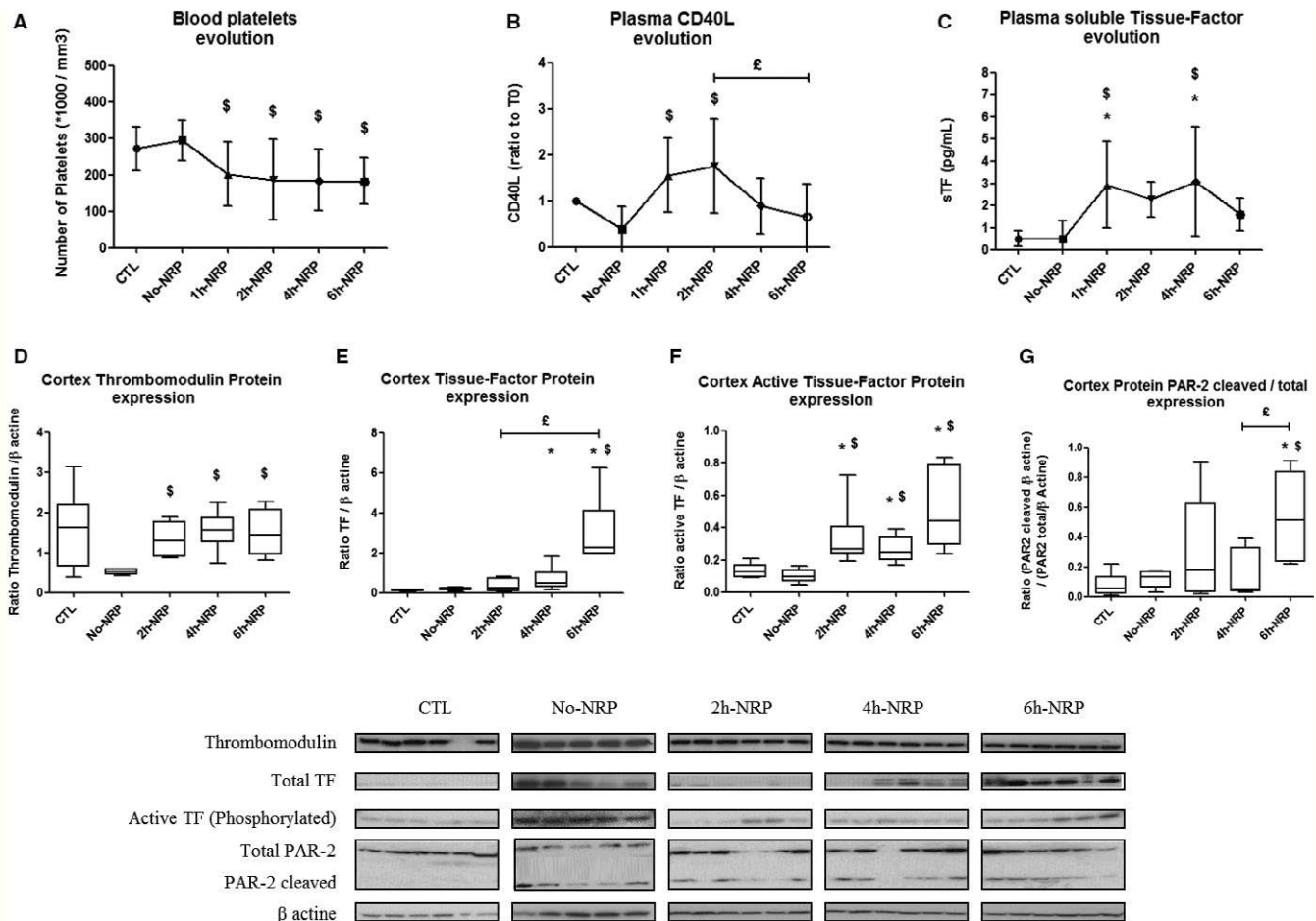


FIGURE 4 Impact of NRP on hemostasis instabilities after blood recirculation. Blood platelet quantification (A), plasma soluble CD40L (B), and plasma soluble tissue-factor (TF) (C), were investigated at control time TO (CTL) to No-NRP (end of WI), 2 h, 4 h, and 6 h of NRP. $n = 6$ measures per time (group). Results are expressed as mean $\pm$ SD. Thrombomodulin (D), TF (E), active TF (F), and ratio PAR-2 cleaved/Par-2 total (G) protein expression detected by western blot, were investigated from renal tissue at control time (CTL) to No-NRP (end of WI), 2 h, 4 h, and 6 h of NRP. $n = 6$ measures per time (group), except for western blot at No-NRP which is $n = 5$. Results are expressed as Tukey boxplot (median + lowest datum still within 1.5 interquartile range of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 interquartile range of the upper quartile). Statistical analyses were performed with repeated-measures Newman-Keuls multiple-comparison test (A,B,C) or Kruskal-Wallis multiple-comparison Dunn's test (D,E,F,G); * $P < .05$: NRP time vs CTL, \$ $P < .05$: NRP time vs No-NRP, and $^{\epsilon}P < .05$: NRP differences between 2 h, 4 h, and 6 h-NRP

underscoring the limits of this marker, whereas AST, NGAL, and KIM-1 concentrations decreased from 1 h-2 h to 4 h-NRP, suggesting a possible reconditioning effect of NRP; however, this may also be due to dilution through fluid supplementation. Of interest, these levels increased significantly at 6 h-NRP ($P < .05$ vs 4 h-NRP), suggesting that extending NRP beyond 4 hours could be negative, as de novo production of injury markers is recorded. Although this release could be due to hemolysis regarding AST and NGAL, the concomitant increase in KIM-1 supports the "de novo injury" hypothesis. This is in line with recent work highlighting the dangers of extended NRP.^{17,23}

We investigated inflammation, hemostasis, and coagulation perturbations, known to be related to WI injuries.⁴⁵ In theory, NRP recirculates blood containing WI-activated coagulation factors, which can induce platelet aggregation and activation,^{46,47} in conjunction with IR-dependent reactive oxygen species (ROS) production. Use of

unfractionated heparin in the circuit shifted our focus away from the intrinsic coagulation pathway. Although the platelet number was not influenced by WI, it was reduced at 1 h-NRP, likely due, in part, to consumption (aggregation and hemorrhagic suffusion), but remained within normal limits until the end of the procedure. Platelet activation marker CD40L was transiently increased during the first hours of NRP, a pattern paralleled by TF. CD40L is known to trigger soluble TF secretion by monocytes.⁴⁸ We also observed increased kidney cortex thrombomodulin expression at 2 h-NRP, likely due to the re-establishment of shear-stress after WI.⁴⁹ This is in line with studies reporting that ischemia downregulates endothelial thrombomodulin expression.⁵⁰ NRP could potentiate the kidney endothelial cells to counteract the pro-coagulative circulating milieu through thrombomodulin production.

Because coagulation initiates the generation of FVIIa and FXa PAR ligands⁵¹, we studied TF and PAR activation, crossroad of

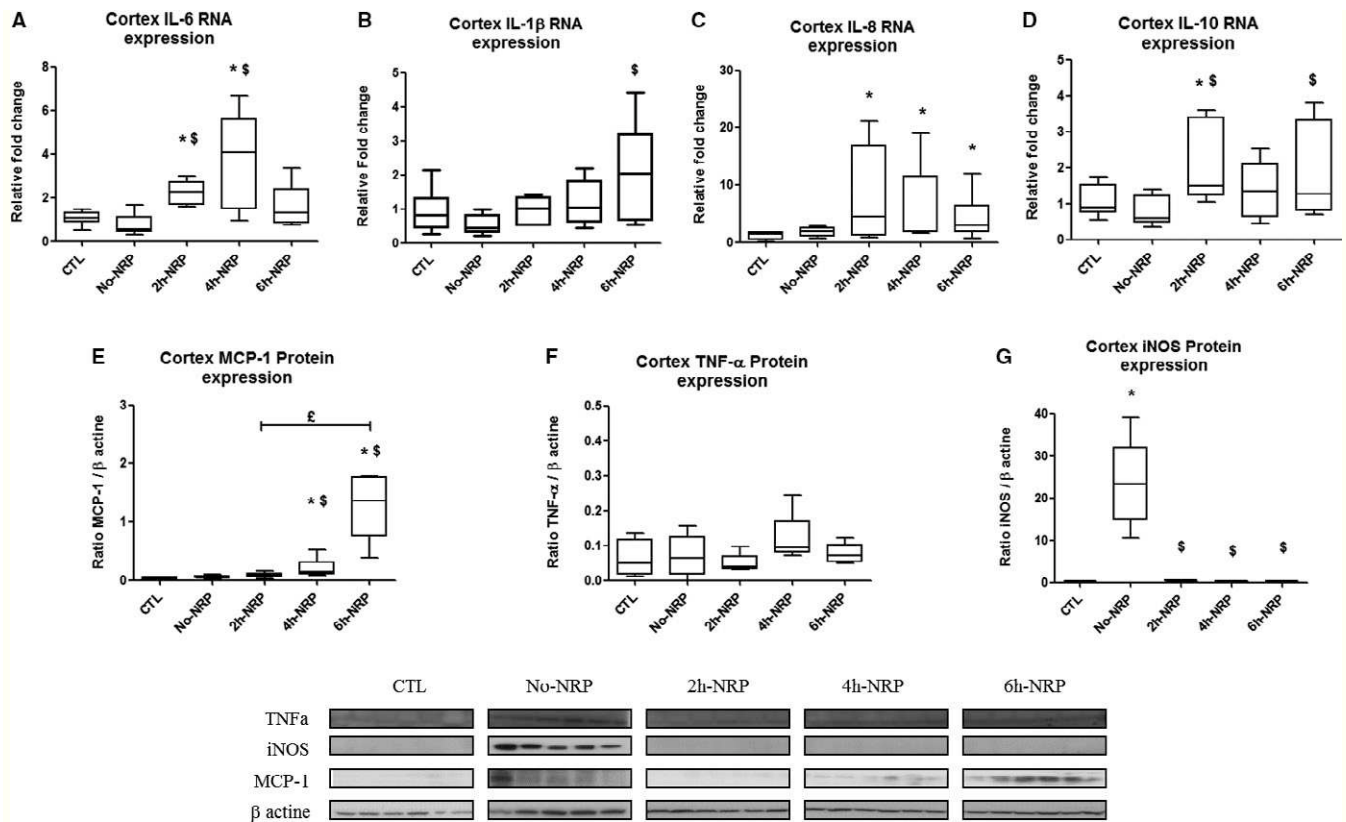


FIGURE 5 Consequences of NRP on inflammatory process. IL-6 (A), IL-1β (B), IL-8 (C), IL-10 (D) mRNA expressions obtained by RT-qPCR and MCP-1 (E), TNF-α (F), and iNOS (G) protein expression detected by western blot, were investigated from renal tissue at control time (CTL), at No-NRP (end of warm ischemia), 2 h, 4 h, and 6 h of NRP. $n = 6$ measures per time (group), except for western blot at No-NRP, which is $n = 5$. Results are expressed as Tukey boxplot (median + lowest datum still within 1.5 interquartile range of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 interquartile range of the upper quartile). Statistical analyses were performed with Kruskal-Wallis multiple-comparison Dunn's test; * $P < .05$: NRP time vs CTL, \$ $P < .05$: NRP time vs No-NRP, and £ $P < .05$: NRP differences between 2 h, 4 h, and 6 h-NRP

coagulation, and innate-immunity pathways.⁵² During NRP, there was an increase of PAR-2 mRNA at 2 h-NRP, followed by cleaved PAR-2 protein expression at 6 hours, in accordance with cortical total TF and active-TF levels. Because increase in active TF and cleaved PAR-2 induces cytokines/chemokines and adhesion molecule expression,⁵³ we investigated MCP-1, IL-1β, IL-6, and IL-8, involved in the pathogenesis of transplant rejection in multiple settings.^{54,55} In our hands, IL-6 and IL-8 mRNA expression was induced in the first 2 hours of NRP, but IL-1β mRNA and MCP-1 protein expression was increased at 4–6 hours, suggesting that 6 hours is not to be exceeded for NRP. However, this slight pro-inflammatory phenomenon could be limited by the transient expression of immunosuppressive IL-10, but variations of this interleukin remained limited. The link between the above cytokines, endothelial activation, and immune cell invasion⁵⁵ was investigated. We observed no E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 protein change during NRP (Figure S1). However, associated with MCP-1 expression, we observed significant macrophage infiltration in the renal cortex at 6 hours, suggesting again that 6 hours is an extreme limit for NRP.

In terms of HMP parameters, NRP kidneys showed significant decreases of organ resistance throughout the whole process of perfusion,

without difference between NRP groups. This suggests that NRP is a beneficial reconditioning allowing improved kidney perfusion. One of the potential mechanism could be early increase of circulating NO from the first hour of NRP, resulting in a significant increase of phosphorylated eNOS. Indeed, eNOS activity is an important factor for organ preservation and conditioning,^{56–58} and our team demonstrated its involvement in HMP benefits.⁵⁹ Thus NRP could improve NO-mediated protection, which could also be potentiated by HMP.^{59,60}

To evaluate the impact of observed effects and to validate the protective effect of NRP, we allotransplanted the kidneys previously submitted to No, 2 h, 4 h, or 6 h of NRP. Results showed that NRP reconditioning of DCD kidneys was not deleterious, but actually provided tangible functional recovery benefits. GFR showed more efficient early renal function recovery in the AlloTx 4 h-NRP group compared to AlloTx No-NRP and AlloTx 2 h-NRP animals, suggesting that 4 h of NRP could be the optimal window. Late outcome showed that kidneys from 4 h–6 h NRP groups have better function (GFR). Finally, kidneys from the AlloTx 4 h-NRP and AlloTx 6 h-NRP groups showed the lowest α-SMA staining and fibrosis deposition associated with better GFR and reduced proteinuria/urinary creatinine ratio.

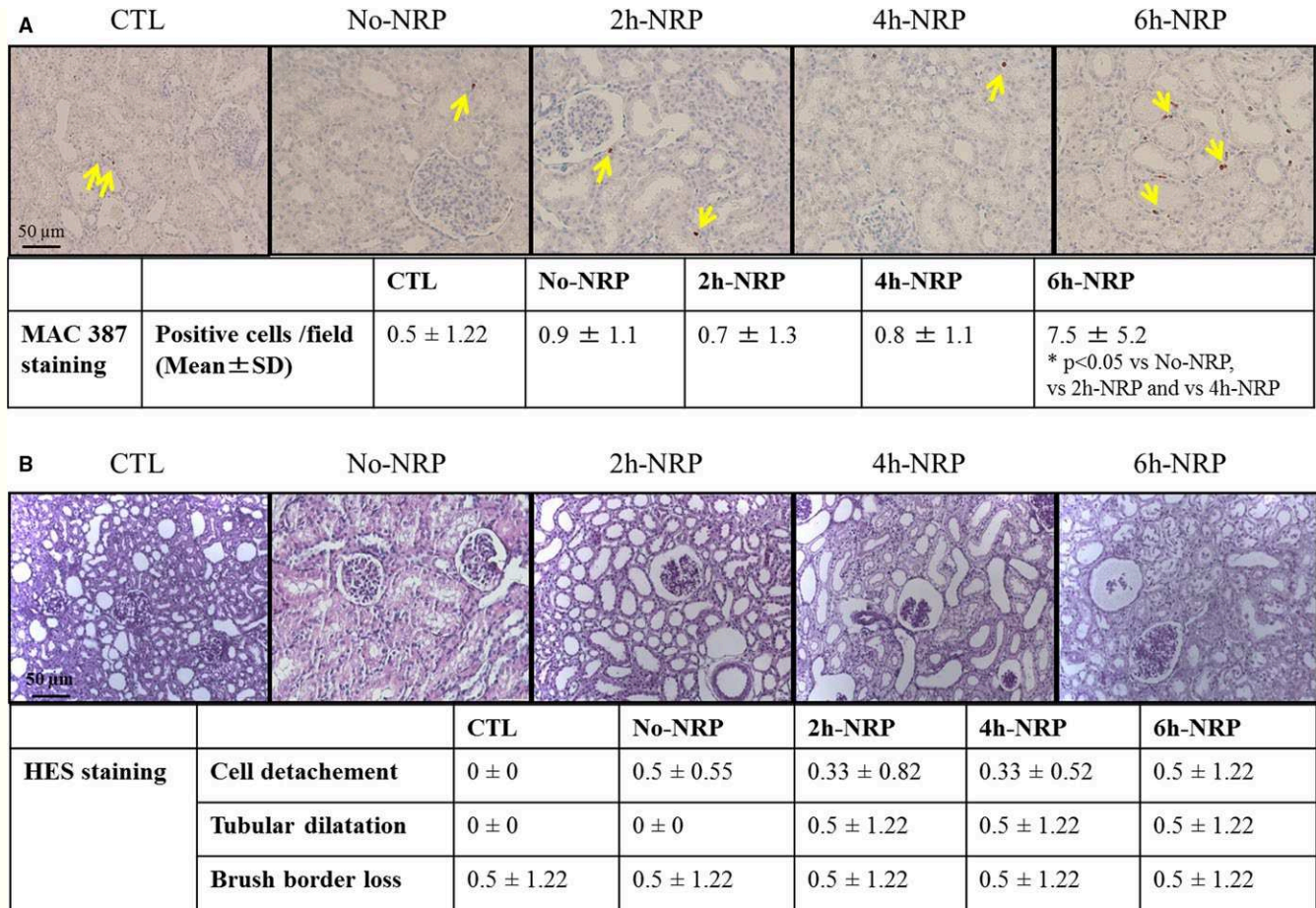
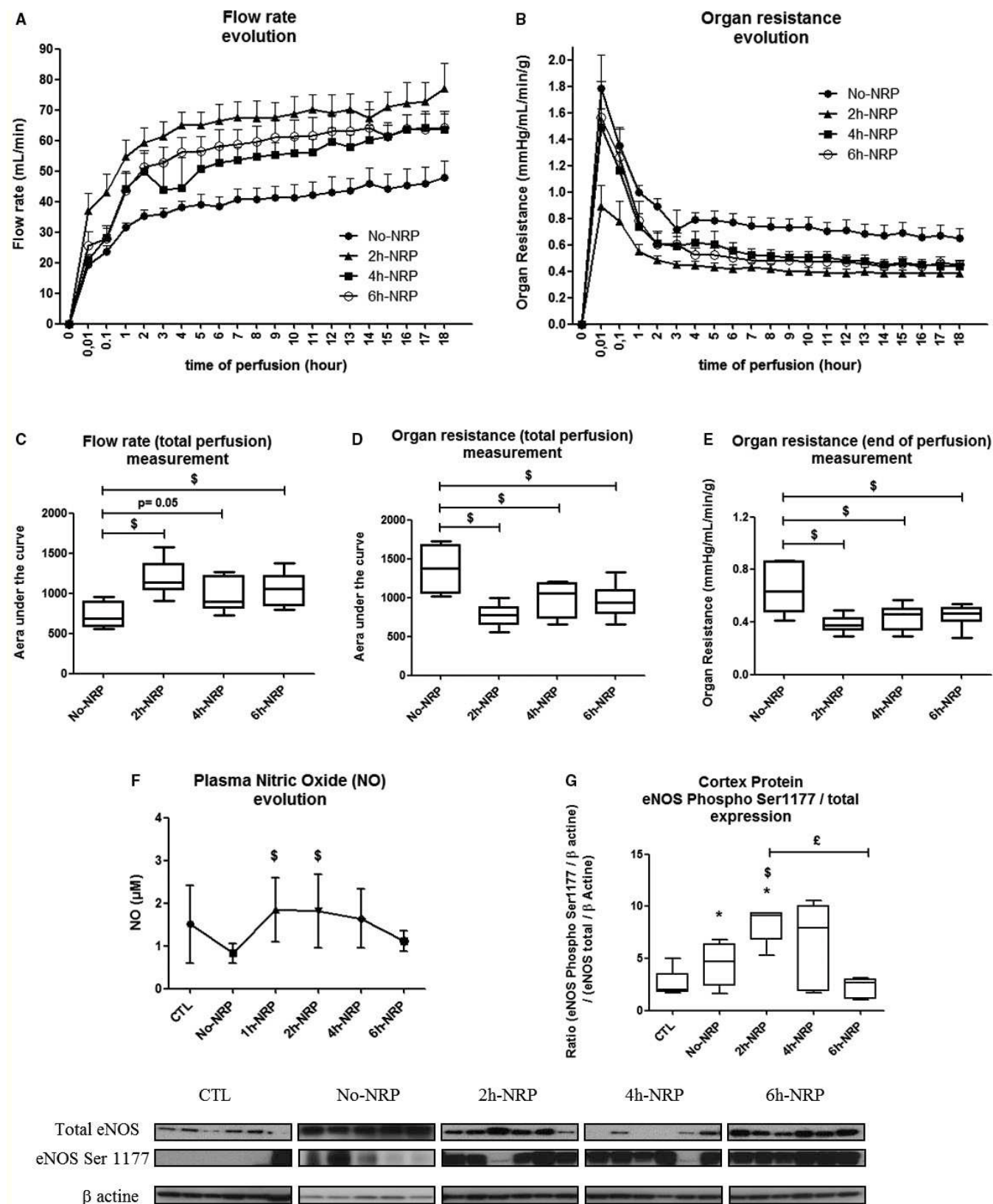


FIGURE 6 Consequences of NRP on histologic integrity and macrophage infiltration. Quantification of number of macrophage cells infiltrated (antibody anti-MAC-387 protein) by immunohistochemistry (A). Yellow arrows indicate macrophages. Results are expressed in mean ± SD of number of macrophage cells infiltrated by field. Evaluation of histologic lesions (cell detachment, tubular dilatation, and brush border loss) (B), the degree of histologic lesions was determined in the cortex by using a semi-quantitative grading of the percentages of lesions by field: scores: 0 = no alteration, 1 = lesions <25%, 2 = lesions between 25%-50%, 3 = lesions between 50%-100%. Evaluations were investigated on renal tissue at control time (CTL), No-NRP, and at 2 h, 4 h, and 6 h of NRP (magnification ×200). n = 6 measures per time (group). Statistical analysis were performed with Kruskal-Wallis multiple-comparison Dunn's test, *P < .05

Overall, our results support that the most effective time for NRP is 4 hours, with the best balance between injury markers and recovery pathway activation. The increase in several pejorative markers at 6 hours warns against extending the procedure to this point. Indeed, although animals transplanted with 6 h-NRP-kidneys had positive outcome, the appearance of lesion markers (NGAL, AST, KIM-1) and macrophage invasion signals during NRP suggests that a threshold has been reached and that a shorter NRP duration is preferable. In

addition, in our model, maintaining the hemodynamic parameters became difficult over 6 hours. In two additional animals, we attempted to extend NRP duration to 420 minutes and we observed that it rapidly became impossible to maintain pump flow objectives, and that hemoglobin concentrations became insufficient to ensure oxygen transport (4 and 5.8 g/dL respectively, SvO₂ at 45% and 49%, SaO₂ at 96% and 100%). In this light, we did not feel it was ethical to repeat the attempt.

FIGURE 7 Consequences of NRP on preservation perfusion parameters. Kinetic of flow rate (A) and organ resistance (B) measurements on kidneys preserved during perfusion machine after No-NRP, and 2 h, 4 h, or 6 h NRP (n = 6 per group); results are expressed in mean ± SEM. Area under the curve representation of flow rate (C) and organ resistance (D) from the start to end of perfusion (n = 6 per group). Organ resistance in mmHg/mL/min/g measured at the end of kidney perfusion (E). Plasma NO (µ mol/L, in mean ± SD) (F) was investigated at control time (CTL) to No-NRP (end of WI), 2 h, 4 h, and 6 h of NRP (n = 6 measures per time). Ratio of protein eNOS phosphorylated serine 1177 to eNOS total protein (G) was investigated from renal tissue at control time (CTL) to No-NRP (end of WI), 2 h, 4 h, and 6 h of NRP (n = 6 measures per time). Results (C), (D), (E), and (G) are expressed as Tukey boxplot (median + lowest datum still within 1.5 interquartile range of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 interquartile range of the upper quartile). Statistical analyses were performed with Kruskal-Wallis multiple-comparison Dunn's test (C,D,E,G) or repeated-measures Newman-Keuls multiple-comparison test (F); *P < .05: NRP time vs CTL, ^{\$}P < .05: NRP time vs No-NRP, and [£]P < .05: NRP differences between 2 h, 4 h, and 6 h-NRP



Although results reveal important information on NRP, our experimental setting has some limits that must be considered: (1) our model does not strictly reproduce the DCD clinical situations, which include CPR or hypoperfusion, hypotension, and the

compensatory effects of hypercapnia, models that are currently being developed in our lab. Moreover, injection of potassium could introduce a bias; however, kalemia during NRP (6.6 ± 0.5 mmol/L) was close to that of patients after shorter periods of circulatory

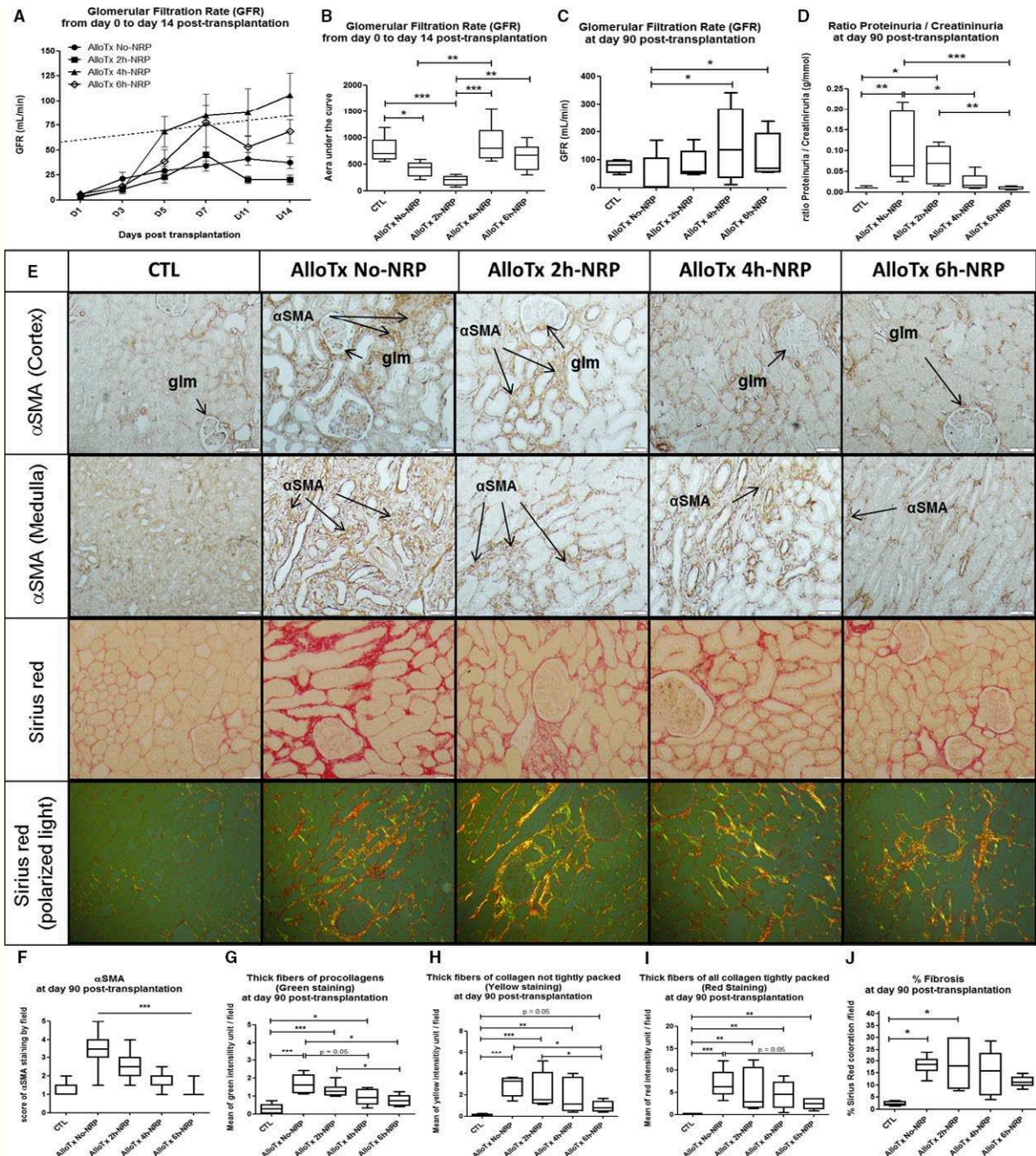


FIGURE 8 NRP effect on kidney function after kidney allotransplantation. A-D, Renal function and fibrosis evaluation after allotransplantation of kidneys submitted to WI followed by No-NRP, or 2 h, 4 h, or 6 h-NRP followed by 18 h ex vivo cold perfusion; groups AlloTx No-NRP, AlloTx 2 h-NRP, AlloTx 4 h-NRP, and AlloTx 6 h-NRP vs control CTL group (also represented in dotted line) ($n = 5-6$ per group). Kinetic of kidney GFR (in mL/min) levels from Day 0 (D0) to D14 after kidney allotransplantation (A). Area under the curve representation of GFR from D0 to D14 (B). Values at D90 after kidney allotransplantation of GFR (C) and ratio proteinuria/urinary creatinine (D). Representative images for each group showing staining of α SMA in cortex and medulla tissue, and Sirius red staining in normal or polarized light, on renal tissue at D90 after transplantation (E). At D90 after kidney allotransplantation, on renal tissue, quantification of histologic evaluation of α SMA (score of α SMA staining by field; 1: <10% α SMA staining, score 2: 11%-25%, score 3: 26%-50%, score 4: 51%-75%, and score 5: >76%) (F), evaluation of collagen fiber type on interstitial fibrosis evaluated by Sirius red on polarized light (G, H, I: procollagen, and not tightly or tightly collagen fibers) and on normal light (J). (A) is expressed as mean $\pm$ SD. (B) to (D) and (F) to (J) are expressed as Tukey boxplot (median + lowest datum still within 1.5 interquartile range of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 interquartile range of the upper quartile). Statistical analyses were performed with Kruskal-Wallis multiple-comparison Dunn's test; * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$

arrest.⁶¹ Furthermore, we used norepinephrine and vascular filling to maintain MAP; this is different from patient care; however,

the aim of this study was first and foremost the impact of NRP duration. Hence, we obtained a repeatable model that allowed for

strict control of parameters, allowing us to select NRP duration as the only modulated variable; (2) we did not study the impact of NRP on organs other than the kidney, such as the liver. Although highly relevant in transplantation, liver and heart need to be considered in further studies, considering the amount of experiments required to properly evaluate kidney impact herein; (3) finally, we did not study the effects of NRP length on regeneration biomarkers in the kidney posttransplant: this would have required euthanasia of many animals posttransplant, which could not be ethically justified at this phase of the project.

Previous studies highlighted the reconditioning or preconditioning effects of NRP, but further evidence on the benefits of this technology is eagerly awaited.⁶² To our knowledge, our study is the first to identify the different pathways underlying these benefits and their kinetics at times consistent with the clinic. Our model could also be interesting to establish a proper comparison between the current investigations for preservation improvement such as normothermic preservation, either at the end of the preservation or for the whole duration, or slow rewarming.^{63,64} Such preclinical evaluation could establish their true benefits and uncover their potential additivity.

Although our results show that current NRP protocols should not be extended much beyond 4 hours, improvement of the procedure is likely possible; possible avenues of research include the use whole blood transfusion or leukocyte-free preparation (using leukocyte filter), addition of metabolic precursors, oxygen carrier, or cytoprotective substrates.^{33,65-68} Other biotechnology approaches, for example, specific miRNA or cell therapy, could also improve NRP. Such approaches need further evaluation using relevant preclinical models.

In conclusion, our study lays the groundwork for understanding and optimizing NRP, revealing an optimal time window: at least 4 hours is necessary to obtain the highest benefits; however, we also highlight the potential risks in extending the procedure beyond this, with 6 hours appearing to be the extreme limit. NRP is thus an invaluable technique in the available organ reconditioning arsenal, although it requires an optimized protocol to properly improve graft quality.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Maquet for providing some materiel. We thank Dr Patrick Hannaert (INSERM U1082) for this help in redaction. We also thank Dr Jerome Duchemin (CHU Poitiers). We also thank Joris Ramalingom and Irene Launay (Plateforme MOPIC, INRA, Surgères, France) and Nadège Boildieu, Maité Jacquard and Sandrine Joffrion (INSERM U1082, Université de Poitiers, Faculté de médecine et pharmacie, CHU de Poitiers Service de Biochimie, France) for their technical support. This work was supported by grants from INSERM, Université de Poitiers, CHU Poitiers, Conseil Régional Poitou-Charentes, European Society for Organ Transplantation (ESOT; Organ Viability and Preservation Grant), Fondation de l'Avenir (Recherche Médicale Appliquée, program ET2-667), and Société Francophone de Transplantation.

DISCLOSURE

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

REFERENCES

1. Nuñez JR, DelRio F, Lopez E, Moreno MA, Soria A, Parra D. Non-heart-beating donors: an excellent choice to increase the donor pool. *Transplant Proc.* 2005;37(9):3651-3654. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.09.105>.
2. Daemen JH, deWit RJ, Bronkhorst MW, Yin M, Heineman E, Kootstra G. Non-heart-beating donor program contributes 40% of kidneys for transplantation. *Transplant Proc.* 1996;28(1):105-106.
3. Daemen JW, Oomen AP, Kelders WP, Kootstra G. The potential pool of non-heart-beating kidney donors. *Clin Transplant.* 1997;11(2):149-154.
4. García-Valdecasas JC, Fondevila C. In-vivo normothermic recirculation: an update. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(2):173-176. <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e3283373488>.
5. Doshi MD, Hunsicker LG. Short- and long-term outcomes with the use of kidneys and livers donated after cardiac death. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2007;7(1):122-129. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01587.x>.
6. Farney AC, Singh RP, Hines MH, et al. Experience in renal and extrarenal transplantation with donation after cardiac death donors with selective use of extracorporeal support. *J Am Coll Surg.* 2008;206(5):1028-1037. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2007.12.029>; discussion 1037.
7. Barrou B, Billault C, Nicolas-Robin A. The use of extracorporeal membranous oxygenation in donors after cardiac death. *Curr Opin Organ Transplant.* 2013;18(2):148-153. <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e32835e29f5>.
8. Billault C, Godfroy F, Thibaut F, et al. Organ procurement from donors deceased from cardiac death: a single-center efficiency assessment. *Transplant Proc.* 2011;43(9):3396-3397. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.09.025>.
9. Fondevila C. Is extracorporeal support becoming the new standard for the preservation of DCD grafts? *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2010;10(6):1341-1342. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03134.x>.
10. Valero R, Cabrer C, Oppenheimer F, et al. Normothermic recirculation reduces primary graft dysfunction of kidneys obtained from non-heart-beating donors. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 2000;13(4):303-310.
11. Fondevila C, Hessheimer AJ, Ruiz A, et al. Liver transplant using donors after unexpected cardiac death: novel preservation protocol and acceptance criteria. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2007;7(7):1849-1855. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01846.x>.
12. Gravel MT, Arenas JD, Chenault RII, et al. Kidney transplantation from organ donors following cardiopulmonary death using extracorporeal membrane oxygenation support. *Ann Transplant Q Pol Transplant Soc.* 2004;9(1):57-58.
13. Neyrinck A, VanRaemdonck D, Monbaliu D. Donation after circulatory death: current status. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2013;26(3):382-390. <https://doi.org/10.1097/ACO.0b013e328360dc87>.
14. Hessheimer AJ, Billault C, Barrou B, Fondevila C. Hypothermic or normothermic abdominal regional perfusion in high-risk donors with extended warm ischemia times: impact on outcomes? *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 2015;28(6):700-707. <https://doi.org/10.1111/tri.12344>.
15. Demiselle J, Augusto J-F, Videcoq M, et al. Transplantation of kidneys from uncontrolled donation after circulatory determination

- of death: comparison with brain death donors with or without extended criteria and impact of normothermic regional perfusion. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2016;29(4):432–442. <https://doi.org/10.1111/tri.12722>.
16. Morrissey PE, Monaco AP. Donation after circulatory death: current practices, ongoing challenges, and potential improvements. *Transplantation*. 2014;97(3):258–264. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000437178.48174.db>.
 17. Rojas-Peña A, Sall LE, Gravel MT, et al. Donation after circulatory determination of death: the university of michigan experience with extracorporeal support. *Transplantation*. 2014;98(3):328–334. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000070>.
 18. Ortega-Deballon I, Hornby L, Shemie SD. Protocols for uncontrolled donation after circulatory death: a systematic review of international guidelines, practices and transplant outcomes. *Crit Care Lond Engl*. 2015;19:268. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0985-7>.
 19. Magliocca JF, Magee JC, Rowe SA. Extracorporeal support for organ donation after cardiac death effectively expands the donor pool. *J Trauma*. 2005;58(6):1095–1101; discussion 1101–1102.
 20. García-Valdecasas JC, Tabet J, Valero R, et al. Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental animal model. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 1998;11(6):424–432.
 21. Hessheimer AJ, García-Valdecasas JC, Fondevila C. Abdominal regional in-situ perfusion in donation after circulatory determination of death donors. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016;21(3):322–328. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000315>.
 22. Shapey IM, Muiesan P. Regional perfusion by extracorporeal membrane oxygenation of abdominal organs from donors after circulatory death: a systematic review. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2013;19(12):1292–1303. <https://doi.org/10.1002/lt.23771>.
 23. Oniscu GC, Randle LV, Muiesan P, et al. In situ normothermic regional perfusion for controlled donation after circulatory death—the United Kingdom experience. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2014;14(12):2846–2854. <https://doi.org/10.1111/ajt.12927>.
 24. Geraci PM, Sepe V. Non-heart-beating organ donation in Italy. *Minerva Anesthesiol*. 2011;77(6):613–623.
 25. Allain G, Kerforne T, Thuret R, et al. Development of a preclinical model of donation after circulatory determination of death for translational application. *Transplant Res*. 2014;3:13. <https://doi.org/10.1186/2047-1440-3-13>.
 26. 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.
 27. Lazzeri C, Bonizzoli M, Valente S, et al. The role of extracorporeal membrane oxygenation in donation after circulatory death. *Minerva Anesthesiol*. 2014;80(11):1217–1227.
 28. Thuillier R, Renard C, Rogel-Gaillard C, et al. Effect of polyethylene glycol-based preservation solutions on graft injury in experimental kidney transplantation. *Br J Surg*. 2011;98(3):368–378. <https://doi.org/10.1002/bjs.7332>.
 29. Perrault LP, Aubin M-C, Malo O, et al. Status of the endothelium-derived hyperpolarizing factor pathway in coronary arteries after heterotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2007;26(1):48–55. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2006.10.015>.
 30. Steinhorn RH, Isham-Schopf B, Smith C, Green TP. Hemolysis during long-term extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr*. 1989;115(4):625–630.
 31. Lehle K, Lubnow M, Philipp A, et al. Prevalence of hemolysis and metabolic acidosis in patients with circulatory failure supported with extracorporeal life support: a marker for survival? *Eur J Heart Fail*. 2017;19(Suppl 2):110–116. <https://doi.org/10.1002/ejhf.854>.
 32. Conde E, Alegre L, Blanco-Sánchez I, et al. Hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 alpha) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival. *PLoS One*. 2012;7(3):e33258. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033258>.
 33. Schley G, Klanke B, Schödel J, et al. Hypoxia-inducible transcription factors stabilization in the thick ascending limb protects against ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(11):2004–2015. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010121249>.
 34. Nangaku M, Rosenberger C, Heyman SN, Eckardt K-U. Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013;40(2):148–157. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12005>.
 35. vanRijt WG, vanGoor H, Ploeg RJ, Leuvenink H. Erythropoietin-mediated protection in kidney transplantation: nonerythropoietic EPO derivatives improve function without increasing risk of cardiovascular events. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2013;27(3):241–248. <https://doi.org/10.1111/tri.12174>.
 36. Hu L, Yang C, Zhao T, et al. Erythropoietin ameliorates renal ischemia and reperfusion injury via inhibiting tubulointerstitial inflammation. *J Surg Res*. 2012;176(1):260–266. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.06.035>.
 37. Wagner M, Cadetg P, Ruf R, Mazzucchelli L, Ferrari P, Redaelli CA. Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. *Kidney Int*. 2003;63(4):1564–1573. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00897.x>.
 38. Lemos F, Ijzermans J, Zondervan PE, et al. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(12):3278–3287.
 39. Corbucci GG, Menichetti A, Cogliatti A, et al. Metabolic aspects of acute cerebral hypoxia during extracorporeal circulation and their modification induced by acetyl-carnitine treatment. *Int J Clin Pharmacol Res*. 1992;12(2):89–98.
 40. Yoshihara H, Bastiaansen J, Berthonneche C, Comment A, Schwitter J. An intact small animal model of myocardial ischemia-reperfusion: Characterization of metabolic changes by hyperpolarized ¹³C MR spectroscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309(12):H2058–H2066. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00376.2015>.
 41. Neild GH, Foxall PJ, Lindon JC, Holmes EC, Nicholson JK. Uroscopy in the 21st century: high-field NMR spectroscopy. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 1997;12(3):404–417.
 42. Doskocz M, Marchewka Z, Jeż M, Passowicz-Muszyńska E, Długosz A. Preliminary study on J-resolved NMR method usability for toxic kidney's injury assessment. *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ*. 2015;24(4):629–635.
 43. Zang X, Zheng F, Hong H, Jiang Y, Song Y, Xia Y. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin protects renal tubular epithelial cells in hypoxia-reperfusion by reducing apoptosis. *Int Urol Nephrol*. 2014;46(8):1673–1679. <https://doi.org/10.1007/s11255-014-0749-3>.
 44. Jochmans I, Lerut E, vanPelt J, Monbaliu D, Circulating PJ, AST, H-FABP, and, NGAL are early and accurate biomarkers of graft injury and dysfunction in a preclinical model of kidney transplantation. *Ann Surg*. 2011;254(5):pp. 784–791; discussion 791–792. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3182368fa7>.
 45. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011;17(11):1391–1401. <https://doi.org/10.1038/nm.2507>.
 46. Sevastos J, Kennedy SE, Davis DR, et al. Tissue factor deficiency and PAR-1 deficiency are protective against renal ischemia reperfusion

- injury. *Blood*. 2007;109(2):577–583. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-008870>.
47. Leo R, Praticò D, Iuliano L, et al. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation*. 1997;95(4):885–891.
 48. Lindmark E, Tenno T, Siegbahn A. Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(10):2322–2328.
 49. Rossi J, Rouleau L, Tardif J-C, Leask RL. Effect of simvastatin on Kruppel-like factor2, endothelial nitric oxide synthase and thrombomodulin expression in endothelial cells under shear stress. *Life Sci*. 2010;87(3–4):92–99. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.05.008>.
 50. Ogawa S, Shreeniwas R, Brett J, Clauss M, Furie M, Stern DM. The effect of hypoxia on capillary endothelial cell function: modulation of barrier and coagulant function. *Br J Haematol*. 1990;75(4):517–524.
 51. Ahamed J, Ruf W. Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem*. 2004;279(22):23038–23044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401376200>.
 52. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost JTH*. 2005;3(8):1800–1814. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01377.x>.
 53. Chu AJ. Tissue factor mediates inflammation. *Arch Biochem Biophys*. 2005;440(2):123–132. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.06.005>.
 54. Kamoun M. Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. *Clin Biochem*. 2001;34(1):29–34.
 55. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 1999;398(6729):718–723. <https://doi.org/10.1038/19546>.
 56. Stojanovic T, Gröne HJ, Gieseler RK, et al. Enhanced renal allograft rejection by inhibitors of nitric oxide synthase: a nonimmunologic influence on alloreactivity. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 1996;74(2):496–512.
 57. Ben Abdennebi H, Zaouali MA, Alfany-Fernandez I, Tabka D, Roselló-Catafau J. How to protect liver graft with nitric oxide. *World J Gastroenterol WJG*. 2011;17(24):2879–2889. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i24.2879>.
 58. Vos I, Joles JA, Rabelink TJ. The role of nitric oxide in renal transplantation. *Semin Nephrol*. 2004;24(4):379–388.
 59. Chatauret N, Coudroy R, Delpech PO, et al. Mechanistic analysis of nonoxygenated hypothermic machine perfusion's protection on warm ischemic kidney uncovers greater eNOS phosphorylation and vasodilation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2014;14(11):2500–2514. <https://doi.org/10.1111/ajt.12904>.
 60. Gallinat A, Fox M, Lüer B, Efferz P, Paul A, Minor T. Role of pulsatility in hypothermic reconditioning of porcine kidney grafts by machine perfusion after cold storage. *Transplantation*. 2013;96(6):538–542. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31829c24e2>.
 61. Shin J, Kim K, Lim YS, et al. Incidence and clinical features of intracranial hemorrhage causing out-of-hospital cardiac arrest: a multicenter retrospective study. *Am J Emerg Med*. 2016;34(12):2326–2330. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2016.08.043>.
 62. Net M, Valero R, Almenara R, et al. The effect of normothermic recirculation is mediated by ischemic preconditioning in NHBD liver transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2005;5(10):2385–2392. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01052.x>.
 63. Hosgood SA, Nicholson ML. The first clinical case of intermediate ex vivo normothermic perfusion in renal transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2014;14(7):1690–1692. <https://doi.org/10.1111/ajt.12766>.
 64. Minor T, Sutschet K, Witzke O, Paul A, Gallinat A. Prediction of renal function upon reperfusion by ex situ controlled oxygenated rewarming. *Eur J Clin Invest*. 2016;46(12):1024–1030. <https://doi.org/10.1111/eci.12687>.
 65. Tillet S, Giraud S, Kerforne T, et al. Inhibition of coagulation proteases Xa and IIa decreases ischemia-reperfusion injuries in a preclinical renal transplantation model. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2016;178(95–106):e1. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.07.014>.
 66. Reznik O, Skvortsov A, Loginov I, Ananyev A, Bagnenko S, Moysyuk Y. Kidney from uncontrolled donors after cardiac death with one hour warm ischemic time: resuscitation by extracorporeal normothermic abdominal perfusion “in situ” by leukocytes-free oxygenated blood. *Clin Transplant*. 2011;25(4):511–516. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2010.01333.x>.
 67. Miki C, Gunson BK, Buckels J, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M. Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation. *Ann Surg*. 2009;250(3):502–503; author reply 503–504. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181b4cbe0>.
 68. Thuillier R, Dutheil D, Trieu M, et al. Supplementation with a new therapeutic oxygen carrier reduces chronic fibrosis and organ dysfunction in kidney static preservation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2011;11(9):1845–1860. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03614.x>.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Kerforne T, Allain G, Giraud S, et al. Defining the optimal duration for normothermic regional perfusion in the kidney donor: A porcine preclinical study. *Am J Transplant*. 2018;00:1–15. <https://doi.org/10.1111/ajt.15063>

3.1. Introduction

La modélisation préclinique des deux modes de reconditionnement des greffons rénaux provenant des DDAC non contrôlés nous a permis de mettre en évidence la supériorité de la CRN sur le RIS. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature [23, 24]. Une durée de 4 heures semblerait conférer un bénéfice supplémentaire.

Parmi les pays qui recommandent l'utilisation de la CRN, il existe une grande variabilité dans les pratiques. Le maintien de la normothermie semble adopté par de nombreuses équipes depuis les travaux de Valero [22]. Il n'y a pas de recommandations quant à la durée optimale de la CRN. Seules des durées maximales tolérées ont été arrêtées. Elles varient entre 120 minutes pour les Pays-Bas à 360 minutes pour l'Italie. Afin de répondre à cette problématique, il nous a paru intéressant d'étudier de quelle manière la CRN permettait de reconditionner les greffons rénaux et notamment quels étaient ses effets en fonction du temps. L'utilisation du modèle porcin de CRN précédemment décrit nous a permis l'étude de trois durées différentes (2 heures, 4 heures et 6 heures) sans variation des autres paramètres. Ainsi, seule la durée du reconditionnement était responsable des effets constatés sur la reprise de fonction du greffon.

3.2. Matériel et méthode (synthèse)

Ce protocole a été mené après accord du comité éthique sur l'expérimentation animale conformément aux recommandations en vigueur.

Les animaux étaient des porcs mâles Large White âgés de 3 mois et pesant entre 40 à 50kg.

Le conditionnement préopératoire et le protocole d'anesthésie étaient identiques à ceux précédemment rapportés.

La CRN a été mise en place et menée selon le modèle établi préalablement.

Des prélèvements de sang circulant ont été réalisés à T0 avant l'arrêt cardiaque, après 30 minutes d'ischémie chaude, dans les premières minutes suivant la reperfusion puis toutes les heures pendant la CRN.

En fin de procédure, les reins étaient explantés.

Le rein gauche était mis en machine de perfusion LifePort™ Kidney Transporter pour 18 heures de conservation hypothermique. A l'issue de cette préservation, il était greffé chez un animal allo-compatible ayant subi une néphrectomie bilatérale. L'animal était suivi pendant 3 mois.

Au niveau du rein droit, des prélèvements tissulaires au niveau de la corticale était réalisés en fin de CRN.

Cinq groupes expérimentaux ont été réalisés :

- Ischémie chaude et 2h de CRN (groupe CRN 2h) ;
- Ischémie chaude et 4h de CRN (groupe CRN 4h) ;
- Ischémie chaude et 6h de CRN (groupe CRN 6h) ;
- Ischémie chaude sans CRN (groupe CRN 0h) ;
- Groupe contrôle sans ischémie chaude ni reconditionnement (groupe contrôle).

Chaque groupe était composé de 6 animaux (n=6).

3.3. Résultats

3.3.1. Suivi des paramètres hémodynamiques pendant la CRN

Le débit de pompe, la pression artérielle moyenne et la saturation artérielle en oxygène sont restés stables au cours des 6 heures de CRN. La pression partielle en oxygène et la saturation veineuse en oxygène décroissent progressivement au cours de la CRN, tout comme les valeurs de l'hémoglobine et de l'hématocrite. Une acidose métabolique était observée chez tous les animaux dans les suites de l'ischémie chaude. Le dosage des bicarbonates augmentait

dès la première heure de CRN pour rester stable par la suite, sans toutefois retrouver une valeur normale.

3.3.2. Activation de la voie de HIF-1 α au cours de la CRN

L'expression au niveau du cortex rénal de la protéine HIF-1 α a tendance à diminuer à la fin de l'ischémie chaude puis augmente au cours de la CRN avec une valeur significativement plus élevée pour les groupes CRN 2h et CRN 4h par rapport au groupe contrôle. La même cinétique s'observe pour l'expression de l'ARN de VEGF, EPO et HO-1 et du transporteur de glucose de type 1 (Glut-1). Il existe une différence significative pour l'expression de l'ARN de l'EPO entre les groupes CRN 2h, CRN 4h et CRN 6h par rapport au groupe CRN 0h et par rapport au groupe contrôle ; pour l'expression de l'ARN de HO-1 entre les groupes CRN 2h et CRN 4h et le groupe contrôle et entre les groupes CRN 2h, CRN 4h et CRN 6h et le groupe CRN 0h ; pour l'expression de l'ARN de Glut-1 entre les groupes CRN 0h et le groupe contrôle et entre les groupes CRN 2h et CRN 4h et le groupe CRN 0h.

3.3.3. Régulation transitoire des marqueurs de souffrance rénale et de malperfusion au cours de la CRN

Le ratio lactate/pyruvate plasmatique diminue après l'ischémie chaude puis augmente de façon significative à 1 heure et 2 heures de CRN par rapport au groupe contrôle avant de diminuer à nouveau à 4 heures puis de rester en plateau jusqu'à 6 heures. Le dosage des LDH plasmatiques augmente de façon significative à 1 heure pour atteindre un pic à 2 heures et redescendre progressivement jusqu'à une valeur physiologique à 6 heures. La créatininémie augmente de façon significative dès 1 heure de CRN pour rester par la suite en plateau jusqu'à 6 heures. Le dosage des aspartate amino-transférases (ASAT) augmente significativement dès la fin de l'ischémie chaude, redescend progressivement jusqu'à 4 heures avant de ré-ascensionner à 6 heures. Le dosage de NGAL augmente progressivement pour atteindre un

pic significatif à 2 heures puis diminue à nouveau avant de présenter un deuxième pic à 6 heures. Le dosage de KIM-1 augmente significativement dès 1 heure puis diminue jusqu'à 4 heures avant de ré-augmenter à 6 heures.

3.3.4. Régulation transitoire des paramètres de l'hémostase au cours de la CRN

La numération plaquettaire diminue significativement dès la première heure de CRN puis reste stable par la suite. Le dosage plasmatique de CD40 ligand augmente significativement au cours des 2 premières heures de CRN puis redescend à des valeurs physiologiques à 4 heures et 6 heures. Le dosage plasmatique de FT soluble fluctue au cours de la CRN avec deux pics significatifs à 1 heure et 4 heures.

Au niveau du cortex rénal, l'expression de la thrombomoduline diminue après l'ischémie chaude puis augmente progressivement tout au long de la CRN. L'expression de FT et de *protease-activated receptor-2* (PAR-2), faisant le lien entre coagulation et inflammation, a été également étudiée. L'expression de FT augmente significativement à 4 heures et 6 heures, celle de FT activé dès 2 heures et celle de PAR-2 à 6 heures.

3.3.5. Contrôle transitoire par la CRN de l'initiation d'une réponse inflammatoire

Au niveau du tissu rénal, l'expression d'ARN d'IL-6 augmente significativement à 2 heures et 4 heures puis rejoint son niveau de base à 6 heures. L'expression d'ARN d'IL-1 β augmente à 6 heures. Celle d'IL-8 augmente à 2 heures puis reste stable jusqu'à 6 heures. Celle d'IL-10 présente un pic à 2 heures et un pic à 6 heures. L'expression de l'ARN de MCP-1 augmente rapidement entre 4 heures et 6 heures et est associée à une infiltration macrophagique à 6 heures. Les expressions de TNF- α et d'iNOS ne présentent pas de variation significative au cours de la CRN.

3.3.6. Absence d'impact de la CRN sur l'histologie rénale

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative par rapport au groupe contrôle concernant les lésions histologiques.

3.3.7. Amélioration de la perfusion rénale après CRN

Après mise sur machine hypothermique, la perfusion rénale augmente rapidement au cours des 2 premières heures. A l'inverse, les résistances diminuent pour atteindre un plateau à partir de 2 heures. L'analyse des aires sous la courbe concernant la mesure du débit de perfusion et des résistances tout au long de la préservation machine et des résistances en fin de préservation machine montre un bénéfice significatif de la CRN, quelle que soit sa durée. Le dosage de NO plasmatique augmente significativement par rapport à la fin de l'ischémie chaude à 1 heure et 2 heures puis redescend progressivement pour retrouver un niveau proche de la valeur de base à 4 heures et 6 heures. Cette augmentation est due à l'activation d'eNOS lors de la phase précoce de la CRN.

3.3.8. Amélioration de la fonction rénale précoce et tardive après 4 à 6 heures de CRN

Les animaux ont quasiment tous repris leur diurèse à J1. Concernant le débit de filtration glomérulaire, les greffons issus des groupes CRN 4h et CRN 6h retrouvent les valeurs du groupe contrôle au cours de la première semaine post-greffe alors que les greffons issus des groupes CRN 2h et CRN 0h ne l'atteignent jamais au cours du suivi de 3 mois. L'aire sous la courbe du débit de filtration glomérulaire entre J0 et J14 montre également une meilleure fonction rénale pour les groupes CRN 4h et CRN 6h. Ces résultats se confirment à J90 avec également un ratio protéinurie/créatininurie plus faible pour ces deux groupes. Enfin, concernant les lésions de fibrose à J90, il existe une différence significative par rapport au

groupe contrôle pour les groupes CRN 0h et CRN 2h, en faveur du groupe contrôle. Il n'y a pas de significativité pour les résultats concernant les groupes CRN 4h et CRN 6h.

3.4. Discussion

Plusieurs études cliniques ont montré le bénéfice de la CRN mais les mécanismes mis en jeu au cours du reconditionnement et sa durée optimale restent à déterminer. L'utilisation du modèle préclinique mis au point précédemment permet d'apporter des éléments de réponse.

Durant la CRN les paramètres hémodynamiques restent stables pendant les 6 heures de procédure alors que l'hémoglobémie, l'hématocrite et la saturation veineuse en oxygène diminuent à 6 heures, du fait de l'hémodilution, conséquence du remplissage vasculaire (SIRS et constitution d'un troisième secteur) et de l'hémolyse au cours de la CEC.

La CRN entraîne une activation de la voie de HIF-1 α , voie cellulaire d'adaptation à l'hypoxie bien connue. Les protéines HIF sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité α régulée par l'oxygène et d'une sous-unité β . Deux isoformes de la sous-unité α ont été identifiées au niveau rénal : HIF-1 α exprimé au sein des cellules épithéliales tubulaires et HIF-2 α au sein des cellules glomérulaires, endothéliales et interstitielles. Ces deux isoformes sont régulées de façon très similaire. En présence d'oxygène, la sous-unité α subit une hydroxylation par des prolylhydroxylases dès sa sortie du noyau. Elle est ensuite liée par la protéine von Hippel Lindau, induisant une activité d'ubiquitination et menant à la dégradation de cette sous-unité α par le protéasome cytoplasmique. En condition d'hypoxie, la réaction d'hydroxylation ne se produit pas et HIF α s'accumule dans le cytoplasme sans être dégradée. Elle va ensuite être transloquée dans le noyau cellulaire et former un complexe fonctionnel avec HIF β et des co-activateurs transcriptionnels. La liaison de l'hétérodimère HIF aux éléments de réponse à l'hypoxie des gènes cibles initie leur transcription [174, 175]. Dans nos conditions expérimentales, en fin d'ischémie chaude, la protéine n'est pas exprimée dans le tissu rénal.

Son expression est restaurée après 2 heures de CRN et induit l'expression des gènes d'EPO, VEGF, HO-1 et Glut-1. Ces protéines sont connues pour avoir des effets positifs sur la fonction rénale en condition d'hypoxie.

Le ratio lactate/pyruvate et le dosage de LDH augmentent pendant les 2 premières heures de CRN en conséquence à l'ischémie chaude. Ces valeurs se normalisent entre 4 heures et 6 heures de CRN, suggérant un retour à une perfusion physiologique avec une adéquation entre les besoins et les apports en oxygène au niveau tissulaire. Ces données sont en faveur d'un effet reconditionnant de la CRN avec le rétablissement d'un métabolisme aérobie.

Par ailleurs, l'ischémie chaude entraîne l'augmentation de marqueurs corrélés à la souffrance rénale : créatinine, ASAT, NGAL et KIM-1. La créatininémie n'est pas discriminante entre les différents groupes, soulignant les limites de ce marqueur. Les valeurs d'ASAT, NGAL et KIM-1 diminuent entre 1 à 2 heures de CRN et 4 heures, suggérant là encore un effet reconditionnant de la CRN mais pouvant également être en lien avec l'hémodilution. A noter que ces marqueurs se ré-ascensionnent à 6 heures de CRN, évoquant un potentiel effet négatif de la CRN prolongée sur le rein.

Les paramètres de l'inflammation, de l'hémostase et de la coagulation sont bien connus pour être corrélés aux lésions d'ischémie chaude. La CRN va faire recirculer un sang contenant des facteurs activés de la coagulation, induisant l'activation et l'agrégation plaquettaires, en association avec les ROS générés. A noter que la nécessité d'utiliser de l'héparine non fractionnée au cours de la CRN exclut l'étude de la voie intrinsèque de la coagulation.

La numération plaquettaire n'est pas modifiée par l'ischémie chaude. Sa valeur diminue dès la première heure de CRN puis reste stable, en lien certainement avec le phénomène de consommation lié à la chirurgie. Le marqueur d'activation plaquettaire CD40 ligand est transitoirement augmenté au cours des premières heures de CRN. CD40 ligand est connu pour entraîner la sécrétion de FT soluble par les monocytes. Nous avons également observé une

augmentation de l'expression au niveau du cortex rénal de thrombomoduline à 2 heures de CRN probablement en rapport avec le rétablissement du *shear stress*. En effet, la *down-régulation* de l'expression endothéliale de thrombomoduline par l'ischémie a été rapportée. La CRN pourrait permettre aux cellules endothéliales rénales de répondre à l'instauration d'un milieu pro-coagulant par production de thrombomoduline.

Nous avons étudié l'activation du FT et des PAR, faisant le lien entre les voies de la coagulation et de l'immunité innée. Durant la CRN, on constate une augmentation de l'expression de l'ARN de PAR-2 à 2 heures suivie d'une expression de la protéine PAR-2 clivée à 6 heures, de façon cohérente avec le niveau d'expression corticale de FT total et activé. L'augmentation de PAR-2 clivée et de FT activé induit l'expression de cytokines, de chimiokines et des molécules d'adhésion, telles que MCP-1, IL-1 β , IL-6 et IL-8, impliquées dans le rejet du greffon. Dans nos conditions expérimentales, l'expression des ARN d'IL-6 et d'IL-8 apparaît dès les 2 premières heures de CRN alors que celle d'IL-1 β et de la protéine MCP-1 augmente vers 4 à 6 heures de CRN, suggérant que 6 heures est une durée à ne pas dépasser. Ces données sont néanmoins à mettre en balance avec l'expression transitoire à 2 heures puis 6 heures de l'ARN d'IL-10, cytokine immunosuppressive. Nous avons étudié le lien entre les cytokines, l'activation endothéliale et l'invasion des cellules immunitaires. Les expressions d'e-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1 ne varient pas durant la CRN. Nous avons cependant observé au niveau du cortex rénal, une infiltration macrophagique à 6 heures, en rapport avec l'expression de MCP-1, suggérant encore une fois un possible effet délétère de la CRN à 6 heures.

Concernant l'étude des paramètres mesurés lors de la conservation en MPH, on constate des résistances plus faibles et un meilleur débit de perfusion dans tous les groupes CRN quelle que soit leurs durées. La CRN confère donc un effet bénéfique permettant une meilleure perfusion des reins. En effet, la production de NO est augmentée par la CRN dès la première

heure, due à l'activation d'eNOS lors de la phase précoce de la CRN. Or, eNOS est un facteur important pour la préservation des organes, impliqués dans les bénéfices induits par les MPH. Ainsi, les MPH permettraient de potentialiser les effets induits par la CRN *via* la production de NO.

La transplantation des reins après reconditionnement par CRN a permis de mettre en avant des effets positifs de ce reconditionnement en termes de reprise de fonction. Les résultats semblent meilleurs pour les groupes CRN 4h et CRN 6h avec un débit de filtration glomérulaire plus élevé et un pourcentage de fibrose plus faible 3 mois après la greffe.

L'ensemble de ces résultats suggère donc l'intérêt d'un reconditionnement par CRN d'au moins 4 heures mais sans dépasser 6 heures, un compromis entre la durée nécessaire à l'activation des voies réparatrices et le début de la mise en route de voies néfastes dues au prolongement de la CRN. En effet, si la reprise de fonction des reins issus du groupe CRN 6h est favorable, on observe à 6 heures une ré-ascension de certains marqueurs de lésion tubulaire rénale (ASAT, NGAL et KIM-1) associés à une infiltration macrophagique plus importante, suggérant un effet néfaste de la CRN prolongée.

Le maintien de paramètres hémodynamiques stables au-delà de la sixième heure dans notre modèle était difficile. Nous avons tenté d'étendre chez deux animaux la durée de reconditionnement jusqu'à 7 heures, mais le maintien de l'objectif de débit était difficile, même au prix d'un remplissage vasculaire important entraînant inévitablement une hémoglobininémie très basse (autour de 5g/dl), incompatible avec un transport en oxygène efficace. Devant l'absence de possibilité de transfusion au sein du laboratoire, l'expérience n'a pas été renouvelée.

Si cette étude nous a permis la compréhension de phénomènes importants mis en route lors de la CRN, ce modèle animal présente des limites. Comme nous l'avons évoqué précédemment, la phase de *low flow* avec la mise en route du massage cardiaque externe et ses conséquences

(hypoperfusion, hypotension et effets compensateurs de l'hypercapnie) n'est pas modélisée. L'injection de potassium pour entraîner l'arrêt cardiaque peut être également critiquable bien que les valeurs de potassium mesurées au cours de la CRN soient compatibles avec celles mesurées après une courte période d'arrêt circulatoire. Nous avons également pris le parti d'utiliser un remplissage vasculaire associé à de la noradrénaline et ceci afin d'avoir des paramètres hémodynamiques, en plus du débit de pompe, parfaitement comparables entre les groupes. Ainsi, seule la durée de la CRN était discriminante.

Par ailleurs, l'étude d'autres organes comme le foie et le cœur n'a pas été réalisée au cours de ces travaux, du fait d'une logistique trop lourde à mettre en place de façon concomitante aux travaux réalisés sur les reins. Les biomarqueurs de régénération dans le rein n'ont pas non plus été étudiés car leur évaluation aurait nécessité l'euthanasie d'un trop grand nombre d'animaux, ce qui n'est pas justifiable sur un plan éthique.

Des études antérieures ont montré un bénéfice de la CRN sur le reconditionnement du greffon rénal issu des DDAC non contrôlé mais ses effets exacts sont encore à déterminer. A notre connaissance cette étude est la première à mettre en évidence les différentes voies impliquées et leur mise en route en fonction du temps. L'utilisation de ce modèle pourrait également être intéressante pour comparer différentes méthodes permettant d'améliorer la préservation des greffons, avec notamment l'étude du maintien de la normothermie tout du long de la procédure par rapport à un réchauffement progressif ou uniquement en fin de reconditionnement.

Nos résultats sont en faveur d'une durée de CRN n'allant pas au-delà de 4 heures du fait de conditions hémodynamiques se dégradant entre 4 et 6 heures. Le prolongement de la durée de CRN pourrait cependant se faire dans de bonnes conditions en cas de possibilité de transfusion sanguine ou d'utilisation d'additifs (précurseurs métaboliques, transporteur

d'oxygène ou agents cytoprotecteurs). L'utilisation de techniques innovantes comme les micros ARN ou les cellules souches pourrait également avoir un intérêt au cours de la CRN.

3.5. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence les mécanismes à l'origine des effets bénéfiques de la CRN et une durée optimale de 4 heures, nécessaire à leur mise en place, sans atteindre les effets délétères d'une procédure prolongée que l'on démasque à 6 heures. L'utilisation de la CRN apparaît comme une technique incontournable dans la prise en charge des DDAC avec prélèvement rénal. Ces résultats pourraient permettre la mise en place d'un protocole standardisé permettant d'harmoniser les prises en charge entre les équipes de transplantation.

PARTIE II : OPTIMISATION DE LA CONSERVATION

HYPOTHERMIQUE

1. Effet des MPH sur les greffons rénaux en post-CRN

1.1. Introduction

La période de conservation est une étape indispensable dans le processus de transplantation des reins issus de donneurs décédés. De nombreuses possibilités allant de la conservation hypothermique statique à la conservation dynamique par machine et l'utilisation de nombreux additifs ont été étudiés. Les MPH semblent conférer un intérêt clinique indéniable sur les greffons des donneurs à critères élargis [76, 113, 115, 118-121, 123, 125, 176]. Concernant les greffons rénaux issus des DDAC, la plupart des équipes utilisent les MPH [76, 115, 118-124, 16-128, 164, 166]. Elles sont en effet recommandées par la plupart des *guidelines* établis et notamment par l'ABM [42, 131].

Nous nous sommes intéressés à leur effet en post-reconditionnement par CRN. L'utilisation du modèle porcin de DDAC nous a permis d'en réaliser une étude mécanistique, non réalisable en clinique.

1.2. Matériel et méthode

1.2.1. Protocole chirurgical

Nous avons utilisé le modèle préclinique préalablement décrit de DDAC avec mis en place d'une CRN. A l'issue de 2 heures ou 4 heures de reconditionnement, les reins étaient explantés. L'un des reins était lavé avec 1L de KPS-1 puis conservés 18 heures à 4°C en machine LifePort™ Kidney Transporter (groupes CRN2h + machine et CRN4h + machine). L'autre rein était lavé avec 1L de solution UW. Il était ensuite coupé dans le sens transversal et repartit de manière aléatoire :

- Une partie était plongée dans une solution UW à 4°C pour 18 heures de conservation statique (groupes CRN2h + statique et CRN4h + statique) ;
- Une partie permettait la réalisation d'échantillons tissulaires en post-CRN immédiat (groupes CRN2h et CRN4h) avec prélèvements sur la corticale et la médullaire pour

conservation dans du formol (analyses histologiques) et de l'azote liquide (analyses transcriptomiques).

Ces mêmes prélèvements étaient réalisés sur les reins à l'issue des 18 heures de conservation hypothermique.

Chaque groupe était composé de 4 animaux (n=4).

1.2.2. Analyses histologiques

Elles ont été réalisées conformément à la méthode décrite précédemment (**page 71**).

Pour les analyse immunohistochimiques, les anticorps dirigés contre HIF1- α (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Allemagne) et VEGF (Invitrogen) ont été utilisés avec des anticorps secondaires appropriés (Invitrogen) couplés aux fluorochromes Alexa488 (vert pour HIF1- α) ou Cy3 (rouge pour VEGF). La quantité de marquage a été évaluée à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Elle est exprimée en proportion de pixels au-dessus de la valeur du bruit de fond par rapport au nombre de pixels total.

1.2.3. Analyses transcriptomiques par PCR quantitative

Elles ont été réalisées sur tissu rénal selon la méthode rapportées précédemment (**page 62**). Les transcrits étudiés liés à la réponse inflammatoire et immunitaire sont TNF- α , TLR4, SLAII DR, MCP-1 et ICAM-1. Les transcrits étudiés en rapport avec l'hypoxie et le stress oxydant sont HIF-1 α , VEGF, EPO et HO-1.

1.2.4. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type. Après significativité observée avec le test ANOVA, le test *t* de Student a été utilisé pour réaliser les tests statistiques à comparaisons multiples. Les différences pour une valeur de *p* inférieure à 0,05 sont considérées comme significatives.

1.3. Résultats

1.3.1. Histologie standard

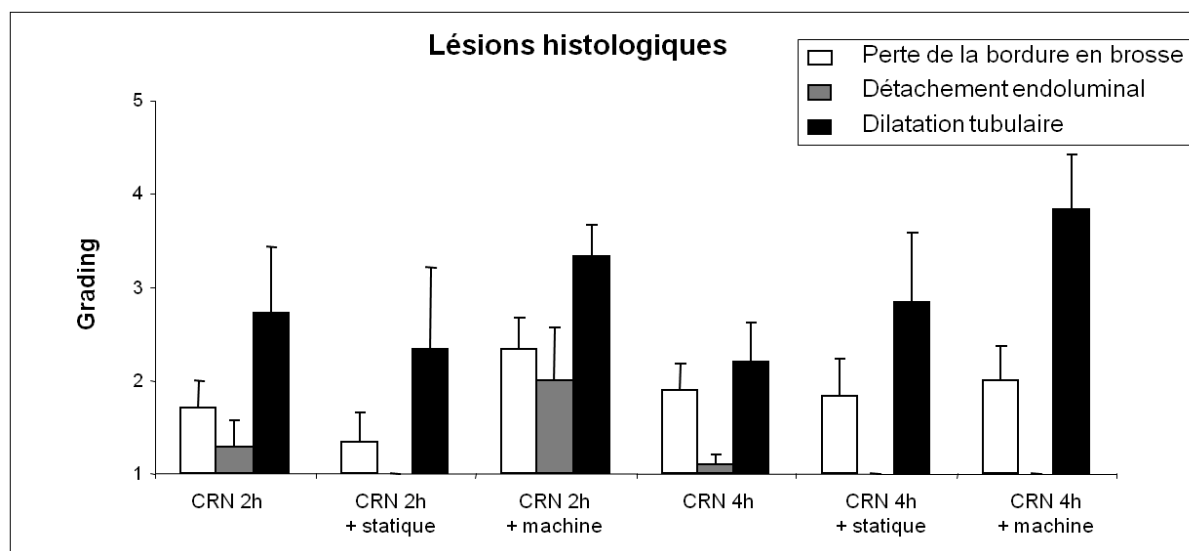


Figure 20 : Lésions histologiques en fonction du mode de conservation.

Les reins préservés en machine de perfusion ont tendance à présenter une dilatation tubulaire plus importante que ceux conservés en statique, quelle que soit la durée de la CRN (**figure 20**). Ces résultats ne sont pas significatifs.

1.3.2. Immunohistochimie

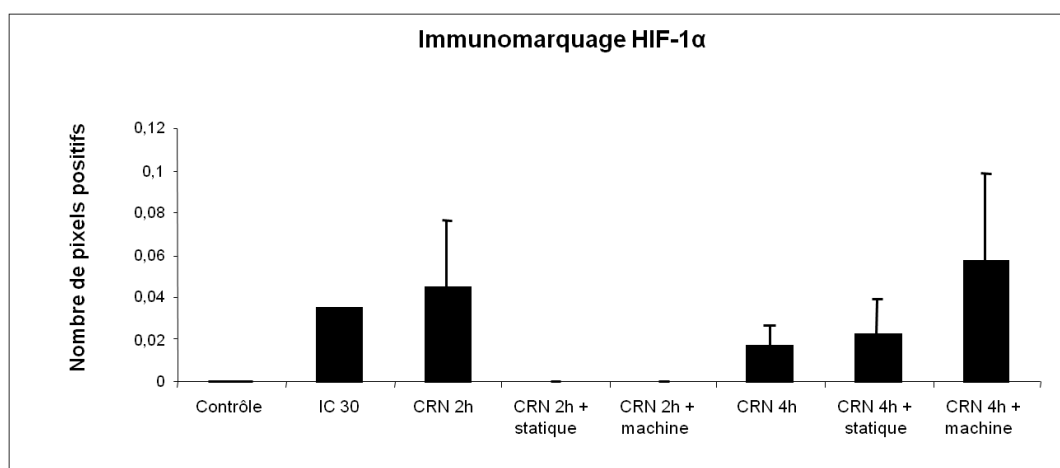


Figure 21 : Intensité de l'immunomarquage HIF-1 α en fonction du mode de conservation.

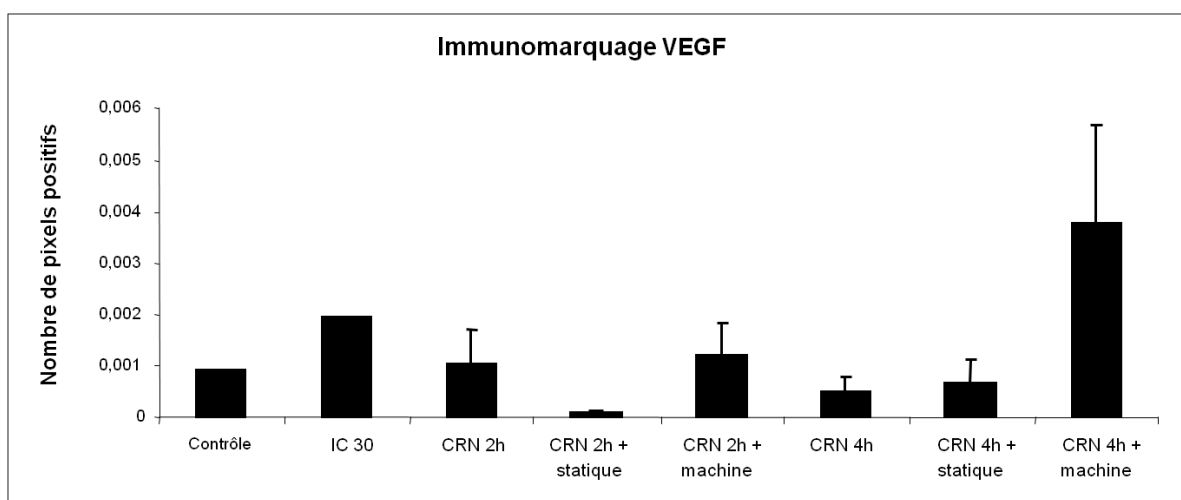


Figure 22 : Intensité de l'immunomarquage VEGF en fonction du mode de conservation.

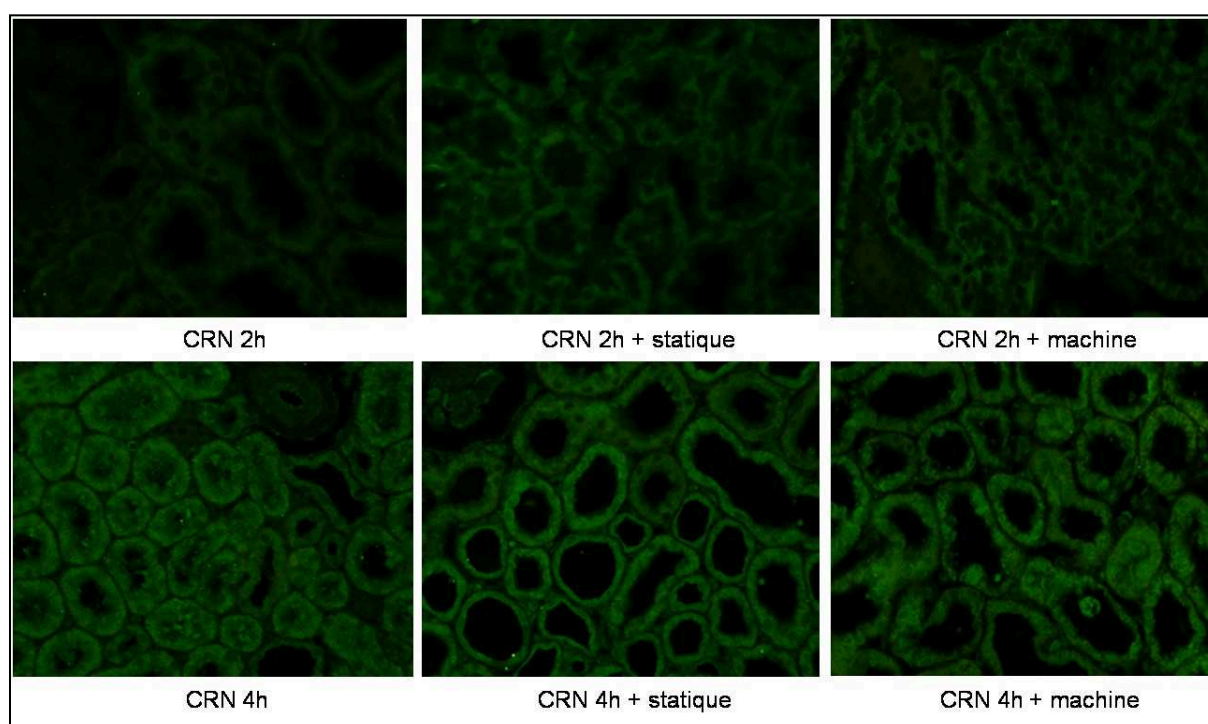


Figure 23 : Immunomarquage HIF-1 α en vert (grossissement x 200).

L'expression de HIF-1 α et de VEGF est plus faible après 4 heures de CRN qu'après 2 heures (**figures 21 et 22**). Aucun de ces résultats n'est statistiquement significatif.

On observe qu'après 2 heures de CRN, HIF-1 α est principalement localisé dans le cytoplasme, sous forme inactive, alors qu'après 4 heures, HIF-1 α est retrouvé au niveau nucléaire, sous forme active (**figure 23**).

En fin de conservation hypothermique, l'expression de HIF-1 α est quasi-nulle après 2 heures de CRN quel que soit le mode de préservation. Son expression est plus importante après 4 heures de CRN et préservation en machine et HIF-1 α reste localisé au noyau, sous forme active (**figures 21 et 23**). Concernant l'expression de VEGF, celle-ci reste faible dans tous les groupes avec cependant un immunomarquage plus important après conservation machine qu'après conservation statique, surtout après 4 heures de CRN (**figure 22**).

1.3.3. Analyse transcriptomique tissulaire

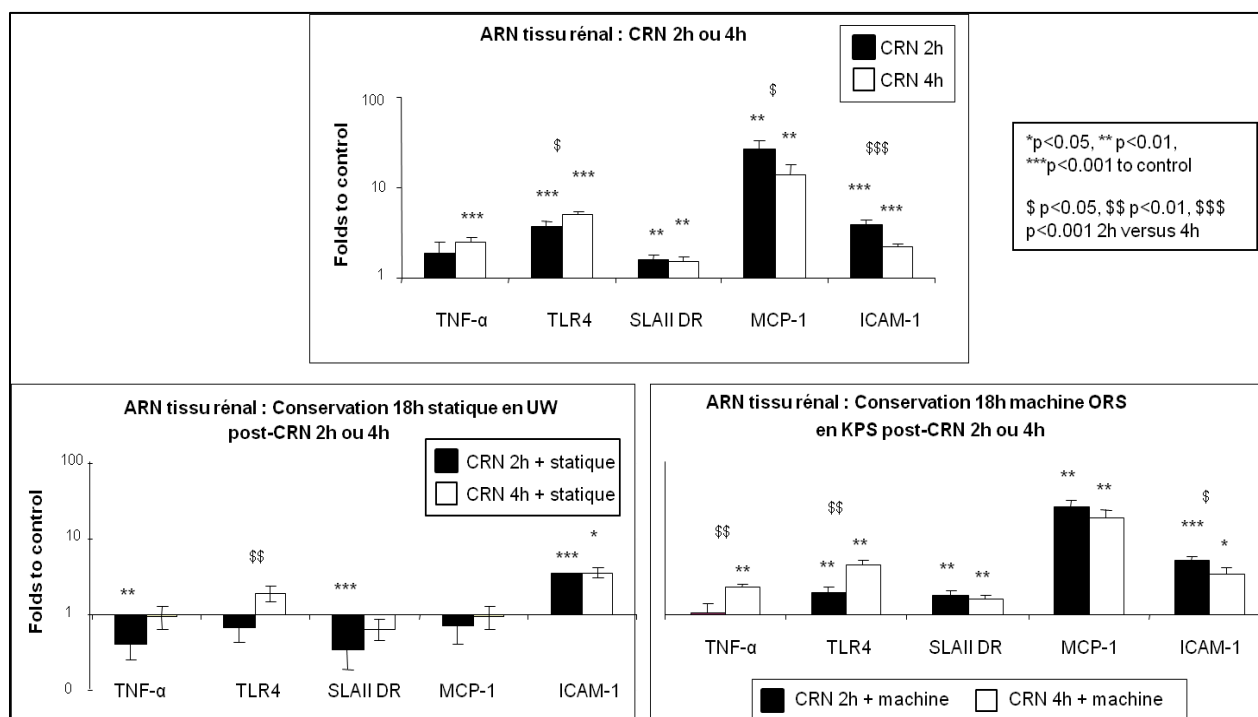


Figure 24 : Quantification relative des gènes liés à la réaction inflammatoire et immunitaire.

Concernant les transcrits des gènes de la réponse inflammatoire et immunitaire (**figure24**), la CRN induit une augmentation significative de leur expression. Celle-ci reste

stable après conservation en machine de perfusion et diminue après conservation statique, à l'exception de ICAM-1 qui reste stable quels que soient la durée de la CRN et le mode de conservation hypothermique. A noter également une expression plus importante de TNF- α par les reins conservés en machine de perfusion après 4 heures de CRN.

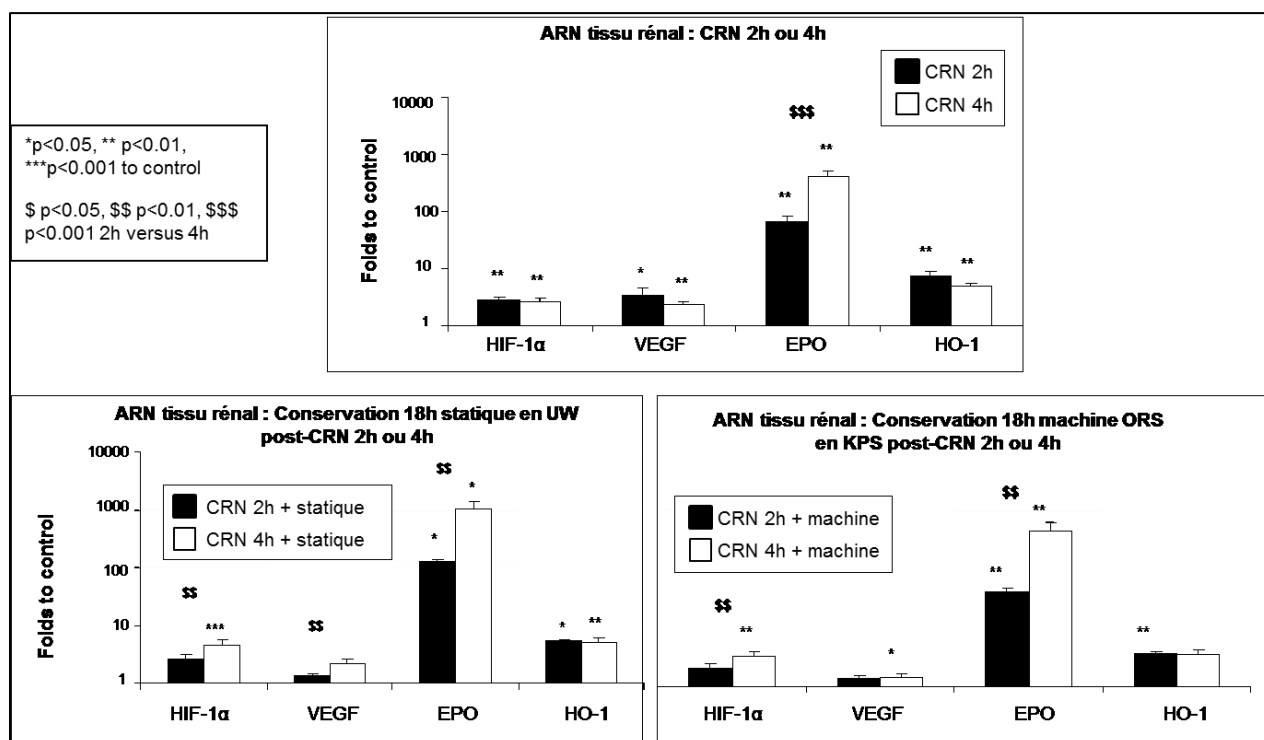


Figure 25 : Quantification relative des gènes liés à l'hypoxie et au stress oxydant.

Concernant les transcrits des gènes en réponse à l'hypoxie et au stress oxydant (**figure 25**), leur niveau d'expression en fin de CRN est globalement maintenu, quel que soit le mode de conservation hypothermique. Après 4 heures de CRN, les reins expriment cependant plus HIF-1 α en fin de conservation hypothermique et plus VEGF s'ils sont conservés en statique.

1.4. Discussion

Bien que non significatifs sur le plan statistique, les résultats histologiques semblent moins bons après conservation en MPH avec des lésions de dilatation tubulaire plus étendues.

Ces résultats paraissent paradoxaux compte-tenu des nombreuses publications mettant en avant un réel avantage des MPH chez les DDAC sur la reprise de fonction [76, 115, 118-124, 126-128, 164-166]. La dilatation tubulaire peut être expliquée par la précipitation au fond des tubules des débris cellulaires résultant des lésions d'ischémie du fait de la poursuite du lavage du rein par la machine. Il peut s'agir d'une anticipation des lésions de reperfusion. Seule la transplantation de ces reins aurait pu permettre de répondre à cette question. Devant les recommandations et la pratique clinique actuelles mettant en avant les machines de perfusion, l'étude chez l'animal de la transplantation des reins issus de cette conservation statique ne paraît pas légitime sur les plans éthique et économique.

L'expression des transcrits des gènes de la réponse inflammatoire et immunitaire est globalement stable pendant la CRN. La perfusion en machine permet de maintenir ce niveau d'expression alors qu'il s'effondre après conservation statique. Ces résultats peuvent être dus à des cellules rénales trop altérées pour exprimer ces gènes, du fait d'une conservation statique trop délétère, en lien avec une déplétion importante en ATP et une dysfonction métabolique majeure. L'autre hypothèse est que les cellules rénales n'expriment plus ces gènes car elles ne sont plus stimulées par un phénomène de perfusion, que l'on retrouve durant la CRN ou la conservation en machine. On peut supposer qu'il s'agit d'un retard d'expression, observée à la reperfusion. En effet, les machines de perfusion ne sont pas hermétiques et l'oxygène de l'air ambiant se dissout dans la solution de conservation, permettant le maintien d'un apport d'oxygène. Du fait d'une glycolyse mieux préservée, la déplétion en ATP devrait ainsi être moins importante lors de la conservation en machine de perfusion par rapport à la conservation statique. Là encore, seule la transplantation de ces reins aurait pu permettre de répondre clairement à ces questions.

2. Apport de l'oxygénation active en MPH

Benefits of active oxygenation during hypothermic machine perfusion of kidneys in a preclinical model of deceased after cardiac death donors.

Thuillier R, Allain G, Celhay O, Hebrard W, Barrou B, Badet L, Leuvenink H, Hauet T.

J Surg Res. 2013 Oct;184(2):1174-81.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.JournalofSurgicalResearch.com

Benefits of active oxygenation during hypothermic machine perfusion of kidneys in a preclinical model of deceased after cardiac death donors

Raphaël Thuillier, PhD,^{a,b,c,d} Geraldine Allain, MD,^e Olivier Celhay, MD,^f
William Hebrard, MSc,^g Benoit Barrou, MD,^{a,b,d,h,i} Lionel Badet, MD,^{a,d,j,k,l}
Henri Leuvenink, PhD,^{d,m} and Thierry Hauet, MD, PhD^{a,b,c,d,g,*}

^aINSERM U1082, Poitiers, France^bUniversité Poitiers, Poitiers, France^cCHU Poitiers, Pole UBM, Service de Biochimie, Poitiers, France^dFLIRT: Fédération pour L'étude de l'Ischémie Reperfusion en Transplantation, Poitiers, France^eCHU Poitiers, Service de Chirurgie Cardio-Thoracique, Poitiers, France^fCHU Poitiers, Service d'Urologie, Poitiers, France^gGIS-IBISA, Domaine Expérimental du Magneraud, INRA, Surgères, France^hService d'Urologie et Transplantation, Hôpital Pitié Salpêtrière, Groupe Hospitalier Universitaire Est, Paris, FranceⁱUniversité Pierre et Marie Curie, Paris, France^jService d'Urologie et Chirurgie de la Transplantation, Pavillon V–Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France^kUniversité Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France^lRéseau CENTAURE, Nantes, France^mDepartment of Surgery, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2013

Received in revised form

23 April 2013

Accepted 26 April 2013

Available online 21 May 2013

Keywords:

Kidney transplantation

DCD

Machine perfusion

Oxygen

Marginal donors

Preclinical

ABSTRACT

Background: Deceased after cardiac death donors (DCDs) represent a valuable source of organs; however, preventing poor outcome is difficult, even with the use of machine perfusion (MP). It is of paramount importance to improve this method. We proposed to evaluate the benefits of active oxygenation during kidney graft hypothermic MP using a novel perfusion machine: Kidney Assist (KA).

Methods: We used a pig model of DCD transplantation in Large White pigs. Cold preservation was performed by conventional non-oxygenated MP (KA_{noO₂}) or oxygenated MP (KA).

Results: In the first 2 wk post-transplant, KA grafts displayed a lower serum creatinine peak and a faster return to normal levels compared with KA_{noO₂} animals, translating into a smaller area under the curve. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels and serum aspartate amino transferase levels were lower in KA animals compared with the non-oxygenated group. These correlated with better chronic function. Longer follow-up of the animals (3 mo) permitted evaluation of chronic outcome lesions. Interstitial fibrosis was reduced in the KA group, and these kidneys also displayed significantly lower levels of vimentin staining. Further histologic investigation also showed a trend toward decreased chronic inflammation in kidneys preserved with oxygen.

* Corresponding author. INSERM U 1082, CHU de Poitiers, Rue de la Milétrie, B.P. 577, 86021 Poitiers Cedex, France. Tel.: +33 5 49 44 46 70; fax: +33 5 49 44 38 34.

E-mail address: t.hauet@chu-poitiers.fr (T. Hauet).

0022-4804/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2013.04.071>

Conclusions: This new MP system is efficient in preserving DCD kidneys, greatly enhancing the capacity of the graft to withstand preservation stress and improving outcome. Oxygen delivery during preservation is thus valuable for highly damaged organs and offers an important therapeutic tool for transplant teams faced with decreased quality of donor organs.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Currently, kidney transplantation is the treatment of choice for patients with end-stage renal disease, with long-term benefits for patient survival and quality of life [1]. However, this therapy is now a victim of its own success, with an increasing shortage of organs: In 2010 in the United States, 15,429 kidney transplants were performed for 87,903 patients on the waiting list (OPTN, 2010). This leads to acceptance of donor organs of increased risks identified as marginal or extended criteria (ECD) donors: organs retrieved from donors presenting co-morbidity factors such as increased age, death from cardiovascular causes, cardiovascular risk factors, or a reduction in glomerular filtration [2]. These ECD donor organs tend to be more sensitive to the stresses of preservation [3]. Furthermore, there is renewed interest in deceased after cardiac death donors (DCDs) [4], which also display an increased rate of delayed graft function (DGF) and a higher incidence of primary nonfunction [5]. The increased proportion of these types of donors has led to rethinking of organ preservation methods.

Machine perfusion (MP) is based on the controlled circulation of a preservation solution. Machine perfusion improves the quality of kidneys in the clinic [6] and is particularly efficient in decreasing both primary nonfunction and DGF in ECD [7], as well as DGF in DCD transplantation [8]. These benefits are also fuelling debate about the cost-effectiveness of the method and the subgroups of patients on which to use it [9]. However, despite its significant efficiency in reducing DGF and increasing survival, complication rates remain high, warranting additional research to improve this method.

The principle of cold hypothermic preservation is based on temperature reduction to reduce metabolism and the requirement for oxygen. However, the need for oxygen persists because the metabolic rate remains at levels estimated around 10%; therefore hypoxia, remains a principal source of lesions induced in the context of preservation. Hence, the concept of supplying O₂ during storage is growing, with the development of different approaches, such as the two-layer method using perfluorocarbons [10] or the persufflation technique consisting of retrograde venous application of gaseous O₂ [11]. A recent review on the different strategies for oxygenated preservation [12] highlighted the potential benefits of these techniques, particularly the possible advantages of oxygenated MP, because MP would combine active circulation of dissolved oxygen with the perfusion fluid.

A portable device for oxygenated perfusion has been developed [13] and tested in a pig model of kidney auto-transplantation with a short follow-up (7 d). The results showed

that active oxygenation could improve preservation quality compared with static preservation. On the other hand, a study on the same model comparing oxygenated *versus* non-oxygenated perfusion failed to provide a clear distinction between the two preservation methods [14]. There is thus a need for an in-depth study of the impact of oxygenation on MP.

Here, we tested the same MP as previously described [13] using two different settings (perfusion with oxygen *versus* perfusion without oxygen) in a pig model of kidney auto-transplantation, reproducing conditions of DCD and permitting the study of ischemia-reperfusion injury without possible bias from the use of immune suppression, to determine the effect of oxygenation in hypothermic MP.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male pigs of the Large White lineage were bred onsite at the IBiSA Platform Experimental Surgery and Transplantation, located at the Institut National de la Recherche Agronomique campus of Le Magneraud (Surgères, France). Procedures were performed in accordance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture for the use and care of laboratory animals, as previously described. We selected 30- to 35-kg animals for this study.

2.2. Experimental design

We used the well-described porcine model of DCD auto-transplantation [15,16]. Briefly, we collected left kidneys after vascular clamping of the renal vessels for 60 min (warm ischemia). Then, we removed the organ and immediately cold-flushed it with preservation solution (KPS-1, Organ Recovery Systems, Brussels). Kidneys were preserved for 22 h at 4°C.

We studied two groups. The first was KAnO₂, preservation using MP in the Kidney Assist device (Organ Assist BV, Groningen, The Netherlands) without active oxygenation, at a constant pressure of 25 mm Hg (*n* = 4). The second was Kidney Assist (KA), renal perfusion with the Kidney Assist machine, with active oxygenation provided by 100% oxygen through a hollow fiber membrane oxygenator built in the sterile disposable tubing set [16], according to the manufacturer's recommendations (*n* = 4).

Afterward, we reimplanted the kidney and nephrectomized the contralateral kidney. In all cases, the duration of rewarming ischemia during implantation until the end of anastomosis was 30 ± 5 min.

2.3. Renal function evaluation

After transplantation, pigs were placed in metabolic cages for 24-h urine collection. Blood and urinary samples were collected. Plasma creatinine, aspartate amino transferase (ASAT), and proteinuria were measured with Modular automates (Roche Diagnostics, France).

We evaluated urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) levels using the BIOPORTO Elisa kit (Eurobio, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's recommendations.

2.4. Morphologic studies

We collected corticomedullary kidney samples at 3 mo and used a standard procedure to estimate the level of tubulointerstitial fibrosis using Picro-Sirius staining [17] on five to 10 fields ($\times 100$).

For immunohistochemistry, we used anti-Vimentin (Cell Marque, Rocklin, CA), anti- α -smooth muscle actin (α SMA) (DAKO, Trappes, France), anti-ED1 (Southernbiotech, Birmingham, AL), and anti-CD3 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) antibodies. We performed quantitative evaluation *in silico* on 10 high-powered fields ($\times 200$) per animal [18].

2.5. Statistical methods

Results are shown as means $\pm$ standard deviation. For the statistical analysis among groups, we used NCSS software (Statistical Solutions, Saugus, MA) to perform Student's *t*-test in case of normality (evaluated by the Skewness, Kurtosis, and Omnibus tests) and equality of variance (evaluated by Modified-Levene Equal-Variance Test) and the Mann-Whitney *U*-test in case these parameters were not met. Correlation analyses were performed with NCSS software using the Spearman rank test. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Perfusion parameters

We perfused kidneys for 22 h at a constant pressure (25 mm Hg) with or without oxygen. In each group, there was a slight increase in flow and lowering in resistance between the beginning and the end of preservation (Table). There was no statistical difference in terms of flow, resistance, or temperature between groups.

3.2. Recovery of function

The contralateral nephrectomy on the day of the transplant enabled us to use posttransplant serum creatinine levels to measure the ability of the graft to resume its function. During the first 2 wk (Fig. 1A), animals transplanted with a non-oxygenated kidney presented a peak of creatinine at day 3 that reached approximately 1200 μ mol/L and plateaued until day 5, and then decreased from day 7 on. Time to peak did not differ in the animal group transplanted with an oxygenated

Table – Perfusion parameters during preservation.

Group	Flow (mL/min)	Resistance (mm Hg/mL/min)	Temperature ($^{\circ}$ C)
KAnoO ₂			
Start	54.3 $\pm$ 9.3	0.48 $\pm$ 0.08	3.3 $\pm$ 0.6
End	65.5 $\pm$ 7.5	0.39 $\pm$ 0.04	3.0 $\pm$ 0.0
KA			
Start	54.3 $\pm$ 6.1	0.47 $\pm$ 0.05	3.5 $\pm$ 1.3
End	73.5 $\pm$ 9.0	0.34 $\pm$ 0.05	4.3 $\pm$ 1.9

kidney (3 d); however, the level of the peak was lower (approximately 800 μ mol/L) and the decrease started as early as day 5 ($P = 0.02$ for KAnoO₂), reaching consistently lower levels than KAnoO₂ animals on the next measurement times. This was also highlighted by the area under the curve comparison, with smaller areas found in the KA group ($P = 0.02$ for KAnoO₂).

To further assess acute kidney injury, we determined urinary levels of NGAL during the first week (Fig. 1B). The levels reached a similar peak at day 1, but in the KAnoO₂ group the NGAL levels slowly decreased whereas in the KA animals there was a swifter decrease, significantly inferior to KAnoO₂ as early as day 3 posttransplant.

We also performed serum analysis for markers of injury, measuring the activity of the ASAT in the first 3 d posttransplant (Fig. 1C). We observed that whereas the levels in the KAnoO₂ group increased rapidly posttransplant and peaked at day 2 at approximately 300 UI/L before recovery, KA group animals showed a more modest increase, peaking at 120 UI/L at day 2 ($P = 0.003$ for KAnoO₂).

3.3. Chronic function

To measure the effect of preservation quality on chronic graft outcome, we observed our animals for 3 mo. Measurement of serum creatinine at 3 mo follow-up indicated more complete recovery in the KA group, with levels approximating pre-transplant measurements, whereas the KAnoO₂ group displayed higher concentrations of serum creatinine ($P = 0.0001$ versus KA) (Fig. 2A). Concomitantly, KAnoO₂ animals at 3 mo showed increased proteinuria (approximately 0.35 g/24 h) (Fig. 2B), which was significantly higher than the levels recorded in the KA animals (approximately 0.2 g/24 h; $P = 0.007$ versus KAnoO₂), reaching levels of the native proteinuria in Large White pigs.

3.4. Histological analysis of chronic outcome

To determine the impact of the preservation method on chronic graft outcome at the tissue level, we evaluated fibrosis development through quantification of Sirius red staining on tissue sections collected at the end of the follow up (Fig. 2C). These analyses demonstrated an important development of interstitial fibrosis in the KAnoO₂ group (averaging 25% of the observed area), whereas animals transplanted with oxygenated kidneys showed reduced levels (averaging 10%; $P = 0.04$ for KAnoO₂).

To investigate the process further, we analyzed the expression level of epithelial to mesenchymal transition

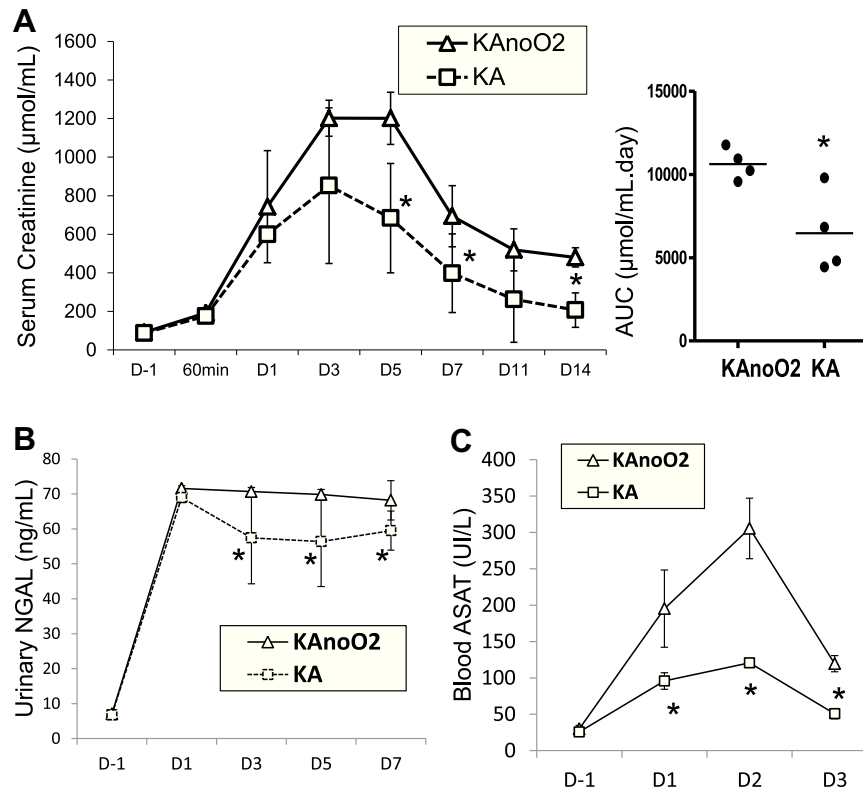


Fig. 1 – Function recovery post-transplantation. (A) Serum creatinine measurements during the first 2 wk post-transplant. Left: evolution of creatinine levels with time. Right: areas under the curve for the time period. (B) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels detected in urines collected during the first week post-transplant. (C) Aspartate amino transferase activity levels in the blood during the first 3 d post-transplant. Results are shown as means $\pm$ standard deviation. * $P < 0.05$ compared with KAno₂.

markers, typically associated with fibrosis development [19]. Quantification of vimentin staining (Fig. 2C) showed that similar to fibrosis results, there was increased staining in the KAno₂ group (averaging 24% of the observed area), whereas staining in the KA group remained low (9%; $P = 0.02$ for KAno₂). These results were confirmed by α SMA measurements, which also showed a trend toward larger stained areas in the KAno₂ group (14.2%) than in the KA group (8.8%) (Fig. 2C).

Because chronic fibrosis is often linked with increased inflammation [20–23], we quantified the degree of inflammatory cell invasion within the tissue, using ED1+ staining for macrophages and monocytes as a marker of innate inflammation, and CD3+ staining for T lymphocytes as a marker of adaptive immunity (Supplementary Table 1). These quantifications showed that an elevated number of these invading cells were present in the KAno₂ group, whereas there was a trend for reduced levels in the KA group, particularly regarding CD3+ cells; however, the trend did not reach statistical significance.

3.5. Correlation analysis between ischemia-reperfusion injury markers and functional parameters

To assess the level of correlation between the intensity of ischemia-reperfusion injury withstood by the kidney and its

functional outcome, we used Spearman's rank test to measure the degree of association between both NGAL and ASAT levels and serum creatinine levels at 14 d and 3 mo (Fig. 3). We demonstrated that NGAL levels in the urine at day 5 was highly correlated with both acute and chronic outcomes, with ranks of 0.83 each ($P = 0.01$), and that early serum analysis, measuring ASAT levels as early as day 1, was also highly correlated with acute (rank of 0.9; $P = 0.002$) as well as chronic (rank of 0.98; $P = 0.0001$) outcomes. These indicate that the level of injury in the preserved organ and, by extension, the adequacy of the preservation strategy, is intimately correlated with outcome, both acute and chronic.

4. Discussion

In this study, we evaluated the benefits of active oxygenation during MP of DCD kidney grafts using a new perfusion machine designed to permit oxygenation without impeding the transportability of the device. Previous studies with this machine [13] showed superiority of the device over standard static storage in University of Wisconsin solution, and furthermore demonstrated that a perfusion pressure of 30/20 mm Hg provided a better degree of protection compared with a higher pressure of 60/40 mm Hg. We thus used the lower pressure setting for the present work, and compared

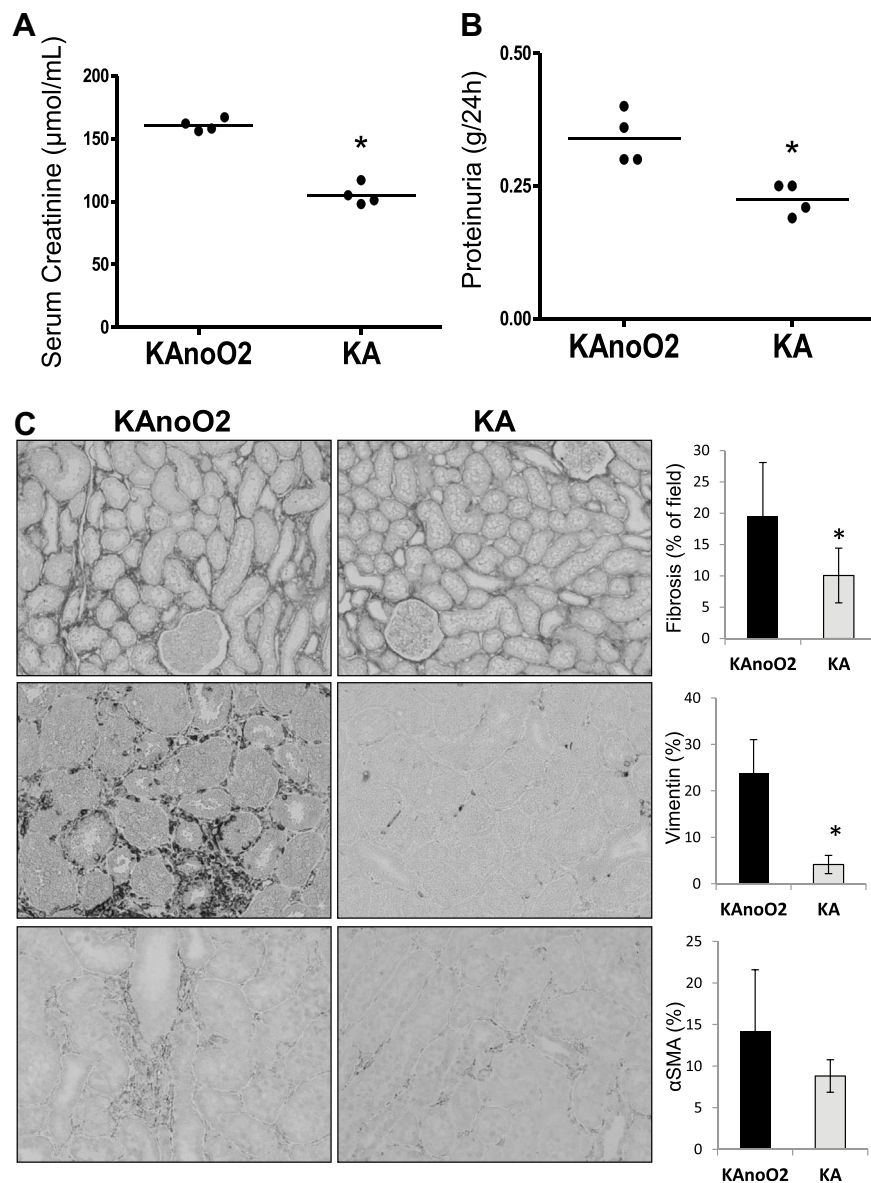


Fig. 2 – Graft chronic outcome. Typical functional and histologic end points were recorded at 3 mo post-transplant. (A) Serum creatinine. (B) Proteinuria. (C) Chronic kidney fibrosis and epithelial to mesenchymal transition markers. Left: representative staining obtained in each group: line 1: Sirius Red (magnification, $\times 100$); line 2: vimentin (magnification, $\times 200$); line 3: αSMA (magnification, $\times 200$). Right: *In silico* quantification of staining in 10 representative fields for each animal. Results are shown as means $\pm$ standard deviation. * $P < 0.05$ compared with KAnoO₂.

oxygenation versus non-oxygenation in a pig model of DCD donor, in surgical conditions close to that of the clinic, allowing for a high degree of translatability for our results. In this auto-transplantation setting, without the confounding bias from the use of immunosuppressors [24], we can accurately measure the effect of preservation conditions [22]. In the present study, the only parameter varying between groups was the oxygen content of the solution, because both the machine and the preservation solution used were identical.

In terms of early outcome, we observed the benefits of oxygen as early as day 3; animals transplanted with oxygenated kidneys showed lower serum creatinine peak, and furthermore displayed a swifter return to normal creatinine

levels. In the non-oxygenated group, the peak was higher and the subsequent decrease started later and was slow, never reaching pre-transplant levels.

Furthermore, we measured the presence of NGAL in the urine of transplanted animals during the first week after transplantation. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is expressed in epithelial cells of the kidney tubules [25], and its presence in the urine is likely related to the level of cellular destruction taking place at reperfusion, which makes it a valuable marker in the diagnosis of acute kidney injury [16,26]. We determined that in both animal groups, the levels of urinary NGAL increased dramatically 1 d post-transplant, consistent with the washout of cellular debris as animals recovered

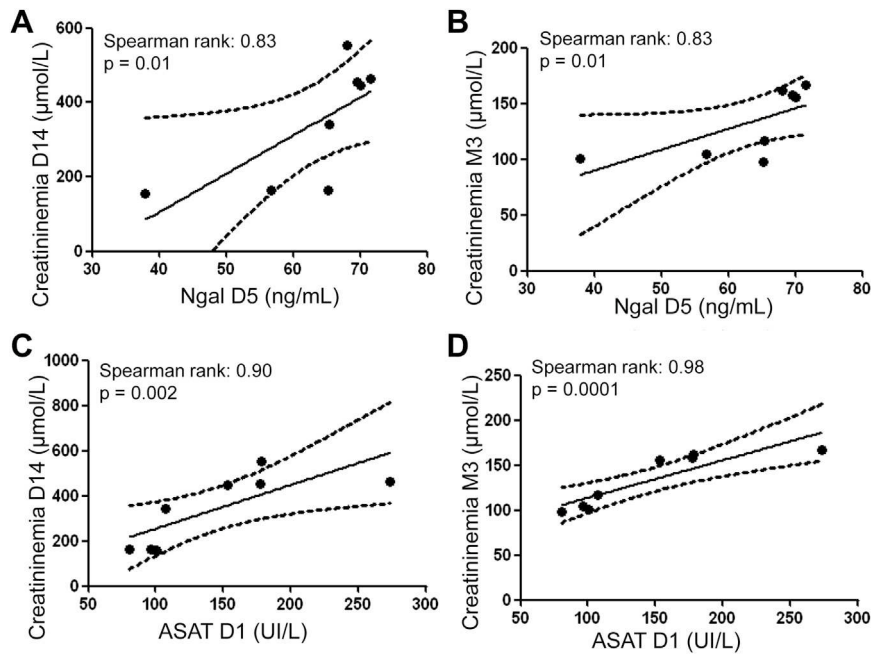


Fig. 3 – Correlation analysis between acute kidney injury markers and outcome. Correlation analysis was performed with NCSS software. Spearman's rank and P value are provided for each test. Urinary NGAL (A and B) as well as blood ASAT (C and D) levels were correlated with serum creatinine levels recorded at day 14 (A and C) and 3 mo (B and D).

dieresis. However, KA animals showed reduced levels of NGAL faster than in the KAnO₂ group, which suggests a lower level of injury withstood during MP with oxygen.

Furthermore, because urine production is not a discriminating marker with regard to graft quality evaluation, we investigated the potential for another marker of injury in the blood. Hence, we measured serum ASAT levels, an enzyme generally used to estimate liver function, but also expressed in kidney cells. Its increased presence in the blood is a marker of kidney injury. Indeed, in our hands, we observed an important increase in circulating ASAT in animals after reperfusion and for the first few days post-transplant. Interestingly, we noted lower levels of ASAT in the blood of animals transplanted with kidneys preserved with oxygen.

These results indicate a better preservation quality with active oxygenation, allowing the kidneys to better withstand the stresses of preservation and recover faster from ischemia-reperfusion injury and resume an appropriate level of function.

In our hands, the pig autotransplantation model showed a high degree of correlation between preservation quality and chronic outcome [27]. To evaluate whether active oxygenation during preservation could have long-lasting consequences for kidney grafts, we investigated the histologic features of the kidneys at the end of the follow-up (3 mo).

We first measured the extent of interstitial fibrosis, the unavoidable feature of chronic graft loss [28]. Using anatomic-pathologic techniques similar to those of the clinic, we showed a significant reduction in the extent of fibrosis in kidneys preserved by oxygenated MP compared with kidneys preserved without oxygen. This demonstrates that oxygenation during preservation prevents the development of tissue fibrosis in our model.

In an attempt to further understand the protective effect of oxygen, we investigated markers for chronic damage mechanisms linked to the development of fibrosis: epithelial to mesenchymal transition and chronic inflammation.

Epithelial to mesenchymal transition regroups the series of steps leading epithelial cells to differentiate toward mesenchymal cell phenotypes, in which they lose their polarized, anchored, and quiescent features cell for an unpolarized, mobile, and fast-proliferating phenotype, intended to repopulate an injury tubule. If deregulated, for instance in the context of chronic graft injury, this process is believed to lead to the differentiation of fibroblasts and promote fibrosis [19]. In the present study, we investigated the expression at the tissue level of two typical markers of EMT: vimentin, a structural component of intermediate filaments in mesenchymal cells cytoskeleton, and α SMA, element of the mesenchymal actin skeleton. Using immunohistochemistry, we detected a high amount of vimentin staining in the kidneys preserved without oxygenation, whereas levels in oxygenated kidneys were significantly reduced; further analysis revealed a similar trend in α SMA staining. These results indicate that the EMT process started in both groups; however, it was more advanced in animals transplanted with a kidney preserved without oxygen, a sign of inferior preservation quality.

We then investigated the extent of chronic inflammation in these grafts, a process well correlated with fibrosis and chronic graft loss. Quantification of invading cells, of both the innate and adaptive immunity subfamilies, revealed no statistical differences between groups. However, there was a trend toward a lower degree of adaptive inflammation in the kidneys preserved with oxygen, which is in accordance with the other results of this study.

Previous studies on the benefits of MP in our model of DCD transplantation showed that it was difficult to obtain discriminating data when attempting to measure the benefits of MP improvement through optimization of the solution [18,29]. However, in this study, we demonstrated a notable improvement with the addition of oxygen, highlighted by improvement of classical end points such as serum creatinine and histopathologic measurement, and also by early markers of injury such as urinary NGAL and serum levels of ASAT. Interestingly, correlation analysis between these later markers and serum creatinine at both 14 d and 3 mo post-transplant show a high Spearman rank. This highlights the value of measuring early markers of injury for the accurate evaluation of organ quality, and furthermore confirms the critical role of ischemia-reperfusion injury in determining the fate of the organ, in terms of both acute and chronic outcomes.

These results are at odds with a previous study on oxygenated MP [14] in which the results did not discriminate between the groups as clearly as in the present study. However, that earlier study used porcine kidney auto-transplantation in which the kidney was not subjected to warm ischemia, a setting in which cold storage induces only a limited amount of injury that could easily be reduced by MP alone, and not profit from the addition of oxygen. Considering the already beneficial effects of MP over cold storage, it is possible that demonstration of further improvement of MP by oxygenation can be done only in a model with a high level of injury, such as the one used here. We use 60 min warm ischemia in this study to mimic as closely as possible the conditions of DCD classes I and II according to the Maastricht classification. As opposed to class III, the controlled DCD found in most current MP trials, classes I and II are subjected to extended warm ischemia time. Because these donors represent a possible 40% increase in the donor pool, we focused our efforts in defining the best possible mean of organ preservation in this particular setting.

Furthermore, the addition of a period of warm ischemia before MP induces severe hypoxia in the organ, which may not have been encountered in the model used by Gallinat et al. [14], in which the kidney was set on the machine immediately after collection, and thus was submitted to only a mild degree of hypoxia. In this instance, oxygenated MP could be of particular value for organs from DCD, which are subjected to such a period of severe warm hypoxia.

More studies are needed to determine which of these possibilities is the most accurate: for instance, using conditions mimicking marginal donors, in which kidneys show a high degree of lesion but remain oxygenated.

In conclusion, organ preservation remains an open area of research, because little is known about the mechanisms taking place during the period of transport that is unavoidable in most transplant settings. It has become increasingly clear that metabolic reactions take place and that they need oxygen to function properly, because without it the organ will fail poorly. Previous work from our team showed similar results when delivering oxygen during static storage, using a dedicated carrier [30]. Other studies of oxygen during preservation also showed improved organ quality, notably through increased production of adenosine triphosphate during the

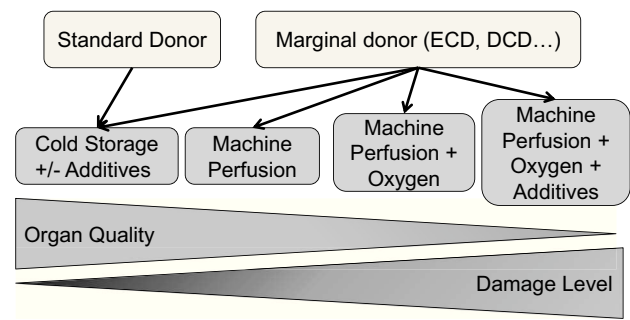


Fig. 4 – Decisional diagram for adaptation of preservation conditions to donor organ quality.

hypothermic phase [12]. Although it is likely that a similar mechanism took place during our study, we could not verify it. Such analyses were not compatible with our setting, because iterated tissue sample collection during MP would alter the perfusion conditions. Moreover, we voluntarily limited the scope of this study to obtain proof of concept, a required element in the setting of extended large animal studies. There is a strong need for further investigation into the intricacies of hypothermic preservation and oxygen use, which would lead to the development of new tools to improve preservation quality, and thus permit the use of more marginal organs.

In the present study, we determined in a preclinical model of DCD kidney transplantation, allowing for a high degree of translatability to the clinic, the benefits of active oxygenation during hypothermic MP. Kidneys provided with oxygen during preservation will display the signs of higher quality, resume function faster in the first 2 weeks with lower serum creatinine peaks, and return to levels close to pre-transplant. Furthermore, in terms of outcome, the typical lesions of chronic graft loss are reduced, which confirms better preservation of the tissue and improved ability to recover from the damage of ischemia-reperfusion. Oxygen delivery during preservation thus appears to be valuable for highly damaged organs and offers an important therapeutic tool for transplant teams faced with decreased quality of donor organs. The combined development of more accurate tools to measure graft quality early and advances in organ storage strategies such as the use of additives and active oxygenation could lead to customization of graft storage, providing the most adaptive conditions depending on the need of the organ, as proposed in Figure 4.

Acknowledgment

This study was supported by Conseil Général de la Vienne, Région Poitou Charentes, the Banque Tarneaud, Poitiers, CHU de Poitiers and INERM, the Société Francophone de Transplantation, the French Foundation of Transplantation, and the Agence de Biomédecine. The authors thank Organ Assist (Groningen, The Netherlands) for providing the Kidney Assist device and disposables; and in particular, Martin Kuizenga

and Dr Arjan van der Plaats for technical assistance and support during the study.

Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2013.04.071>

REFERENCES

- [1] Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999;341:1725.
- [2] UNOS Annual report of the US Scientific Registry of Transplants Recipients and the Organ Procurement and Transplantation. Richmond, VA: United Network for Organ Sharing; 2004.
- [3] Johnston TD, Thacker LR, Jeon H, Lucas BA, Ranjan D. Sensitivity of expanded-criteria donor kidneys to cold ischaemia time. *Clin Transplant* 2004;18(Suppl 12):28.
- [4] Cecka JM. Donors without a heartbeat. *N Engl J Med* 2002;347:281.
- [5] Wight J, Chilcott J, Holmes M, Brewer N. The clinical and cost-effectiveness of pulsatile machine perfusion versus cold storage of kidneys for transplantation retrieved from heart-beating and non-heart-beating donors. *Health Technol Assess* 2003;7:1.
- [6] Moers C, Smits JM, Maathuis MH, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med* 2009;360:7.
- [7] Treckmann J, Moers C, Smits JM, et al. Machine perfusion versus cold storage for preservation of kidneys from expanded criteria donors after brain death. *Transpl Int* 2011;24:548.
- [8] 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* 2010;252:756.
- [9] Garfield SS, Evans RW. Machine perfusion cost-effectiveness versus cold storage has been demonstrated; limiting use to marginal donor kidneys unjustified. *Transpl Int* 2010;23:e67.
- [10] Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation* 2007;83:1289.
- [11] Suszynski TM, Rizzari MD, Scott WE III, Tempelman LA, Taylor MJ, Papas KK. Persufflation (or gaseous oxygen perfusion) as a method of organ preservation. *Cryobiology* 2012;64:125.
- [12] Hosgood SA, Nicholson HF, Nicholson ML. Oxygenated kidney preservation techniques. *Transplantation* 2012;93:455.
- [13] Maathuis MH, Manekeller S, van der Plaats A, et al. Improved kidney graft function after preservation using a novel hypothermic machine perfusion device. *Ann Surg* 2007;246:982. discussion 989.
- [14] Gallinat A, Paul A, Efferz P, et al. Role of oxygenation in hypothermic machine perfusion of kidneys from heart beating donors. *Transplantation* 2012;94:809.
- [15] 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.
- [16] Jochmans I, Lerut E, van Pelt J, Monbaliu D, Pirenne J. Circulating AST, H-FABP, and NGAL are early and accurate biomarkers of graft injury and dysfunction in a preclinical model of kidney transplantation. *Ann Surg* 2011;254:784. discussion 791.
- [17] 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.
- [18] Thuillier R, Codas R, Marchand E, et al. Chronic renoprotective effect of pulsatile perfusion machine RM3 and IGL-1 solution in a preclinical kidney transplantation model. *J Transl Med* 2012;10:233.
- [19] Bedi S, Vidyasagar A, Djamali A. Epithelial-to-mesenchymal transition and chronic allograft tubulointerstitial fibrosis. *Transplant Rev* 2008;22:1.
- [20] Ferenbach D, Kluth DC, Hughes J. Inflammatory cells in renal injury and repair. *Semin Nephrol* 2007;27:250.
- [21] Fletcher JT, Nankivell BJ, Alexander SI. Chronic allograft nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2009;24:1465.
- [22] Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006;81:643.
- [23] Thuillier R, Mannon RB. The immunology of chronic allograft injury. In: Ahsan N, editor. *Chronic allograft failure: natural history, pathogenesis, diagnosis and management*. Austin, TX: Landes Bioscience; 2007.
- [24] 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.
- [25] Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 1997;45:17.
- [26] Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2009;54:1012.
- [27] Desurmont T, Giraud S, Cau J, et al. Trophic factor and FR167653 supplementation during cold storage rescue chronic renal injury. *J Urol* 2011;185:1139.
- [28] El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transpl* 2009;9:527.
- [29] Codas R, Thuillier R, Hauet T, Badet L. Renoprotective effect of pulsatile perfusion machine RM3: pathophysiological and kidney injury biomarker characterization in a preclinical model of autotransplanted pig. *BJU Int* 2012;109:141.
- [30] Thuillier R, Dutheil D, Trieu MT, et al. Supplementation with a new therapeutic oxygen carrier reduces chronic fibrosis and organ dysfunction in kidney static preservation. *Am J Transpl* 2011;11:1845.

2.1. Introduction

L'extension du nombre de greffons à ceux issus des donneurs à critères élargis et des DDAC a fait repenser les méthodes de préservation afin d'optimiser l'utilisation de ces organes particulièrement fragiles. Les MPH qui permettent la circulation d'une solution de préservation dans le greffon, ont montré des bénéfices cliniques avec une diminution des taux de NFP et de RRF chez les donneurs marginaux et de RRF chez les DDAC. Ces bénéfices sont à mettre en balance avec le coût du matériel. Il est donc important de déterminer chez quel patient son utilisation est la plus bénéfique. Il existe par ailleurs un certain nombre de complications lors de la perfusion en machine nécessitant d'autant plus de justifier son utilisation.

L'utilisation d'une solution de préservation hypothermique permet la réduction du métabolisme de l'organe et son besoin en oxygène. La persistance d'un métabolisme résiduel d'environ 10% entraîne néanmoins une hypoxie, source importante de lésions du greffon au cours de la préservation. Les techniques de supplémentation en oxygène, telles que l'utilisation des perfluorocarbones ou la persufflation, se sont ainsi développées. Des travaux récents ont suggéré l'intérêt d'une préservation en présence d'oxygène et particulièrement lors de la préservation en machine de perfusion. D'autres études précliniques utilisant la Kidney Assist (Organ Assist BV, Groningen, Pays-Bas) n'ont pas permis de répondre clairement quant à l'intérêt de cette technique.

L'objectif de ce travail était donc d'étudier l'intérêt de l'oxygénation de la solution de préservation en utilisant la Kidney Assist et un modèle porcin d'auto-transplantation rénale mimant les conditions de DDAC.

2.2. Matériel et méthode (synthèse)

Le protocole a été mené en respectant la réglementation du Ministère de l'Agriculture, de l'Institut National pour la Recherche Agronomique et du comité régional d'éthique sur l'expérimentation animale.

Les animaux utilisés étaient des porcs Large White mâles, âgés de 3 mois et pesant 30 à 35kg. Le modèle d'auto-transplantation rénale a été largement éprouvé au sein du laboratoire. Le rein gauche était explanté après 60 minutes d'ischémie chaude suite au clampage du pédicule vasculaire rénal. Il était immédiatement lavé par une solution hypothermique de KPS-1 puis préservé 22 heures en machine Kidney Assist. Deux groupes ont été étudiés : préservation avec oxygène et préservation sans oxygène. Chaque groupe était composé de 4 animaux (n=4). A l'issue de cette préservation, le rein était réimplanté chez l'animal donneur après néphrectomie controlatérale, selon un protocole standardisé. Le suivi était de 3 mois.

2.3. Résultats

2.3.1. Paramètres de perfusion

L'étude des paramètres de perfusion en machine (débit de perfusion, résistance et température) n'a pas mis en évidence de différence significative entre les deux groupes.

2.3.2. Reprise de fonction

Au cours des deux premières semaines suivant la greffe, le groupe sans oxygène présente un pic de créatininémie à J3 (autour de 1200 μ mol/L) suivi d'un plateau jusqu'à J5 avant d'amorcer sa décroissance à J7. Le même pic de créatininémie est retrouvé à J3 pour le groupe avec oxygène mais avec une concentration plus faible (autour de 800 μ mol/L) et une décroissance plus précoce à J5. L'aire sous la courbe était statistiquement plus petite pour le groupe avec oxygène.

L'étude de la concentration urinaire de NGAL au cours de la première semaine retrouve dans les deux groupes un pic à J1. Il existe un plateau dans le groupe sans oxygène alors que le groupe avec oxygène présente une décroissance significative dès J3.

L'étude de la concentration plasmatique d'ASAT au cours des 3 jours post-greffe montre un pic à J2 (autour de 300UI/L) puis une décroissance dès J3 pour le groupe sans oxygène. Le pic à J2 est plus faible pour le groupe avec oxygène (120UI/L).

2.3.3. Fonction à long terme

A 3 mois post-transplantation, la créatininémie est statistiquement plus faible dans le groupe avec oxygène et plus proche des valeurs physiologiques. La protéinurie est également significativement plus faible et plus physiologique pour le groupe avec oxygène.

2.3.4. Analyses histologiques à 3 mois

On retrouve significativement moins de fibrose au niveau des reins préservés avec oxygène (environ 10%) que sur les reins préservés sans oxygène (25%).

Les marqueurs de la TEM, classiquement associés aux lésions de fibrose, ont été analysés. La quantification du marquage de la vimentine est superposable à celle de la fibrose (24% pour le groupe sans oxygène contre 9% pour le groupe avec oxygène, différence significative) tout comme celle de l'*α-smooth muscle actin* (α -SMA) dans de moindre proportion (14,2% pour le groupe sans oxygène contre 8,8% pour le groupe avec oxygène, résultat non significatif).

La fibrose étant souvent associée à l'inflammation, nous avons étudié le niveau d'infiltration des cellules inflammatoires au sein du tissu rénal avec les monocytes-macrophages comme marqueurs de l'immunité innée et les lymphocytes T comme marqueurs de l'immunité adaptative. Il existe ainsi une infiltration plus importante dans le groupe sans oxygène mais cette tendance n'est pas significative.

2.3.5. Etude de la corrélation entre les marqueurs de lésions d'IR et les paramètres fonctionnels

Nous avons constaté que la concentration de NGAL dans les urines à J5 post-greffe était statistiquement corrélée au devenir précoce et à distance du greffon, tout comme la concentration précoce d'ASAT à J1. Ces données confirment que la sévérité des lésions d'IR et la qualité de la préservation sont intimement corrélées au devenir du greffon.

2.4. Discussion

Dans ce travail, nous avons étudié le bénéfice de l'apport d'oxygène sur le greffon rénal issu de DDAC conservé en MPH Kidney Assist. Des études préalables ont montré un bénéfice de son utilisation par rapport à la conservation statique avec la solution UW, d'autant plus que la pression de perfusion était de 20 à 30mmHg. Nous avons donc appliqué ce régime de pression, avec ou sans oxygène, sur un modèle porcin d'autogreffe. Ainsi, nous nous affranchissions du biais induit par l'utilisation des immunosuppresseurs et la seule variable était l'utilisation ou non de l'oxygène. Ce modèle porcin mime les conditions cliniques de DDAC de façon moins proche que les modèles de CRN ou de RIS présentés préalablement. Il se limite en effet à une ischémie chaude de 60 minutes par clampage du pédicule vasculaire rénal. Ce modèle permet néanmoins l'étude des conditions d'intérêt en limitant le nombre d'animaux, ce qui se justifie sur les plans éthique et économique.

Concernant les suites précoces, les bénéfices de l'oxygénation s'observent dès le troisième jour post-transplantation avec un pic de créatininémie plus bas et un retour plus rapide aux taux physiologiques. Dans le groupe sans oxygène, la créatininémie ne retrouvait jamais son niveau de base.

Par ailleurs, la concentration urinaire de NGAL a été mesurée au cours de la première semaine. NGAL est exprimé par les cellules épithéliales des tubules rénaux et sa présence

dans les urines est corrélée au niveau de lyse cellulaire au moment de la reperfusion. Il s'agit ainsi d'un marqueur d'intérêt dans le diagnostic des lésions rénales aiguës. Nous avons constaté une augmentation rapide du taux urinaire de NGAL à J1 dans les deux groupes, témoignant d'un *wash out* des débris cellulaires à la reprise de diurèse. Le groupe avec oxygène a cependant plus rapidement normalisé sa concentration de NGAL, du fait probablement d'un niveau lésionnel plus faible.

Pour évaluer la qualité du greffon rénal, nous avons étudié la concentration plasmatique d'ASAT, enzyme habituellement dosée dans le cadre de l'évaluation de la fonction hépatique mais également produite par les cellules rénales et dont l'augmentation traduit une souffrance rénale. Dans nos conditions expérimentales, la concentration d'ASAT circulant était augmentée après la reperfusion et au cours des premiers jours suivant la greffe. Cette concentration était néanmoins plus basse dans le groupe avec oxygène.

Ces résultats sont en faveur d'une meilleure préservation avec oxygénation.

Il existe une forte corrélation entre la qualité de préservation et le devenir à long terme du greffon. Le suivi de 3 mois avec analyse histologique est intéressant dans ce contexte. Le pourcentage de fibrose était plus faible chez les reins conservés avec oxygène. L'oxygénation au cours de la préservation prévient donc le développement des lésions de fibrose. Pour comprendre cet effet protecteur, nous avons étudié les marqueurs de la TEM et de l'inflammation chronique, phénomènes en lien avec le développement de la fibrose.

La TEM est un processus au cours duquel la cellule épithéliale va se différencier en cellule mésenchymateuse et perdre ainsi ses caractéristiques (polarité, ancrage) pour devenir une cellule proliférant rapidement et tentant de réparer les lésions tubulaires. Au cours des lésions chroniques du greffon, ce processus est dérégulé et conduit à la production de fibroblastes et à la génération de fibrose. La vimentine et l' α -SMA sont des marqueurs classiques de la TEM. En immunohistochimie, une quantité plus importante de vimentine a été détectée chez les

reins préservés sans oxygène. Cette même tendance s'observe pour la quantité d' α -SMA. Ces résultats indiquent que le processus de TEM est amorcé dans les deux groupes mais de façon moins importante dans le groupe avec oxygène traduisant une meilleure préservation.

L'étude de l'inflammation chronique ne retrouve pas de différence significative entre les groupes. Il existe cependant une tendance à une infiltration tissulaire moins importante par les cellules de l'immunité adaptative dans le groupe avec oxygène.

L'addition d'oxygène en machine de perfusion apporte donc un bénéfice incontestable, mesurable sur les paramètres classiques que sont la créatininémie et les lésions histologiques et également sur les concentrations urinaires de NGAL et plasmatiques d'ASAT, avec une excellente corrélation. Cela souligne l'intérêt de la mesure précoce de ces marqueurs dans l'évaluation de la qualité du greffon et le rôle indiscutable des lésions d'IR dans son devenir à court et long termes.

Une étude préalable n'a pas montré de clair bénéfice à l'utilisation de la machine de perfusion avec oxygénation. Dans ce protocole les reins ne subissaient pas d'ischémie chaude. On peut donc supposer que les lésions induites étaient facilement corrigées par la conservation dynamique seule et que les greffons ne profitaient pas de l'addition d'oxygène. Des lésions plus importantes sont nécessaires pour que les résultats soient discriminants, ce pourquoi nous avons mimé les conditions de DDAC avec ischémie prolongée. C'est donc pour cette catégorie de donneurs que l'utilisation de la machine de perfusion avec oxygénation semble bénéfique et légitime aux vus des coûts engendrés.

La période de conservation *ex vivo* est une étape incontournable dans le processus de transplantation des reins issus des donneurs décédés. Si une grande partie des phénomènes se déroulant au cours de cette phase de préservation reste inconnue, il apparaît clairement que des réactions métaboliques se poursuivent, requérant de l'oxygène. La nécessité de compléter les solutions de préservation avec de l'oxygène semble ainsi évidente. Des

études préalables ont montré un bénéfice à l'addition d'un transporteur d'oxygène en préservation statique et notamment par l'augmentation de la production d'ATP. Cela est probablement également le cas dans notre étude. Nous n'avons cependant pas pu le prouver, le prélèvement itératif d'échantillons tissulaires au cours de la préservation en machine pouvant altérer les conditions de perfusion. Un large champ d'investigation sur la conservation hypothermique et l'utilisation d'oxygène reste ainsi à explorer afin d'élargir l'utilisation des greffons issus des donneurs marginaux.

2.5. Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré le bénéfice de l'apport d'oxygène durant la préservation en MPH sur un modèle porcin d'auto-transplantation rénale mimant les conditions de DDAC. Ce modèle préclinique permet une translation rapide des résultats chez l'homme. Les greffons préservés avec oxygène sont de meilleure qualité avec une meilleure reprise de fonction précoce et des lésions chroniques de fibrose réduites. L'oxygénation active au cours de la conservation dynamique serait ainsi une thérapie supplémentaire afin d'améliorer la qualité des greffons issus des donneurs marginaux. Le développement d'outils complémentaires de qualification et d'amélioration des greffons pourrait permettre de personnaliser la conservation du greffon en fonction de la sévérité de ses lésions.

3. Intérêt de la curcumine en préservation statique

Cyclodextrin curcumin formulation improves outcome in a preclinical pig model
of marginal kidney transplantation.

Thuillier R, Allain G, Giraud S, Saintyves T, Delpech PO, Couturier P,

Billault C, Marchand E, Vaahtera L, Parkkinen J, Hauet T.

Am J Transplant. 2014 May;14(5):1073-83.

Cyclodextrin Curcumin Formulation Improves Outcome in a Preclinical Pig Model of Marginal Kidney Transplantation

R. Thuillier^{1,2,3,4}, G. Allain^{1,5}, S. Giraud^{1,2,3},
T. SaintYves^{1,6}, P. O. Delpéch^{1,7}, P. Couturier^{2,8},
C. Billault⁹, E. Marchand¹⁰, L. Vaahtera¹¹,
J. Parkkinen^{11,12} and T. Hauet^{1,2,3,4,8,*}

¹Inserm U1082, Faculté de Médecine et Pharmacie,
Université de Poitiers, Poitiers, France

²Département de Biochimie, CHU de Poitiers, Poitiers,
France

³FLIRT: Fédération pour L'étude de l'Ischémie
Reperfusion en Transplantation, Poitiers, France

⁴COPE: Consortium for Organ Preservation in Europe

⁵Service de Chirurgie Cardio-Thoracique, CHU de Poitiers,
Poitiers, France

⁶Service d'Urologie, CH Angoulême, Angoulême, France

⁷Service d'Urologie, CHU de Poitiers, Poitiers, France

⁸INRA, Plate-forme IBiSA, Unité de Transplantation
Expérimentale, GEPA, Département de Génétique
Animale, Domaine du Magneraud, Surgères, France

⁹Service d'Urologie et Transplantation, Hôpital Pitié
Salpêtrière, Groupe Hospitalier Universitaire Est, Paris,
France

¹⁰Service de Chirurgie Vasculaire, CHU Tours, Tours,
France

¹¹Institute of Clinical Medicine, University of Helsinki,
Helsinki, Finland

¹²Novobion, Espoo, Finland

*Corresponding author: Thierry Hauet,
t.hauet@chu-poitiers.fr

Decreasing organ quality is prompting research toward new methods to alleviate ischemia reperfusion injury (IRI). Oxidative stress and nuclear factor kappa beta (NF- κ B) activation are well-described elements of IRI. We added cyclodextrin-complexed curcumin (CDC), a potent antioxidant and NF- κ B inhibitor, to University of Wisconsin (UW) solution (Belzer's Solution, ViaSpan), one of the most effective clinically approved preservative solutions. The effects of CDC were evaluated on pig endothelial cells and in an autologous donation after circulatory death (DCD) kidney transplantation model in large white pigs. CDC allowed rapid and lasting uptake of curcumin into cells. *In vitro*, CDC decreased mitochondrial loss of function, improved viability and lowered endothelial activation. *In vivo*, CDC improved function recovery, lowered histological injury and doubled animal survival (83.3% vs. 41.7%). At 3 months, immunohistochemical staining for epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and

fibrosis markers was intense in UW grafts while it remained limited in the UW + CDC group. Transcriptional analysis showed that CDC treatment protected against up-regulation of several pathophysiological pathways leading to inflammation, EMT and fibrosis. Thus, use of CDC in a preclinical transplantation model with stringent IRI rescued kidney grafts from an unfavorable prognosis. As curcumin has proved well tolerated and nontoxic, this strategy shows promise for translation to the clinic.

Keywords: Antioxidants, graft outcome, ischemia reperfusion injury, kidney transplantation, preservation

Abbreviations: α SMA, α -smooth muscle actin; AUC, area under the curve; CDC, cyclodextrin-complexed curcumin; DCD, donation after circulatory death; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; HBSS, Hank's Balanced Salt Solution; IFTA, interstitial fibrosis and tubular atrophy; IL-1Rn, interleukin-1 receptor agonist; IRI, ischemia reperfusion injury; LDH, lactate dehydrogenase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NF- κ B, nuclear factor kappa beta; RTqPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; TLR4, Toll-like receptor 4; TNF, tumor necrosis factor; UW, University of Wisconsin; WI, warm ischemia

Received 01 August 2013, revised 27 December 2013
and accepted for publication 29 December 2013

Introduction

Kidney transplantation is the recommended therapy for end-stage renal diseases. However, delayed graft function and late allograft deterioration rates remain high (1), particularly with marginal donor organs. These are particularly sensitive to ischemia reperfusion injury (IRI) (2), well defined as having a dramatic impact on short- (3–6) and long-term (7–9) outcome. Our own work with large white pig kidney autotransplantation models showed that chronic fibrosis and subsequent renal failure were dependent on the severity of IRI (10,11). There is thus a need for novel therapies against IRI.

The components of IRI are yet to be fully understood. Reactive oxygen species play a central role (12). Sterile inflammation takes place (13) where the innate immune

response induction leads to adaptive immune system activation (14,15). IRI also negatively impacts capillary density (16) and increases vascular permeability, encouraging the no reflow phenomenon (17,18).

We investigated the potential benefits of curcumin against IRI. Curcumin displays biological activities relevant to the prevention of IRI (19): first, a strong antioxidant activity and scavenging of reactive oxygen and nitrogen species (20); second, inhibition of nuclear factor kappa beta (NF- κ B) activation (21), a major signal transduction pathway involved in acute and chronic inflammation (22); and third, inhibition of other important signaling cascades regulating the inflammatory response, including the phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and signal transducers and activators of transcription (23). Curcumin displayed anti-IRI renoprotective properties in experimental models (24–26) and in glomerulonephritis (27) and nephron mass reduction models (28).

As with many antioxidants, use of curcumin is impaired by its hydrophobic properties. Strategies exist to circumvent this issue, such as liposome encapsulation (29). Herein, we used curcumin complexed with a cyclodextrin (cyclodextrin-complexed curcumin [CDC] formulation), allowing its use in aqueous solutions. This formulation was studied for cellular uptake and suppression of tumor necrosis factor (TNF)-induced NF- κ B activity, and was proven more protective than free curcumin in an organic solvent (30). The cyclodextrin carrier alone did not have any effect in these models.

Herein, we evaluated the potential benefits of CDC in organ preservation following a step-wise approach: (i) to confirm cellular uptake of curcumin from CDC and determine the most efficient dose; (ii) to evaluate the effect of CDC against *in vitro* IRI on endothelial cells; (iii) to measure the uptake of curcumin in pig kidneys preserved in University of Wisconsin (UW) solution; and (iv) to determine the impact of the CDC formulation in a kidney autotransplantation model in pigs. The pig is a particularly interesting animal as its kidney is multilobular and multipapillar (31,32), with a complex network of blood vessels suggesting increased sensibility to IRI, also found in humans but not in mice, rats or dogs.

We combined warm ischemia (WI) with cold storage in order to mimic the level of damage found in donation after circulatory death (DCD) organs (9), as this offers the highest level of discrimination for novel therapies against IRI. A 3-month follow-up permitted us to evaluate both the early response of the graft in the first week and the chronic consequences on outcome (33,34), without the bias of immunosuppression (35).

Materials and Methods

Curcumin formulation

CDC formulation containing 12 mg/mL curcumin was prepared as previously described (30). The ratio of cyclodextrin to curcumin in CDC is close to 2:1. This sterile aqueous solution is stable for 2 years at 2–8°C.

Cellular uptake of curcumin

Uptake of curcumin from the CDC formulation was studied with PC3 human prostate cells and porcine proximal tubular epithelial cells (LLC-PK1; ATCC, Manassas, VA). CDC formulation was added at different concentrations (0–250 μ M/L) to two million cells in suspension or to confluent cell monolayers in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and incubated at 37°C in 5% CO₂. Intracellular curcumin concentration was determined from washed cells by methanol extraction and absorption spectrophotometry (36).

Efficient dose determination

LLC-PK1 were cultured to confluence in M199 medium and, after washing, precooled UW (Viaspan; Bristol-Myers Squibb, Rueil-Malmaison, France) with different concentrations of tested substances was added and cells were maintained for 20 h at 4°C. Survival was evaluated using the ratio of supernatant/intracellular lactate dehydrogenase (LDH kit, Modular analytics P; Roche Diagnostics, Meylan, France).

In vitro IR experiments

Primary porcine kidney endothelial cells were used as previously described (37). Ischemia was induced by incubation for 24 h in hypoxic atmosphere (95% N₂, 5% O₂, Bactal 2 gaz Air Liquide, Paris, France) at 4°C in UW solution or UW + CDC (65 μ M/L curcumin concentration) solutions. For reperfusion, we washed the cells and incubated them with either citrated pig whole blood for 2 h or regular culture media for 6 h. Nonischemic control cells were cells cultured in regular media in normoxic atmosphere. Assays were: (i) real-time quantitative polymerase chain reaction (RTqPCR) (see below); (ii) ratio of supernatant/intracellular LDH; (iii) mitochondrial succinate dehydrogenase activity (XTT kit; Roche Diagnostics); and (iv) intracellular ATP (ATPlite 1step Luminescence Assay kit; Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France), following the manufacturer's guidelines. Reactions were quantified by a spectrophotometer (Victor3; Perkin-Elmer).

In vivo organ collection

Large white male pigs (INRA/GEPA, Surgères, France) were prepared for kidney autotransplantation as previously described (8) in accordance with French guidelines of the Ethical Committee for Human and Animal Studies. To mimic conditions found in DCD donors, renal WI was induced by clamping the right renal pedicle for 60 min with a vascular nontraumatic clamp (9). Heparin (125 IU/kg) was injected 10 min before WI. The kidney was collected, cold flushed and preserved for 24 h.

Curcumin uptake in preserved kidneys

For determination of tissue concentration of curcumin, kidneys were flushed and preserved with 1 L of UW solution supplemented with 2 mL of the CDC formulation to a final curcumin concentration of 65 μ M/L (UW + CDC). Needle biopsies were extracted with 50% acetonitrile in 20 mmol/L sodium citrate, pH 6.0. Curcumin was determined by reverse phase high-performance liquid chromatography using a Nova-Pak C18 column (Waters, Milford, MA). Absorbance was monitored at 430 nm. These organs were not transplanted.

In vivo surgical procedures and experimental groups

At the end of the preservation, the kidneys were transplanted in the same animal and the left kidney was nephrectomized to mimic nephron mass in transplanted situations. Time for anastomosis was 30 $\pm$ 5 min, blood loss was minimal, hemodynamic parameters were identical in all animals and no postoperative complication was observed. Two groups were studied: UW, kidneys preserved in UW (flush + preservation, 400 and 600 mL, respectively; n = 12); and UW + CDC, preservation in UW supplemented with CDC (n = 6). Due to the low survival rate in the UW group, more animals had to be used to obtain a large enough sample size at 3 months to allow proper statistical analysis. Controls for the RTqPCR analysis were sham-operated animals, with all surgical procedures except kidney WI, collection and

transplantation, permitting comparison of experimental samples with age-matched samples subjected to surgery alone ($n=6$).

Graft function and histopathology

Pigs were placed in a metabolic cage for blood and urine sampling for the first week posttransplantation and subsequently at days 11, 14 and months 1 and 3. Serum creatinine levels were measured on a Roche Modular analyzer (Roche Diagnostics) using the Jaffe colorimetric method. Area under the curve (AUC) was determined using the trapezoidal rule (9). Corticomedullary samples were obtained at day 7 with echo-guided needle biopsies (16G) in pigs under gas anesthesia. Samples were frozen or fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. All sections were examined under blind conditions by a pathologist. Brush border loss and endoluminal detachment were assessed using a previously used semi-quantitative 6-point scale (38,39): 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; 5, extensive necrosis and renal damage. Quantitative determination of interstitial invasion was adapted from Banff classification (40): 0, no mononuclear inflammatory cell in tubules; 1, foci with 1–4 mononuclear cells per tubular cross-section or 10 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.

For immunohistochemical determination of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), vimentin (Cell Marque, Rocklin, CA) and α -smooth muscle actin (α SMA; Dako, Trappes, France) antibodies were used, and for the determination of immune cell invasion, ED1 antibodies (SouthernBiotech, Birmingham, AL) were used to detect monocytes and macrophages, and CD3 antibodies (Cell Marque) to detect T lymphocytes. Signal quantification was conducted in silico for EMT markers or cells were counted for immune invasion, on 7–10 high-powered fields ($\times 100$). A standard procedure was used to estimate the level of tubulointerstitial fibrosis using Picro-Sirius staining (41).

Real-time PCR

Endothelial cells or cortical samples taken at 3 months posttransplantation were stored frozen then analyzed. We used Trizol for RNA extraction (Fisher Scientific, Illkirch, France). Genomic DNA was removed using DNA-free kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and first-strand reverse transcription (Applied Biosystems) was performed. Real-time PCR assays were performed on an ABI Prism 7300 (Applied Biosystems). Ribosomal mRNA L19 was used as housekeeping gene. Porcine primers (Table S1) were designed using OligoPerfectTM (Invitrogen, Grand Island, NY). Expression level was obtained with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Results are displayed as expression levels compared to control.

Statistical methods

For the statistical analysis among groups, we used NCSS software (NCSS LLC, Kaysville, UT) and two-sample t-test analysis in case of normality (Skewness, Kurtosis and Omnibus tests) and equality of variance (Modified-Levene Equal-Variance Test) and Mann–Whitney U-test in case these parameters were not met. Survival analysis was performed using Kaplan–Meier analysis and log-rank test. Statistical significance was accepted for $p < 0.05$.

Results

CDC causes efficient curcumin uptake in cells

Curcumin uptake from the CDC formulation was studied with LLC-PK1 renal tubular cells and PC3 prostate cancer cells to reveal possible cell-specific effects. Similar dose

response and high uptake levels were observed with both cell lines, corresponding to 8–10 nmol/ 10^6 cells at 60 μ mol/L curcumin concentration (Figure S1A). Curcumin uptake was rapid, with maximum uptake reached after 5 min (Figure S1B). The saturation displayed at high concentrations indicated an apparent K_d value of 100–200 μ mol/L.

Uptake in the hypoxia/hypothermia model was evaluated using fluorescent microscopy, based on the enhanced fluorescence of curcumin after cellular uptake (Figure S2). We observed efficient uptake during the hypoxia/hypothermia phase, remaining constant until 24 h. Curcumin was still detected in the cells after 6 h of reperfusion. These data indicate that CDC delivers curcumin efficiently into different cells and that cellular curcumin levels are maintained during the cold preservation and early reperfusion phase.

Determination of the efficient dose of CDC in vitro

We first determined dose response of CDC formulation and the effect of cyclodextrin alone in protection of LLC-PK1 cells against hypothermic stress (Figure S3). Efficient protection was obtained at a wide range of CDC concentrations corresponding to 3–100 μ mol/L curcumin, whereas free cyclodextrin at concentrations up to 100 μ mol/L did not have significant effect. In the remainder of the study we used CDC at a final concentration corresponding to 65 μ mol/L curcumin, which was well in the protective range.

CDC benefits against in vitro IRI

Primary endothelial cells, the first targets of IRI, were subjected to 24-h cold hypoxia in UW solution, with or without CDC. At the end of this phase, there was clearly less LDH in the supernatants of UW + CDC cells (Figure 1A, $p=0.046$ vs. UW), and these cells showed higher mitochondrial activity (Figure 1B, $p < 0.001$ vs. UW).

To evaluate the response to reperfusion, we transferred the cells to a normoxic atmosphere and replaced the UW with citrated pig blood. After 2 h, cells displayed increased mitochondrial activity, significantly higher in UW + CDC cells (Figure 1C, $p=0.003$ vs. UW). These cells also displayed a near doubling of the intracellular ATP concentration (Figure 1D, $p=0.001$ vs. UW). Transcriptomic analysis after 2 h of reperfusion in blood showed that UW + CDC cells had significantly lower expression levels for surface markers Toll-like receptor 4 (TLR4) ($p=0.010$), P-selectin ($p=0.014$) and ICAM1 ($p=0.025$), as well as cytokines TNF α ($p=0.003$) and MCP1 ($p=0.017$; Figure 1E). There was no difference in expression for the stress marker Hsp70.

Preclinical testing of CDC benefits in vivo

Curcumin uptake in preserved kidney: Curcumin uptake during flush and cold storage with UW + CDC (Figure S4) showed levels in the kidney cortex averaging 63 μ mol/kg at the end of flush and remaining stable for 4 h

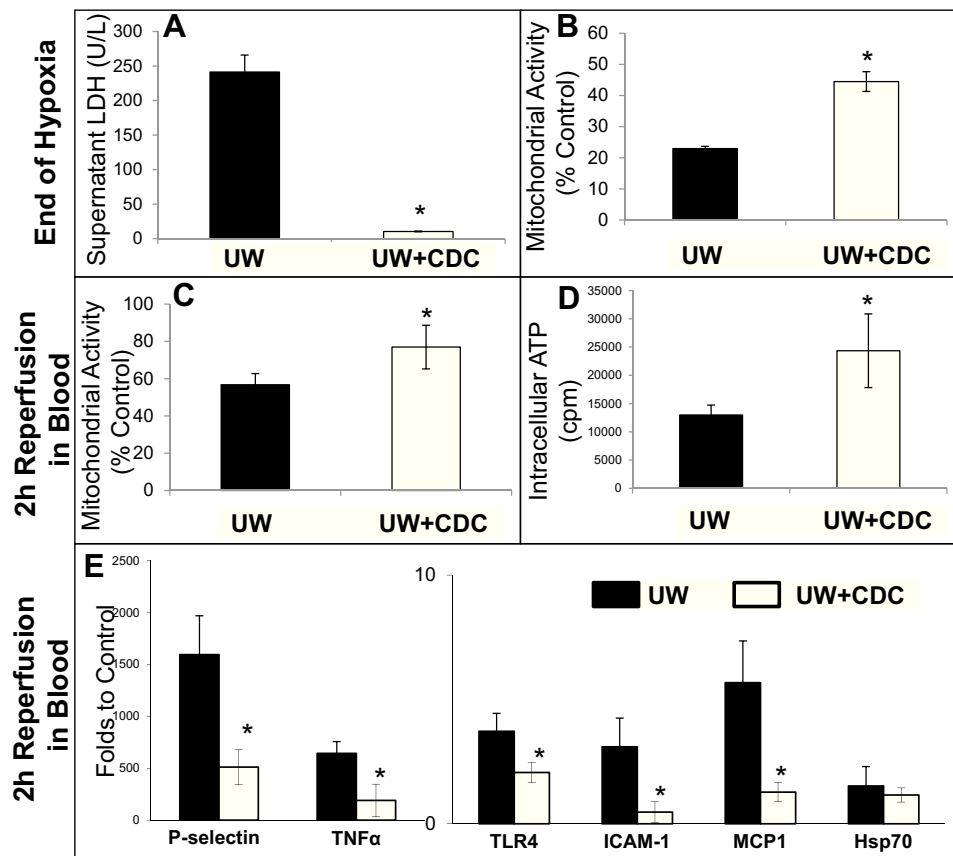


Figure 1: *In vitro* evaluation of endothelial cell resistance to IRI. To mimic IRI, primary porcine endothelial cells underwent 24 h of cold hypoxia in UW, with or without supplementation of CDC, followed by reoxygenation/rewarming in porcine blood (2 h). (A, B) Supernatant lactate dehydrogenase (LDH) and mitochondrial activity (XTT test) at the end of hypoxia. (C, D, E) Mitochondrial activity (XTT test), intracellular ATP content and transcriptomic activity in cells subjected to 2 h of reoxygenation in blood. Controls are nonischemic cells incubated in regular medium and atmosphere for a similar length of time. Shown are mean $\pm$ SD; * $p < 0.05$; $n = 3$. CDC, cyclodextrin-complexed curcumin; IRI, ischemia reperfusion injury; TLR4, Toll-like receptor 4; TNF, tumor necrosis factor; UW, University of Wisconsin.

(about $59 \mu\text{mol/kg}$). The levels then decreased with time, reaching $21 \mu\text{mol/kg}$ at 8 h and $10 \mu\text{mol/kg}$ at 24 h. Curcumin was thus present in the kidney tissue for the full duration of cold preservation.

Recovery of function: In the pig model of kidney transplantation, pigs were housed in a metabolic cage during the first week posttransplantation permitting close postoperative surveillance. Recovery of urine production was estimated as an output of more than 300 mL/day.

Five animals (83%) in the UW + CDC group and two animals (17%) in the UW group recovered urine production by the day 2 ($p = 0.005$). Three animals in the UW group did not recover diuresis during the first week, equivalent to primary nonfunction in this model. Histopathological evaluation of these kidneys showed extensive necrosis and tubulitis. The majority (75%) of animals in the UW group recovered diuresis by the day 5 (Table 1).

Animals transplanted with kidneys preserved with UW or UW + CDC showed similar increase in serum creatinine levels until day 3. Thereafter, the UW group had higher average creatinine values and displayed a more variable outcome (Figure 2). In the UW + CDC group, there was one nonfunctioning graft during the first week but all other grafts recovered function with slowly decreasing creatinine values until day 14 (Figure 2).

Creatinine values were significantly lower in the CDC + UW group on day 5 ($p = 0.004$), day 7 ($p = 0.001$), day 11

Table 1: Recovery of diuresis in UW and UW + CDC groups

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
UW	0/12	2/12	4/12	8/12	9/12	9/12	9/12
UW + CDC	0/6	5/6*	5/6*	5/6	5/6	5/6	5/6

Shown is the number of animals recovering diuresis on a given day, over the total number of animals in this group. * $p < 0.05$. CDC, cyclodextrin-complexed curcumin; UW, University of Wisconsin.

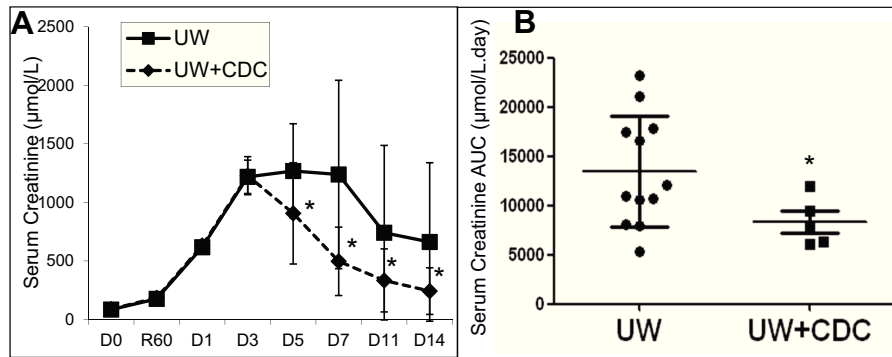


Figure 2: Function recovery postreperfusion. Serum creatinine was measured in pigs transplanted with kidneys preserved in UW or UW + CDC solutions. Samples were obtained from days 1 to 14 posttransplantation. (A) Serum creatinine evolution during the first 2 weeks. (B) Calculated area under the curve for serum creatinine in the first 2 weeks. Shown are mean $\pm$ SD; * $p < 0.05$; $n = 12$ for UW and $n = 6$ for UW + CDC. CDC, cyclodextrin-complexed curcumin; UW, University of Wisconsin.

($p = 0.014$) and day 14 ($p = 0.014$) posttransplantation, and superior recovery was confirmed by AUC analysis, expressing in one value the intensity of function loss following transplantation and the rate at which the kidney recovers afterward ($p = 0.018$).

Early tissue damage: Histological evaluation of loss of brush border and cell detachment, typical features of IRI, in day 7 biopsies revealed a lower damage score for both markers in the UW + CDC group (Table 2, $p = 0.009$ vs. UW for endoluminal detachment).

Late outcome of kidney grafts: Mortality was due to nonfunctioning grafts and euthanasia of the animals developing severe uremia. In the UW group, three animals showed primary nonfunction after 1 week and had to be euthanized in accordance with bioethical regulations. Four more animals in the UW group had to be euthanized due to graft failure during follow-up (three at day 21 and one at day 28), defined as the inability to lower serum creatinine levels and general poor health. Thus, only five animals survived until 3 months (42% survival). In the UW + CDC group, one animal was lost due to primary nonfunction during the first week, while all other animals survived until the end of the follow-up (83% survival; Figure 3A).

Surviving animals in the UW group displayed poor kidney function, evidenced by clearly elevated serum creatinine

levels at 1 and 3 months (Figure 3B). In contrast, UW + CDC animals presented clearly lower creatinine levels ($p < 0.001$ at both 1 and 3 months).

Inflammatory status at 3 months was evaluated by immunohistochemistry for ED1, a marker of macrophages and monocytes, and CD3, a marker of T lymphocytes (Figure 3C and D, respectively) on kidney cortical samples. UW kidneys were prone to chronic inflammation by both innate and adaptive immune cells, while curcumin supplementation significantly reduced this chronic invasion ($p = 0.025$ for ED1, $p = 0.033$ for CD3).

Late injury development: Long-term graft quality was investigated for the development of chronic lesions such as EMT and interstitial fibrosis. EMT is a well-described pathological event leading to fibrosis development, while fibrosis is the main feature of late graft loss. We estimated the extent of EMT through immunostaining for vimentin (Figure 4, top) and α SMA (Figure 4, bottom). Quantification revealed considerable development of EMT in UW kidneys at 3 months, while UW + CDC kidneys showed baseline levels ($p = 0.033$ for vimentin, $p = 0.025$ for α SMA). Evaluation of tissue fibrosis revealed strong interstitial fibrosis development in UW grafts while UW + CDC grafts did not show staining above baseline ($p = 0.025$, Figure 5). Spearman's correlation coefficient between the use of

Table 2: Typical ischemia reperfusion injury histological lesions, brush border loss and endoluminal detachment were assayed for UW and UW + curcumin groups after 7 days posttransplantation

Groups	Histological score at day 7		
	Brush border loss	Endoluminal detachment	Immune infiltration
UW	4.5 $\pm$ 0.7	4.4 $\pm$ 2.9	3.1 $\pm$ 2.9
UW + curcumin	2.7 $\pm$ 1.2*	0.4 $\pm$ 1.2*	0.2 $\pm$ 0.5*

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. Shown are mean $\pm$ SD. Statistics: * $p < 0.05$ to UW. $n = 5$. UW, University of Wisconsin.

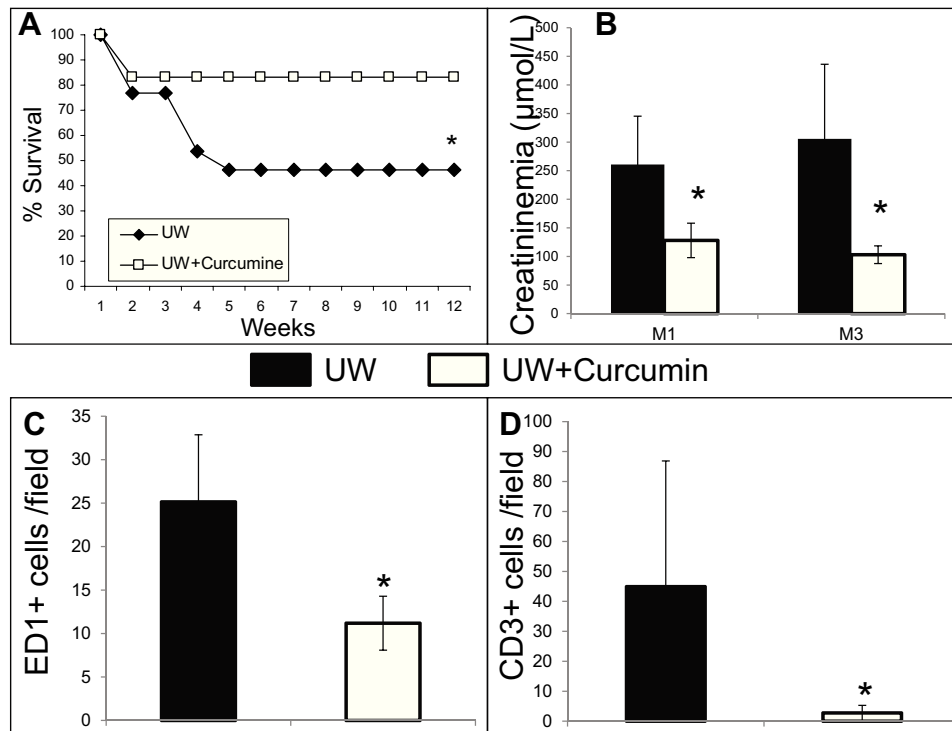


Figure 3: Long-term outcome posttransplantation. (A) Kaplan–Meier curve of animal survival over a period of 3 months. (B) Serum creatinine (μmol/L) levels at 1 month (M1) and at 3 months (M3). (C) Innate immunity invasion: average number of ED1+ cells per high-powered field at 3 months (×200). (D) Adaptive immunity invasion: average number of CD3+ cells per high-powered field at 3 months (×200). Shown are mean ± SD; * $p < 0.05$; $n = 12$ for UW and $n = 6$ for UW + CDC in survival analysis; $n = 5$ for all other data for both groups. CDC, cyclodextrin-complexed curcumin; UW, University of Wisconsin.

curcumin and the level of fibrosis at 3 months was -0.85 ($R^2 = 0.71$, $p = 0.008$).

Gene expression profiling: To gain insight into the molecular mechanisms playing a role in the graft injury and the protective mechanisms of curcumin treatment, we performed RTqPCR analysis. UW grafts showed increased expression levels of pro-fibrotic genes PAI-1, vimentin and S100A4, while the expression appeared lower in UW + CDC organs (Figure 6A). UW grafts also displayed higher expression of pro-inflammatory genes interleukin-1 receptor agonist (IL-1Rn) and complement C3, seemingly suppressed in UW + CDC kidneys (Figure 6B and C, correspondingly). Lower expression in UW + CDC grafts was also observed for the oxidative stress marker p47phox, a component of the NADPH oxidase, and increased expression of relaxin, an anti-apoptotic protein (Figure 6D).

Discussion

Herein, we show that addition of a CDC formulation to the preservation solution during cold storage can improve recovery both *in vitro* and *in vivo*, with benefits on acute outcomes such as function, histology and inflammation,

and on late outcomes with higher survival and reduction of chronic graft fibrosis.

In vitro, curcumin was rapidly taken up from the CDC complex with cellular concentrations several fold higher than in the medium, indicating efficient uptake. The effect of cyclodextrins on cellular uptake of hydrophobic drugs is based on interplay between enhanced drug solubility enabled by the cyclodextrin complex and the availability of free drug for cell entry (42). Dilution is generally considered the main driving force for drug liberation from cyclodextrin complexes (43), a process that apparently takes place in our models.

At the end of *in vitro* cold hypoxia, cells preserved in UW + CDC showed less necrosis and a higher mitochondrial activity, suggesting that curcumin inhibits deleterious pathways induced by cold hypoxia. NF-κB can be activated by ischemic conditions, as decreased oxygen tension affects the activity of prolyl hydroxylases, being in charge of attenuating IKKβ, a main inhibitor of NF-κB (44). Inhibition of IKKβ phosphorylation/inactivation by curcumin (21) is likely responsible for protection against this pathway. Upon reperfusion, cells displayed a swifter recovery of mitochondrial activity, associated with higher levels of intracellular ATP. Thus, maintenance of cell integrity by curcumin also

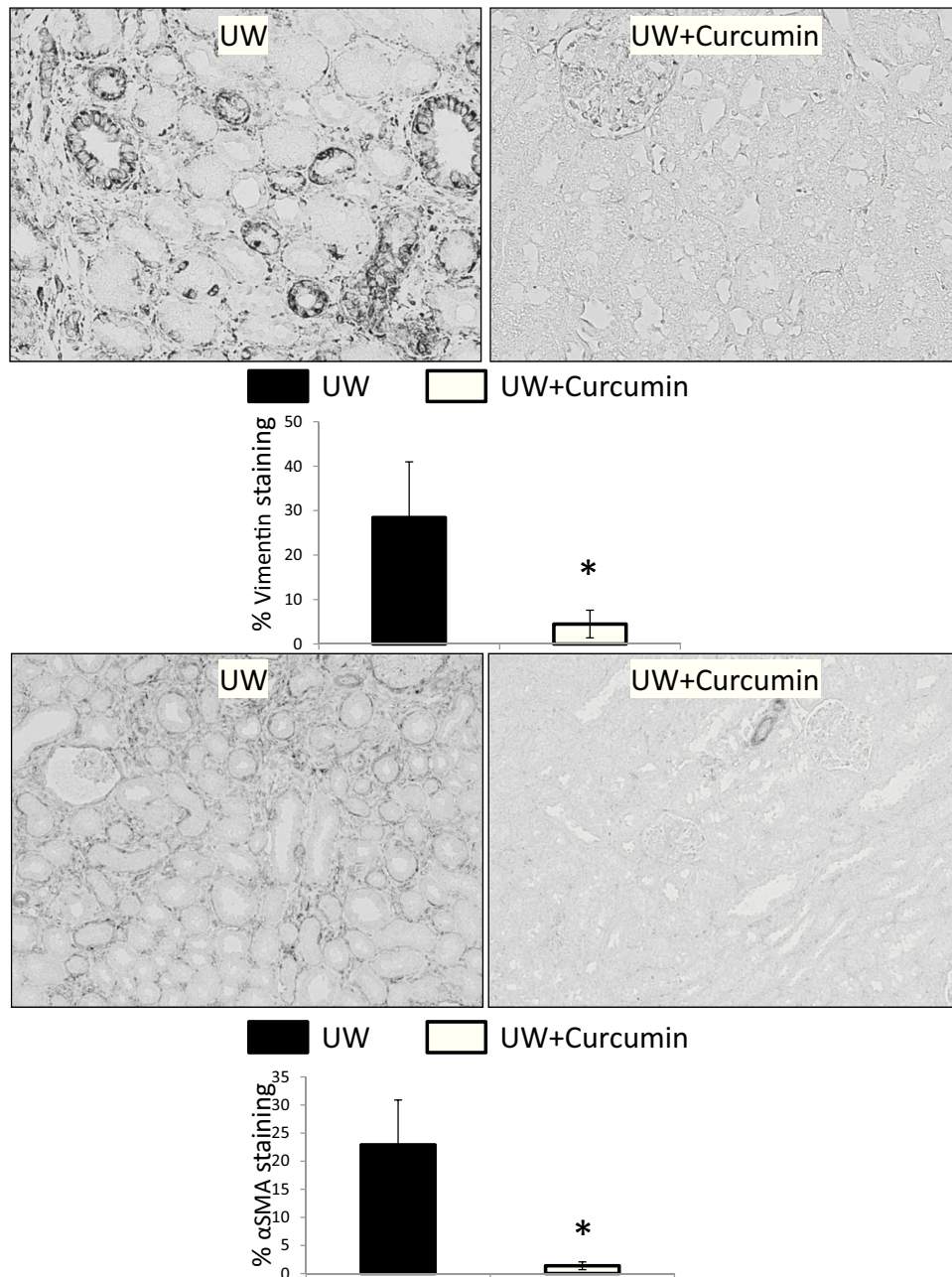


Figure 4: Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) development. Paraffin-embedded tissues were processed for immunostaining of two EMT markers, vimentin (top) and α SMA (bottom). Representative pictures are shown for each stain and each condition. Histograms show average staining on 10 randomly selected cortical areas at high magnification ($\times 100$). Shown are mean $\pm$ SD; * $p < 0.05$; at 3 months $n=5$ for UW and $n=5$ for UW+CDC. α SMA, α -smooth muscle actin; CDC, cyclodextrin-complexed curcumin; UW, University of Wisconsin.

possibly involves protection against uncoupling of the respiratory chain. The role of curcumin against oxidative stress (20,45,46) is also potentially involved (47).

RTqPCR conducted after reperfusion revealed lower expression of TLR4, P-selectin and ICAM1 in the endothelial cells kept in UW+CDC during hypoxic hypothermia.

These cell surface receptors are associated with the induction of inflammation and immune cell invasion post-IR (48). Expression levels of pro-inflammatory cytokines $\text{TNF}\alpha$ and MCP1 were also reduced, confirming the ability of the curcumin treatment to lower endothelial activation after IR. The NF- κ B inhibitory property of curcumin is presumably associated with these effects; however, other

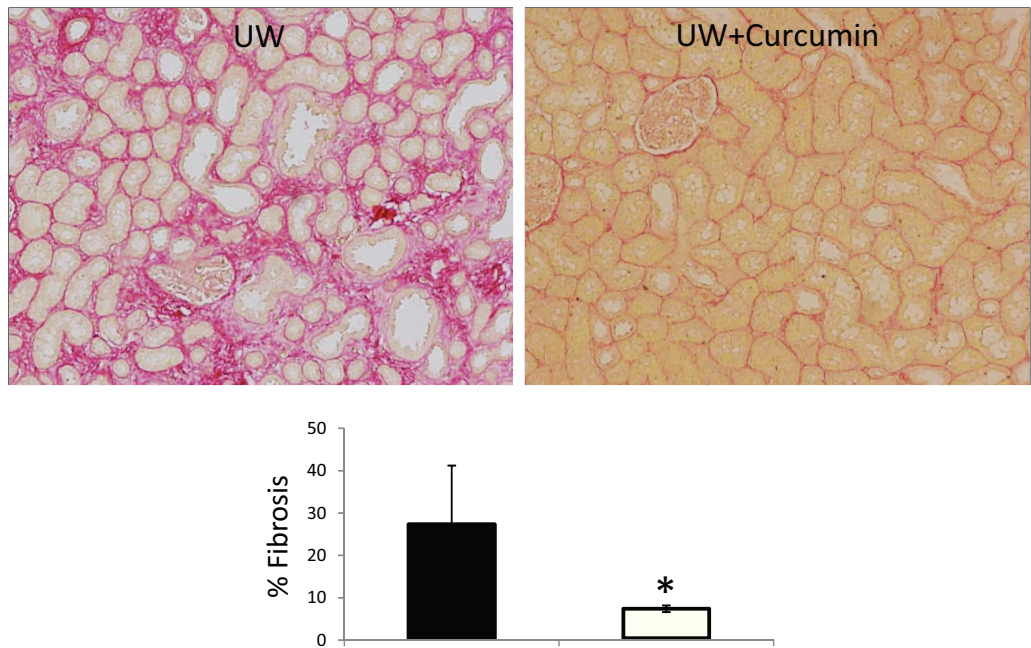


Figure 5: Chronic interstitial fibrosis development. Paraffin-embedded tissues were processed for Red Sirius staining. Representative pictures are shown for each condition. The histogram shows average staining on 10 randomly selected cortical areas at high magnification ($\times 100$). Shown are mean $\pm$ SD; * $p < 0.05$; at 3 months $n = 5$ for UW and $n = 5$ for UW + CDC. CDC, cyclodextrin-complexed curcumin; UW, University of Wisconsin.

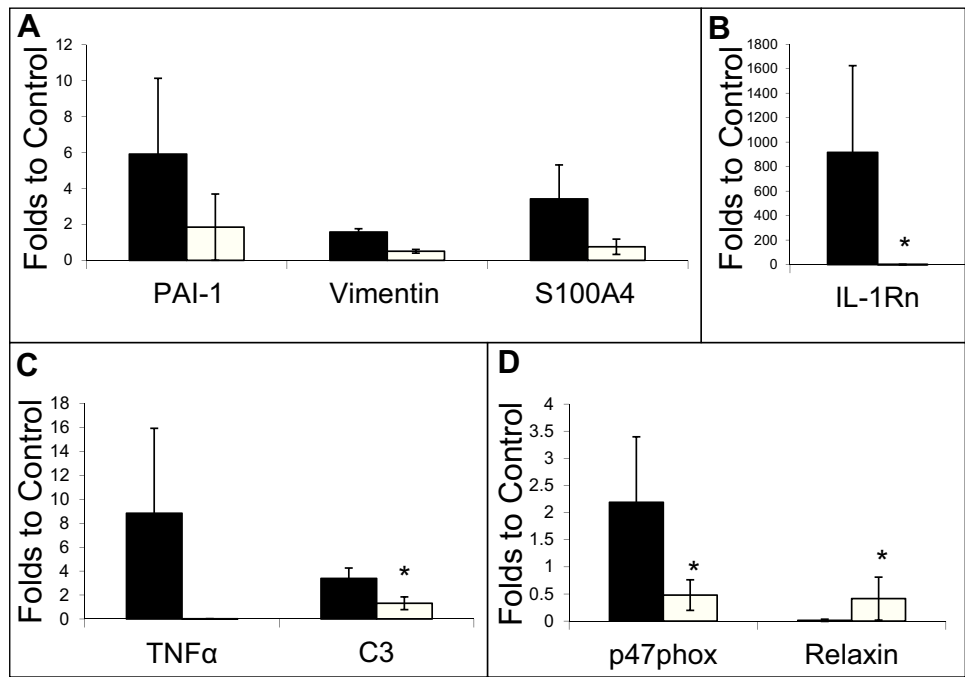


Figure 6: RTqPCR evaluation of chronic lesion marker expression in the kidney grafts at 3 months. (A) Epithelial-to-mesenchymal transition markers. (B) Adaptive immunity marker IL-1Rn. (C) Innate immunity markers. (D) Oxidative stress markers. Results are expressed in ratio to the level of expression in controls. Shown are mean $\pm$ SD; * $p < 0.05$; at 3 months $n = 5$ for UW and $n = 5$ for UW + CDC. ■, UW; □, UW + cyclodextrin-complexed curcumin; IL-1Rn, interleukin-1 receptor agonist.

pathways may be involved, such as the p38MAPK pathway, responsible for inflammation post-IR (49,50) and inhibited by curcumin (23).

For *in vivo* testing of the CDC formulation, we used a pig model of kidney transplantation reproducing conditions of DCD as closely as possible. CDC in UW led to tissue levels of curcumin of about 60 $\mu\text{mol/kg}$ after flush of the graft. According to *in vitro* data, this level should be in the effective range of curcumin. The decrease in the tissue level during static cold preservation suggests that curcumin may be utilized in antioxidant reactions, the main degradation product of curcumin being vanillin and ferulic acid derivatives, both antioxidants (51).

In this model, our observation of earlier recovery of urine production associated with a lower AUC of serum creatinine suggests a better quality of the organs in the curcumin-treated group. Moreover, the decreased proportion of animals showing primary nonfunction or graft failure (7/12 in the UW group vs. 1/6 in the UW + CDC group), together with histopathological findings of a decrease in loss of brush border and endoluminal detachment, support the conclusion that the treatment decreased the impact of IRI on these organs.

Three-month follow-up permitted us to assess the consequences of IRI on late outcome. Animal survival revealed the inadequacy of UW to prevent injury when faced with high levels of IRI. However, addition of the CDC formulation to the preservation solution improved survival from 42% to 83%, suggesting that the protection provided by curcumin is enough to prevent most late IR-related injuries. Surviving UW animals showed poor kidney function, while UW + CDC animals demonstrated serum creatinine levels close to pretransplant measurements. Thus, CDC treatment allowed for long-term protection of the kidney graft.

We further assessed the long-term outcome by immunohistochemical analysis of immune cell invasion in the grafts at 3 months posttransplantation. We found both innate and adaptive immune cells invading the grafts preserved with UW, even in the setting of autotransplantation. CDC supplementation to UW was able to significantly reduce the number of invading cells, conceivably through the protection provided against IRI in the renal tissue.

We also measured the extent of late kidney lesions through measurement of EMT, and interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) development, all hallmarks of chronic graft failure (52,53). Our analysis showed critically reduced IFTA as well as reduction of staining for the EMT markers vimentin and αSMA . Correlation analysis showed that the use of CDC during preservation correlated with lower levels of IFTA. Thus, this treatment protects the grafts against the late consequences of IRI.

Further analysis by RTqPCR permitted us to determine that the treated grafts had lower levels of activation of pathways typically associated with chronic graft loss, such as inflammation, apoptosis and oxidative stress. Quantification of gene expression was in accordance with the immunohistochemical data, showing higher levels in non-curcumin-treated grafts. However, this analysis also revealed that some activation of pathophysiological processes, such as fibrosis and EMT, was detectable, suggesting that the protection offered by UW-CDC was not complete in our stringent model.

In conclusion, CDC supplementation to preservation solution is a promising avenue of research for the improvement of preservation strategies. This strategy could rapidly bring improvements in the clinic, due to low level of complexity required to include its use in current protocols and the good safety record of curcumin and cyclodextrins, both in preclinical toxicological studies and in clinical trials (19,43,54). As curcumin treatment did not alter serum creatinine levels in the first 3 days of reperfusion, it is possible that it benefits the functional recovery potential of the cells but may not completely alleviate acute stress caused by IR. There is thus room for improvement through combination with other methods, either pharmaceutical (54) or technological, for instance with machine perfusion (55–57), in order to reach the highest level of protection attainable, particularly for fragile organs.

Acknowledgments

The authors wish to express their gratitude for the financial support from the Région Poitou Charentes, Poitiers, CHU de Poitiers and Inserm, the Société Francophone de Transplantation, the French Foundation of Transplantation, the Agence de Biomédecine and the Fondation de l'Avenir, and the Finnish Academy (JP). The authors also wish to acknowledge the invaluable technical help from Ms. Virigine Ameteau, Mrs. Maïté Jacquard, Mrs. Françoise Chauvelon and Mrs. Sandrine Joffrion.

Disclosure

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*. JP owns shares in a company which owns the patent rights to the CDC formulation. The other authors have no conflicts of interest.

References

1. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 4: 378–383.
2. Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, et al. Donor characteristics associated with reduced graft survival: An approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation* 2002; 74: 1281–1286.

3. Jamieson RW, Friend PJ. Organ reperfusion and preservation. *Front Biosci* 2008; 13: 221–235.
4. Salahudeen AK. Consequences of cold ischemic injury of kidneys in clinical transplantation. *J Invest Med* 2004; 52: 296–298.
5. Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: New insights from experimental studies. *Am J Physiol* 2004; 287: F181–F187.
6. Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted organs: Some new strategies against an old problem. *Am J Transplant* 2004; 4: 1.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Rossard L, Favreau F, Giraud S, et al. Role of warm ischemia on innate and adaptive responses in a preclinical renal auto-transplanted porcine model. *J Transl Med* 2013; 11: 129.
11. Rossard L, Favreau F, Demars J, et al. Evaluation of early regenerative processes in a preclinical pig model of acute kidney injury. *Curr Mol Med* 2012; 12: 502–505.
12. Djamali A, Samaniego M. Fibrogenesis in kidney transplantation: Potential targets for prevention and therapy. *Transplantation* 2009; 88: 1149–1156.
13. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol* 2009; 130: 41–50.
14. Li L, Huang L, Sung SS, et al. NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 2007; 178: 5899–5911.
15. Kinsey GR, Sharma R, Huang L, et al. Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1744–1753.
16. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol* 2001; 281: F887–F899.
17. Cicco G, Panzera PC, Catalano G, Memeo V. Microcirculation and reperfusion injury in organ transplantation. *Adv Exp Med Biol* 2005; 566: 363–373.
18. Sutton TA. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. *Microvasc Res* 2009; 77: 4–7.
19. Strimpakos AS, Sharma RA. Curcumin: Preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 511–545.
20. Mishra B, Priyadarsini KI, Bhide MK, Kadam RM, Mohan H. Reactions of superoxide radicals with curcumin: Probable mechanisms by optical spectroscopy and EPR. *Free Radic Res* 2004; 38: 355–362.
21. Jobin C, Bradham CA, Russo MP, et al. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol* 1999; 163: 3474–3483.
22. Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: An age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 85–94.
23. Kim YS, Ahn Y, Hong MH, et al. Curcumin attenuates inflammatory responses of TNF-alpha-stimulated human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 50: 41–49.
24. Shoskes DA. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: A new class of renoprotective agents. *Transplantation* 1998; 66: 147–152.
25. Jones EA, Shahed A, Shoskes DA. Modulation of apoptotic and inflammatory genes by bioflavonoids and angiotensin II inhibition in ureteral obstruction. *Urology* 2000; 56: 346–351.
26. Bayrak O, Uz E, Bayrak R, et al. Curcumin protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *World J Urol* 2008; 26: 285–291.
27. Gaedeke J, Noble NA, Border WA. Curcumin blocks fibrosis in anti-Thy 1 glomerulonephritis through up-regulation of heme oxygenase 1. *Kidney Int* 2005; 68: 2042–2049.
28. Ghosh SS, Massey HD, Krieg R, et al. Curcumin ameliorates renal failure in 5/6 nephrectomized rats: Role of inflammation. *Am J Physiol* 2009; 296: F1146–F1157.
29. Rogers NM, Stephenson MD, Kitching AR, Horowitz JD, Coates PT. Amelioration of renal ischaemia-reperfusion injury by liposomal delivery of curcumin to renal tubular epithelial and antigen-presenting cells. *Br J Pharmacol* 2012; 166: 194–209.
30. Yadav VR, Prasad S, Kannappan R, et al. Cyclodextrin-complexed curcumin exhibits anti-inflammatory and antiproliferative activities superior to those of curcumin through higher cellular uptake. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 1021–1032.
31. Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical renal ischemia: A contemporary overview. *J Urol* 2008; 180: 19–30.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Kunwar A, Barik A, Pandey R, Priyadarsini KI. Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: An absorption and fluorescence spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 1513–1520.
37. 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.
38. 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.
39. Thuillier R, Dutheil D, Trieu MT, et al. Supplementation with a new therapeutic oxygen carrier reduces chronic fibrosis and organ dysfunction in kidney static preservation. *Am J Transplant* 2011; 11: 1845–1860.
40. 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.
41. 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.

42. Dahan A, Miller JM, Hoffman A, Amidon GE, Amidon GL. The solubility-permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: Mechanistic modeling and application to progesterone. *J Pharm Sci* 2010; 99: 2739–2749.
43. Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. *Toxicol Pathol* 2008; 36: 30–42.
44. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 18154–18159.
45. Baum L, Ng A. Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models. *J Alzheimers Dis* 2004; 6: 367–377, discussion 443–449.
46. Sreejayan, Rao MN. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46: 1013–1016.
47. Nakagawa T, Kang DH, Ohashi R, et al. Tubulointerstitial disease: Role of ischemia and microvascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12: 233–241.
48. Gourdin MJ, Bree B, DeKock M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol* 2009; 26: 537–547.
49. Guo X, Gerl RE, Schrader JW. Defining the involvement of p38 α MAPK in the production of anti- and proinflammatory cytokines using an SB 203580-resistant form of the kinase. *J Biol Chem* 2003; 278: 22237–22242.
50. Herlaar E, Brown Z. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* 1999; 5: 439–447.
51. Shen L, Ji HF. The pharmacology of curcumin: Is it the degradation products? *Trends Mol Med* 2012; 18: 138–144.
52. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: Current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; 81: 643–654.
53. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant* 2009; 9: 527–535.
54. Chatauret N, Thuillier R, Hauet T. Preservation strategies to reduce ischemic injury in kidney transplantation: Pharmacological and genetic approaches. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 180–187.
55. Cudas RTR, Hauet T, Badet L. Renoprotective effect of Pulsatile perfusion machine RM3: Pathophysiologic and kidney injury biomarker characterization in preclinical model of autotransplanted pig. *BJU Int* 2012; 109: 141–147.
56. Moers C, Smits JM, Maathuis MH, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med* 2009; 360: 7–19.
57. 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.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Figure S1: Curcumin uptake by cells. (A) Uptake of curcumin from the CDC complex by PC3 and LLC-PK1 cells. CDC was added to different concentration to 2 million cells in suspension in 1 mL of HBSS. Curcumin content in the washed cells was measured after 15 min. (B) Time dependence of the uptake of curcumin from the CDC complex. CDC was added at 30 μ M concentration in HBSS to PC3 cell monolayers. Fluorescence of the washed cells was measured after different time points. Shown are mean $\pm$ SD, n = 3.

Figure S2: Curcumin uptake during hypoxia/hypothermia of endothelial cells. Primary pig endothelial cells were cultured on glass slides and kept at 4°C/0% O₂ for up to 24 h in UW solution with CDC, then regular culture media was used in normal culture conditions for 6 h. At each time point, the cells were fixed in 4% formaldehyde, mounted, and observed on a fluorescent microscope. n = 3.

Figure S3: Protection of proximal tubular epithelial cells against hypothermic injury by CDC formulation *in vitro* and lack of efficacy by free cyclodextrin. LLC-PK1 cells were kept at 4°C for 20 h in UW solution with CDC (filled symbols) or free hydroxypropyl- γ -cyclodextrin (open symbols) at different concentrations. Cell injury was measured by LDH release into the medium. Results are given as % of control cells kept in UW at 4°C for 20 h. Shown are mean $\pm$ SD, n = 3.

Figure S4: Kidney concentration of curcumin during cold preservation. Porcine kidneys were flushed with cold UW + CDC solution (65 μ mol/L as curcumin). Repeated cortical samples were collected at the different time points, and curcumin concentration assayed as described in the Methods. Shown are mean $\pm$ SD, n = 3.

Table S1: Primer sequences for RTqPCR analysis.

3.1. Introduction

Les lésions de fibrose chronique et la détérioration du greffon rénal sont corrélées à la sévérité des lésions d'IR. La curcumine présente des propriétés biologiques intéressantes dans le cadre de la prévention de ces lésions : une forte propriété anti-oxydante, une capacité d'inhibition de la voie de NF- κ B et la possibilité d'inhibition d'autres voies impliquées dans la régulation de l'inflammation. Des modèles expérimentaux ont par ailleurs mis en évidence des propriétés réno-protectives de la curcumine.

Comme la plupart des antioxydants, l'utilisation de la curcumine est limitée par ses propriétés hydrophobes. L'utilisation d'un complexe cyclodextrine-curcumine (CDC) permet son utilisation en solution aqueuse. Les capacités d'absorption cellulaire et d'inhibition de la voie de NF- κ B par ce complexe ont été étudiées. Ses effets protecteurs sont supérieurs à ceux de la curcumine seule dans un solvant organique. La cyclodextrine isolée n'a pas d'effet propre dans ces conditions.

Nous avons donc étudié l'intérêt de la curcumine dans la préservation d'organe avec plusieurs étapes :

- Confirmer l'absorption cellulaire du complexe CDC et déterminer la dose la plus efficace ;
- Evaluer les effets du complexe CDC sur les lésions d'IR sur les cellules endothéliales *in vitro* ;
- Mesurer l'effet de la curcumine sur des reins porcins préservés avec la solution UW ;
- Déterminer l'impact du complexe CDC sur un modèle d'auto-transplantation rénale porcin avec suivi de 3 mois.

Nous avons associé une ischémie chaude et une conservation statique hypothermique dans le but de mimer les lésions retrouvées chez les DDAC, afin d'observer de façon plus discriminante les effets potentiels de cette nouvelle thérapie.

3.2. Matériel et méthode (synthèse)

La solution de CDC contient 12mg/ml de curcumine avec un ratio 2:1 de cyclodextrine et de curcumine.

L'absorption du complexe CDC à différentes concentrations a été étudiée en utilisant des cellules prostatiques humaines et épithéliales rénales porcines. La concentration intracellulaire était mesurée par spectrophotométrie.

La dose efficace a été déterminée en mesurant à différentes concentrations la survie des cellules après 20 heures à 4°C.

Un modèle de cellules endothéliales rénales porcines a été utilisé pour l'étude des lésions d'IR *in vitro*. Après 24 heures d'incubation en hypoxie (5% d'oxygène) à 4°C en présence de solution UW avec ou sans le complexe CDC, la reperfusion était réalisée avec du sang total porcin citraté pendant 2 heures ou en milieu de culture standard pour 6 heures.

Le modèle d'auto-transplantation rénale était le même que celui décrit dans la précédente étude. Le protocole a également été mené en respectant la réglementation du Ministère de l'Agriculture, de l'Institut National pour la Recherche Agronomique et du comité régional d'éthique sur l'expérimentation animale.

Une période d'ischémie chaude de 60 minutes était respectée avant prélèvement. Les reins étaient ensuite lavés et conservés pendant 24 heures en utilisant 1L de solution UW à 4°C, avec ou sans supplémentation par CDC (groupe UW+CDC et groupe UW). Chaque groupe était composé de 6 animaux (n=6). Le suivi était de 3 mois.

Sur des reins non greffés par la suite, l'absorption de curcumine a été évaluée à partir de prélèvements tissulaires (biopsies à l'aiguille).

3.3. Résultats

3.3.1. Absorption efficace par les cellules du complexe CDC

Un niveau élevé et équivalent d'absorption a été mesuré dans les deux lignées cellulaires témoignant de l'absence d'effet spécifique du type cellulaire. Cette absorption était rapide avec un pic à 5 minutes.

Dans des conditions d'hypoxie et d'hypothermie, l'absorption cellulaire était constante pendant 24 heures et ce taux efficace était encore mesurable 6 heures après reperfusion.

Ces résultats montrent que le complexe CDC délivre de manière efficace la curcumine quel que soit le type cellulaire et que ce taux de curcumine est maintenu pendant la préservation hypothermique et à la phase précoce de la reperfusion.

3.3.2. Détermination de la dose efficace de CDC *in vitro*

Une protection efficace a été déterminée pour une concentration de CDC de 3 à 100 μ mol/L de curcumine. Dans les suites de ce travail, une concentration intermédiaire de 65 μ mol/L a été utilisée. Il n'a pas été déterminé d'effet propre de la cyclodextrine seule.

3.3.3. Etude des bénéfices du CDC contre les lésions d'IR *in vitro*

Après 24 heures d'hypoxie, les cellules endothéliales exposées à la solution UW avec CDC ont produit une quantité plus faible de LDH et présentent une activité mitochondriale plus élevée de façon significative.

Après 2 heures de reperfusion avec du sang total porcin citraté, les cellules endothéliales expriment toujours de façon significative une activité mitochondriale plus importante dans le groupe UW avec CDC. Le dosage d'ATP intracellulaire est également 2 fois supérieur dans le groupe UW avec CDC. L'analyse transcriptomique montre que ces cellules expriment avec

des résultats significatifs moins de marqueurs TLR4 à leur surface, de p-sélectine, d'ICAM-1 et de TNF- α . Le seul résultat non significatif est l'expression du marqueur du stress HSP 70.

3.3.4. Evaluation préclinique des effets du CDC *in vivo*

La concentration de curcumine après lavage des reins était de 65 μ mol/kg et restait stable après 4 heures de conservation. Après 8 heures et à 24 heures, cette concentration diminuait progressivement de 21 μ mol/kg à 10 μ mol/kg. La curcumine était donc présente dans le tissu rénal tout au long de la conservation.

La proportion de RRF et de NFP était statistiquement supérieure dans le groupe UW. Dans les deux groupes le pic de créatininémie s'observait à J3 avec des valeurs similaires. Par la suite l'évolution était plus reproductible chez les animaux du groupe UW+CDC avec une décroissance plus rapide et plus proche des concentrations physiologiques de la créatininémie. Les lésions étudiées sur les biopsies à J7 (perte de la bordure en brosse, détachement cellulaire et infiltration immunitaire) étaient plus faibles dans le groupe UW+CDC.

Dans le groupe UW, sept animaux ont dû être euthanasiés pour NFP ou défaillance secondaire du greffon au cours des 3 mois de suivi.

Dans le groupe UW+CDC, un seul animal a été euthanasié pour NFP.

La créatininémie à 1 mois et 3 mois étaient statistiquement plus basses dans le groupe UW+CDC.

L'infiltration macrophagique-monocytaire et lymphocytaire T évaluée sur le tissu cortical à 3 mois, témoignant du statut inflammatoire chronique, était supérieure dans le groupe UW.

Les marqueurs de la TEM (vimentine et α -SMA) ont été étudiés. A 3 mois, leur quantification était largement supérieure dans le groupe UW par rapport au groupe UW+CDC, pour lequel ils étaient proches des valeurs de base. Le pourcentage de fibrose était également significativement supérieur dans le groupe UW.

Les greffons du groupe UW ont une expression plus élevée des gènes pro-fibrosants (*plasminogen activator inhibitor-1*, vimentine et S100A4) et des gènes pro-inflammatoires (*IL-1 receptor antagonist*, et fraction C3 du complément). Les greffons conservés dans UW+CDC exprimaient plus faiblement p47phox, un marqueur du stress oxydatif, et de façon plus importante la relaxine, une protéine anti-apoptotique.

3.4. Discussion

L'addition d'une solution à base de curcumine au cours de la conservation statique a donc des effets bénéfiques sur la récupération des lésions d'IR, *in vitro* et *in vivo*.

In vitro, la curcumine est rapidement effective au sein de la cellule. La cyclodextrine permet l'absorption cellulaire des substances hydrophobes en formant un complexe soluble leur permettant d'entrer dans la cellule. La substance hydrophobe est alors libérée par phénomène de dilution.

A la fin de la période d'hypoxie, les cellules préservées dans la solution UW avec CDC montrent moins de nécrose et plus d'activité mitochondriale, suggérant l'inhibition des voies délétères induites par l'hypoxie. La voie de NF- κ B est activée en condition d'ischémie. La diminution de la pression partielle en oxygène affecte l'activité des prolylhydroxylases qui modulent négativement IKK β , un inhibiteur majeur de la voie de NF- κ B. La curcumine a une action protectrice en modulant l'inhibition d'IKK β . Au moment de la reperfusion, les cellules ont montré une récupération plus rapide de leur activité mitochondriale avec des niveaux intracellulaires d'ATP plus élevés. Le maintien de l'intégrité cellulaire est permis par la curcumine en protégeant contre le découplage de la chaîne respiratoire. Le rôle de la curcumine contre le stress oxydant serait également potentiellement impliqué.

En fin de reperfusion, le niveau d'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et MCP-1) était plus faible dans le groupe UW avec CDC confirmant la capacité de la curcumine à diminuer l'activation endothéliale après IR. Ces effets sont probablement dus à la

capacité de la curcumine à inhiber la voie de NF- κ B. D'autres voies sont sans doute également impliquées comme celle de p38 *mitogen-activated protein kinase*, connue comme étant également responsable de l'inflammation post-IR et inhibée par la curcumine.

Pour l'étude *in vivo*, nous avons utilisé un modèle porcin d'auto-transplantation rénale reproduisant les conditions de DDAC. Comme nous l'avons vu dans l'étude précédente, ce modèle est moins proche des conditions cliniques que les modèles de CRN et de RIS précédemment décrits mais son utilisation est justifiée pour des raisons éthiques et économiques. La dose de CDC ajoutée à la solution UW a permis d'obtenir une concentration tissulaire après lavage de 60 μ mol/kg de curcumine. Selon les données *in vitro*, ce niveau de concentration est efficace. La diminution de la concentration de curcumine dans le tissu rénal au cours de la conservation hypothermique suggère son utilisation dans les réactions antioxydantes, les produits principaux de sa dégradation étant les dérivés de la vaniline et de l'acide férulique, deux antioxydants.

Dans nos conditions expérimentales, on observe une meilleure reprise de la fonction rénale dans le groupe traité par la curcumine. Ces résultats sont confortés par un pourcentage plus faible de NFP, l'absence de défaillance secondaire du greffon et des lésions histologiques précoces moins marquées dans le groupe traité avec curcumine.

Le suivi à 3 mois permet d'évaluer les conséquences des lésions d'IR sur le devenir à long terme du greffon. La courbe de survie montre que la solution UW seule n'est pas suffisante pour préserver les reins ayant subi des lésions sévères d'IR. La supplémentation avec CDC permet un taux de survie passant de 42% à 83%, suggérant un effet préventif de la curcumine sur les effets majeurs de l'IR. Les animaux du groupe UW ayant survécu avaient une fonction rénale médiocre alors que ceux du groupe UW+CDC retrouvaient des créatininémies proches de leurs valeurs de base.

Nous avons également évalué le devenir à long terme du greffon en étudiant l'infiltration du tissu rénal par les cellules du système immunitaire inné et adaptatif. L'addition de CDC permet de considérablement diminuer cette infiltration.

Les lésions tardives du greffon ont été étudiées à travers l'évaluation de la TEM, le développement de la fibrose et de l'atrophie tubulaire. Les résultats sont meilleurs dans le groupe traité avec curcumine suggérant son effet protecteur sur les conséquences tardives de l'IR.

L'analyse du niveau d'expression des gènes impliqués dans les voies typiquement associées avec la perte chronique du greffon que sont l'inflammation, l'apoptose et le stress oxydatif, est en accord avec les résultats précédents, à savoir une meilleure protection des reins préservés par la solution UW avec CDC.

3.5. Conclusion

La supplémentation des solutions de conservation par la curcumine couplée à la cyclodextrine est donc une voie d'étude prometteuse. Cette thérapeutique pourrait rapidement s'appliquer à la clinique du fait de sa simplicité et de l'existence d'études précliniques et cliniques préalables ayant déjà montré sa sécurité d'utilisation. Du fait de la persistance d'une ascension de la créatininémie dans les 3 jours suivant la greffe, la curcumine présente un bénéfice dans la reprise de fonction mais n'atténue pas totalement les lésions induites par l'IR. Il pourrait donc être intéressant d'associer cette technique à d'autres modalités de conservation, comme les machines de perfusion, ou à d'autres additifs pharmacologiques afin d'obtenir un niveau de protection encore supérieur.

SYNTHESE ET PERSPECTIVES

1. Justification du travail

Face à la pénurie d'organes, les DDAC semblent être une source prometteuse de greffons rénaux. Contrairement aux organes issus des DME, ceux issus des DDAC sont soumis à une période d'ischémie chaude prolongée et leur prélèvement ne se fait qu'après une période de reconditionnement par CRN ou RIS, qui doit être initiée rapidement après la déclaration du décès.

Au sein des différents pays pratiquant les prélèvements chez les DDAC non contrôlés, l'utilisation de l'une ou l'autre technique est laissée à l'appréciation de chaque équipe de greffe. La plupart des études publiées font état du devenir à plus ou moins long terme du greffon avec utilisation d'un même mode de reconditionnement, soit CRN [34-37] soit RIS [25-33, 167-171]. La durée de cette période de reconditionnement est rarement rapportée. Le type de reconditionnement n'est même d'ailleurs pas toujours précisé [172, 173]. Trois études seulement, une barcelonaise par l'équipe de Valero en 2000 et deux études françaises en 2016 et 2018, ont comparé ces deux méthodes mais sur de petits effectifs (n=8, n=19 et n=32 pour le groupe CRN) et à des périodes de temps différentes pour les deux études françaises (remplacement du RIS par la CRN en 2010-2011) [22-24]. De meilleurs résultats pour les groupes CRN ont été mis en évidence. Il n'y a actuellement pas de consensus quant à la durée optimale de cette phase de reconditionnement.

Après prélèvement, l'utilisation des MPH a été par contre largement adoptée pour la préservation de ces greffons [76, 115, 118-124, 126-128, 164-166].

Face à cette nouvelle source de greffons et devant les enjeux humains et économiques importants mis en œuvre au cours de ces procédures de prélèvement, il nous a paru indispensable de revenir vers des bases expérimentales solides afin de dégager des axes de prise en charge scientifiquement prouvés.

Ce travail s'inscrit pleinement dans l'axe du plan greffe 3 de l'ABM (2017-2021) qui prévoit de maintenir l'activité de prélèvement de la catégorie II de Maastricht dans des centres volontaires avec un objectif de 100 greffes par an en 2021 (90 greffes rénales et 10 greffes hépatiques) [7].

2. Concernant le reconditionnement chez le donneur

La première partie de ce travail a consisté à étudier les modes de reconditionnement chez le donneur.

La modélisation préclinique du DDAC avec mise en place d'une CRN nous a permis d'étudier ses effets d'un point de vue mécanistique sur le greffon rénal. Bien que ce modèle présente des limites que nous avons largement évoquées, il reste à notre connaissance l'un des plus proches des conditions cliniques parmi les modèles publiés. D'une grande reproductibilité, il permet la comparaison de paramètres précis au cours du reconditionnement. Le modèle d'allogreffe, en s'affranchissant des biais liés au rejet immunitaire, avec suivi de 3 mois, autorise l'étude des conséquences des lésions d'IR à court et long termes, ce qui est capital en transplantation d'organes. Les résultats obtenus sur ce modèle préclinique sont ainsi rapidement transposables à l'homme.

Ce modèle nous a permis de comparer les deux méthodes de reconditionnement actuellement recommandées en utilisant, pour chacune, la durée maximale tolérée par l'ABM. Une supériorité de la CRN par rapport au RIS a été mise en évidence, avec une reprise plus précoce de la diurèse et un retour plus rapide et à des valeurs plus physiologiques de la créatininémie. Ces premiers résultats laissent également supposer qu'en plus de la méthode utilisée, la durée de ce reconditionnement semblait également impacter sur le devenir des greffons rénaux.

La CRN est ainsi devenue la voie de recherche privilégiée avec l'étude de différentes durées (2 heures, 4 heures et 6 heures). Les résultats ont montré qu'au cours de la CRN, il existe une

activation de la voie de réponse à l'hypoxie de HIF-1 α , une régulation transitoire des marqueurs de lésion tubulaire rénale, ainsi que des paramètres de l'hémostase et de l'initiation de la réponse inflammatoire, et ce jusqu'à 6 heures. Il existe également une amélioration de la perfusion rénale sur MPH et des fonctions rénales précoce et tardive, à partir de 4 heures de CRN. Il n'y a par contre pas de retentissement sur les lésions histologiques rénales.

La dégradation des résultats vers 6 heures de CRN était notamment due à l'anémie du fait de l'hémodilution inhérente à la CEC. Au-delà de 6 heures, le maintien d'une hémodynamique et d'un transport de l'oxygène efficace n'était plus possible dans nos conditions expérimentales. Une optimisation de ce transport en oxygène est réalisable par transfusion, mais peut être discutable du fait de l'effet délétère des anticorps anti-HLA post-transfusionnels [177]. L'autre possibilité est l'ajout d'un transporteur artificiel synthétique ou extrait, comme Hemarina-M101 (HEMO₂life®), dont l'efficacité a déjà été démontrée au laboratoire [100]. Il serait intéressant d'étudier son utilisation au cours d'une CRN prolongée afin de savoir si des facteurs autres que le transport en oxygène entrent en compte dans la limitation du reconditionnement au-delà de 6 heures.

L'intérêt de nombreux autres additifs pourraient par ailleurs être évalué au cours de la CRN.

Une perspective également intéressante serait l'utilisation de ce modèle pour l'étude des autres organes abdominaux (foie et pancréas), afin d'évaluer s'ils bénéficient dans les mêmes proportions du reconditionnement par CRN et si 4 heures est également une durée optimale. La transplantation de poumons issus des DDAC non contrôlés est une autre voie de recherche à envisager [178-180].

Par ailleurs, devant les bons résultats du reconditionnement par CRN sur les greffons rénaux, l'extension des durées d'ischémie chaude et de ce fait, du nombre de donneurs potentiels, pourrait être envisagée. Des résultats précliniques et cliniques encourageants ont en effet été publiés après 60 minutes de *no flow* [181-183].

3. Concernant la conservation hypothermique

La deuxième partie de ce travail a concerné l'étude des modalités de conservation hypothermique du greffon rénal. Cette période de conservation est en effet, sur un plan logistique, incontournable dans le processus de greffe rénale à partir de donneurs décédés.

Dans le contexte des DDAC, l'utilisation des MPH est largement recommandée [38, 42].

Le modèle préclinique de DDAC a permis d'étudier l'impact du mode de conservation hypothermique sur le transplant rénal reconditionné par CRN. La conservation en machine de perfusion permet au greffon de maintenir le niveau d'expression des gènes en rapport avec l'activation de l'inflammation et la réponse à l'hypoxie et au stress oxydant, observé en fin de CRN. Ces constatations sont probablement en lien avec une glycolyse mieux préservée, par l'apport d'oxygène de l'air ambiant dissout dans la solution de préservation, et le maintien d'une stimulation endothéliale par la perfusion.

Nous avons également étudié deux additifs sur un modèle d'autogreffe rénale mimant les conditions de DDAC avec suivi de 3 mois. Là encore, ce modèle nous permet de nous affranchir du rejet immunitaire et d'étudier l'impact des lésions d'IR sur le devenir à long terme du greffon. Comme déjà évoqué, ce modèle porcin mime les conditions cliniques de DDAC de façon moins proche que les modèles de CRN ou de RIS présentés préalablement. Il se limite, en effet, à une ischémie chaude de 60 minutes par clampage du pédicule vasculaire rénale. Ce modèle permet néanmoins l'étude des conditions d'intérêt en limitant le nombre d'animaux, ce qui se justifie sur les plans éthique et économique.

Que ce soit pour l'apport d'oxygène en machine de perfusion ou pour l'ajout de curcumine, un antioxydant, à la solution de préservation par l'intermédiaire d'un complexe avec la cyclodextrine, un bénéfice indiscutable a été mis en avant en termes de reprise de fonction précoce et à long terme, avec notamment une réduction des lésions pro-fibrosantes et de fibrose à 3 mois.

Là encore, nos résultats obtenus sur un modèle préclinique permettent d'appliquer rapidement ces principes à l'homme.

Il serait intéressant d'étudier ces conditions de conservation hypothermiques en post-reconditionnement pour voir si le bénéfice de ces techniques, isolément ou en association, se maintient après un reconditionnement optimal de 4 heures de CRN. En effet, il est possible que les lésions induites par la période d'ischémie chaude soient déjà suffisamment corrigées par la CRN suivie de la conservation en MPH, et que le bénéfice de ces additifs ne soit plus discriminant dans les conditions actuelles de prélèvement. Un intérêt pourrait se dégager en cas d'extension des durées d'ischémie. La preuve d'un bénéfice est important notamment en termes de politique économique afin d'investir dans les technologies prometteuses.

4. Extension aux DDAC contrôlés

En France, les greffes rénales à partir des DDAC non contrôlés catégories I et II de Maastricht sont autorisées depuis 2006. L'activité est relativement stable avec un maximum annuel atteint en 2012 de 81 greffes. En 2017, seulement 57 greffes ont été réalisées dans ce contexte [6]. Les difficultés à développer ce type de prélèvement est probablement en lien avec les contraintes logistiques importantes du fait des délais d'ischémie chaude imposés par l'ABM. Depuis 2014, les prélèvements de la catégorie III (contrôlée) de Maastricht sont autorisés. En 2015, 27 greffes de ce type ont été réalisées, 86 en 2016 et 178 en 2017. La marge de progression semble importante du fait d'une meilleure adhérence des équipes de prélèvement, du fait notamment d'une logistique moins lourde (décision en amont de la limitation ou de l'arrêt des thérapeutiques actives permettant l'anticipation et l'organisation de la procédure).

En 2017, 17 greffes de reins issus de DDAC de type III ont été réalisées au centre hospitalier universitaire de Poitiers, ce qui classe l'établissement en troisième position sur 46 centres en termes de volume d'activité. Parallèlement à cet engouement clinique, la modélisation

préclinique du DDAC contrôlé est une perspective intéressante. La phase agonique de DDAC de type III a d'ailleurs déjà été mise au point au sein du laboratoire au cours d'un travail de thèse [184] et notre maîtrise du modèle de CRN et de la transplantation rénale chez le porc, en fait une perspective tout à fait accessible.

Ce travail s'inscrit là encore dans l'axe du plan greffe 3 de l'ABM (2017-2021) qui prévoit concernant la catégorie III de Maastricht, d'atteindre en 2021, 350 donneurs recensés éligibles au prélèvement par an avec un taux de conversion de 50% soit 175 donneurs prélevés et 400 greffes d'organes réalisées [7].

Outre le reconditionnement des organes abdominaux, la modélisation préclinique du DDAC contrôlé ouvre la voie de l'étude des organes thoraciques. Le poumon est en effet déjà greffé en clinique à partir de ces donneurs sous réserve d'un reconditionnement propre *ex vivo* [179, 180, 185, 186]. Depuis fin 2016, 5 prélèvements pulmonaires ont été réalisés dans ces conditions à Poitiers. La transplantation cardiaque est également une voie de recherche actuelle [187-191] et envisagée au sein du laboratoire.

5. Conclusion

Les DDAC sont une source prometteuse de greffons rénaux. Dans nos conditions expérimentales précliniques de DDAC non contrôlés, le reconditionnement par CRN d'au moins 4 heures suivi d'une préservation en MPH semble offrir un meilleur devenir au greffon. Les additifs en machine de perfusion doivent encore faire la preuve d'une plus-value dans les conditions actuelles de prélèvement. Si le nombre de transplantations issues des DDAC non contrôlés reste confidentiel, l'extension récente des donneurs à la catégorie III de Maastricht, fait qu'encore plus de greffons devraient être concernés par cette problématique. Ces résultats permettraient d'uniformiser les pratiques entre les équipes de greffe.

VALORISATION DU TRAVAIL

En plus des articles présentés dans ce manuscrit, le travail sur la CRN a fait l'objet de différentes communications.

Communications écrites :

- Evaluation préclinique de la transplantation rénale issue de donneurs décédés par arrêt cardiaque.

Allain G, Giraud S, Hébrard W, Thuillier R, Barrou B, Corbi P, Hauet T, Jayle C.

Journal de la Société de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire 2012;16:219-224.

- Reconditionnement des greffons rénaux issus des donneurs décédés par arrêt cardiaque : comparaison des techniques de refroidissement *in situ* et de circulation régionale normothermique sur un modèle porcin d'allogreffe.

Allain G, Giraud S, Thuret R, Hauet T, Corbi P, Jayle C.

Journal de la Société de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire 2015;19:1-6.

Communications orales (en tant qu'orateur principal) :

Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire :

- Evaluation pré-clinique de la transplantation rénale issue de donneur à cœur arrêté.

G. Allain, S. Giraud, W. Hebrard, R. Thuillier, B. Barrou, P. Corbi, T. Hauet, C. Jayle.

64^{ème} congrès – LYON – 27/05/2011

Prix de la meilleure communication orale

- Greffons rénaux issus des donneurs décédés par arrêt cardiaque : la circulation régionale normothermique permet un meilleur reconditionnement.

G. Allain, S. Giraud, R. Thuret, T. Hauet, P. Corbi, C. Jayle.

68^{ème} congrès – MARSEILLE – 11/06/2015

Société Francophone de Transplantation :

Mise au point d'un modèle expérimental porcin de prise en charge d'un donneur décédé par arrêt cardiaque par mise en place d'une circulation régionale normothermique.

G. Allain, S. Giraud, R. Thuillier, C. Jayle, W. Hebrard, R. Thuret, B. Barrou, T. Hauet.

10^{ème} congrès – GENEVE – 16/12/2009

European Society for Organ Transplantation:

A pre-clinical evaluation of renal transplant from deceased after cardiac arrest donors.

G. Allain, S. Giraud, W. Hebrard, C. Jayle, R. Thuillier, R. Thuret, T. Hauet, B. Barrou.

15^{ème} congrès – GLASGOW – 05/09/2011

Académie Nationale de Chirurgie - Association Française de Chirurgie :

Evaluation pré-clinique des greffons rénaux issus des donneurs décédés par arrêt cardiaque reconditionnés par circulation régionale normothermique.

G. Allain, S. Giraud, W. Hebrard, R. Thuillier, B. Barrou, P. Corbi, T. Hauet, C. Jayle.

Forum de recherche chirurgicale – PARIS – 04/10/2012

Poster commenté :

Donneur décédé par arrêt cardiaque : étude préclinique de l'hémostase et de l'inflammation lors d'une circulation régionale normothermique.

G. Allain, T. Kerforne, S. Giraud, W. Hébrard, V. Ameteau, M. Pinsard, T. Hauet, P. Corbi, C. Jayle

70^{ème} congrès – MARSEILLE – 09/06/2017

REFERENCES

- [1] Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, Klarenbach S, Gill J. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant*. 2011 Oct;11(10):2093-109.
- [2] Axelrod DA, Schnitzler MA, Xiao H, Irish W, Tuttle-Newhall E, Chang SH, Kasiske BL, Alhamad T, Lentine KL. An economic assessment of contemporary kidney transplant practice. *Am J Transplant*. 2018 May;18(5):1168-1176
- [3] Bozkurt B, Kılıç M. Marginal Donors in Renal Transplantation. *Transplant Proc*. 2015 Jun;47(5):1273-81.
- [4] Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Wilk AR, Robinson A, Wainright JL, Haynes CR, Snyder JJ, Kasiske BL, Israni AK. OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant*. 2018 Jan;18 Suppl 1:18-113.
- [5] <https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=803150+020288+Statistical+Report+2017+%28online%2913.pdf>
- [6] <https://www.agencebiomedecine.fr/annexes/bilan2017/donnees/organes/06rein/synthese.htm>
- [7] https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/plan_2017-2021_pour_la_greffe_d_organes_et_de_tissus.pdf
- [8] Maggiore U, Oberbauer R, Pascual J, Viklicky O, Dudley C, Budde K, Sorensen SS, Hazzan M, Klinger M, Abramowicz D; ERA-EDTA-DESCARTES Working Group. Strategies to increase the donor pool and access to kidney transplantation: an international perspective. *Nephrol Dial Transplant*. 2015 Feb;30(2):217-22.
- [9] Tso PL, Dar WA, Henry ML. With respect to elderly patients: finding kidneys in the context of new allocation concepts. *Am J Transplant*. 2012 May;12(5):1091-8.
- [10] Pascual J, Zamora J, Pirsch JD. A systematic review of kidney transplantation from expanded criteria donors. *Am J Kidney Dis*. 2008 Sep;52(3):553-86.
- [11] Palkoci B, Vojtko M, Fialová J, Osinová D, Lajčiaková M. Results of Kidney Transplantation from Expanded Criteria Donors: A Single-Center Experience. *Int J Organ Transplant Med*. 2018;9(1):1-9.

- [12] Davis CL, Delmonico FL. Living-donor kidney transplantation: a review of the current practices for the live donor. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Jul;16(7):2098-110.
- [13] Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP. Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc*. 1995 Oct;27(5):2893-4.
- [14] Domínguez-Gil B, Haase-Kromwijk B, Van Leiden H, Neuberger J, Coene L, Morel P, Corinne A, Muehlbacher F, Brezovsky P, Costa AN, Rozental R, Matesanz R; European Committee (Partial Agreement) on Organ Transplantation. Council of Europe (CD-P-TO). Current situation of donation after circulatory death in European countries. *Transpl Int*. 2011 Jul;24(7):676-86.
- [15] Domínguez-Gil B, Duranteau J, Mateos A, Núñez JR, Cheisson G, Corral E, De Jongh W, Del Río F, Valero R, Coll E, Thuong M, Akhtar MZ, Matesanz R. Uncontrolled donation after circulatory death: European practices and recommendations for the development and optimization of an effective programme. *Transpl Int*. 2016 Aug;29(8):842-59.
- [16] Oniscu GC, Randle LV, Muiesan P, Butler AJ, Currie IS, Perera MT, Forsythe JL, Watson CJ. In situ normothermic regional perfusion for controlled donation after circulatory death--the United Kingdom experience. *Am J Transplant*. 2014 Dec;14(12):2846-54.
- [17] Thuong M, Ruiz A, Evrard P, Kuiper M, Boffa C, Akhtar MZ, Neuberger J, Ploeg R. New classification of donation after circulatory death donors definitions and terminology. *Transpl Int*. 2016 Jul;29(7):749-59.
- [18] Benoit G, Bensadoun H, Borie I, Vavasseur G, Gillot C. A double balloon catheter for the procurement of abdominal organs. *Ann Urol (Paris)*. 1990;24(3):199-201.
- [19] Lazzeri C, Bonizzoli M, Valente S, Cianchi G, Migliaccio ML, Gensini GF, Peris A. The role of extracorporeal membrane oxygenation in donation after circulatory death. *Minerva Anesthesiol*. 2014 Nov;80(11):1217-27.
- [20] Johnson LB, Plotkin JS, Howell CD, Njoku MJ, Kuo PC, Bartlett ST. Successful emergency transplantation of a liver allograft from a donor maintained on extracorporeal membrane oxygenation. *Transplantation*. 1997 Mar 27;63(6):910-1.
- [21] Shapey IM, Muiesan P. Regional perfusion by extracorporeal membrane oxygenation of abdominal organs from donors after circulatory death: a systematic review. *Liver Transpl*. 2013 Dec;19(12):1292-303.

[22] Valero R, Cabrer C, Oppenheimer F, Trias E, Sánchez-Ibáñez J, De Cabo FM, Navarro A, Paredes D, Alcaraz A, Gutiérrez R, Manyalich M. Normothermic recirculation reduces primary graft dysfunction of kidneys obtained from non-heart-beating donors. *Transpl Int.* 2000;13(4):303-10.

[23] Demiselle J, Augusto JF, Videcoq M, Legeard E, Dubé L, Templier F, Renaudin K, Sayegh J, Karam G, Blanche G, Dantal J. Transplantation of kidneys from uncontrolled donation after circulatory determination of death: comparison with brain death donors with or without extended criteria and impact of normothermic regional perfusion. *Transpl Int.* 2016 Apr;29(4):432-42.

[24] Delsuc C, Faure A, Berthiller J, Dorez D, Matillon X, Meas-Yedid V, Floccard B, Marcotte G, Labeye V, Rabeyrin M, Coudas R, Chauvet C, Robinson P, Morelon E, Badet L, Hanf W, Rimmelé T. Uncontrolled donation after circulatory death: comparison of two kidney preservation protocols on graft outcomes. *BMC Nephrol.* 2018 Jan 8;19(1):3.

[25] Arias-Diaz J, Alvarez J, del Barrio MR, Balibrea JL. Non-heart-beating donation: current state of the art. *Transplant Proc.* 2004 Sep;36(7):1891-3.

[26] Alonso A, Fernández-Rivera C, Villaverde P, Oliver J, Cillero S, Lorenzo D, Valdés F. Renal transplantation from non-heart-beating donors: a single-center 10-year experience. *Transplant Proc.* 2005 Nov;37(9):3658-60.

[27] Sanni AO, Wilson CH, Wyrley-Birch H, Vijayanand D, Navarro A, Gok MA, Sohrabi S, Jaques B, Rix D, Soomro N, Manas D, Talbot D. Non-heart-beating kidney transplantation: 6-year outcomes. *Transplant Proc.* 2006 Dec;38(10):3396-7.

[28] Dupriez F, De Pauw L, Darius T, Mourad M, Penaloza A, Van Deynse D, Baltus C, Verschuren F. Fourteen years of experience in uncontrolled organ donation after cardio-circulatory death. *Transplant Proc.* 2014 Nov;46(9):3134-7.

[29] Nicholson ML, Metcalfe MS, White SA, Waller JR, Doughman TM, Horsburgh T, Feehally J, Carr SJ, Veitch PS. A comparison of the results of renal transplantation from non-heart-beating, conventional cadaveric, and living donors. *Kidney Int.* 2000 Dec;58(6):2585-91.

[30] Barlow AD, Metcalfe MS, Johari Y, Elwell R, Veitch PS, Nicholson ML. Case-matched comparison of long-term results of non-heart beating and heart-beating donor renal transplants. *Br J Surg.* 2009 Jun;96(6):685-91.

[31] Fieux F, Losser MR, Bourgeois E, Bonnet F, Marie O, Gaudez F, Abboud I, Donay JL, Roussin F, Mourey F, Adnet F, Jacob L. Kidney retrieval after sudden out of hospital refractory cardiac arrest: a cohort of uncontrolled non heart beating donors. *Crit Care.* 2009;13(4):R141.

- [32] de Gracia MC, Osorio JM, Pérez-Villares JM, Galindo P, Ruiz MC, Pérez-Marfil A, Bravo J, Osuna A. A new program of kidney transplantation from donors after cardiac death in Spain. *Transplant Proc.* 2012 Nov;44(9):2518-20.
- [33] Toapanta Gaibor NG, González-Roncero FM, Cintra Cabrera M, Suñer Poblet M, Bernal Blanco G, Suarez Benjumea A, Pérez-Valdivia MA, Egea-Guerrero JJ, Rocha Castilla JL, Gentil Govantes MA. Survival and Evolution of Renal Function in Kidney Transplant Recipients From Type II Asystolic Donations: A Single-center Experience. *Transplant Proc.* 2018 Mar;50(2):565-568.
- [34] Farney AC, Singh RP, Hines MH, Rogers J, Hartmann EL, Reeves-Daniel A, Gautreaux MD, Iskandar SS, Adams PL, Stratta RJ. Experience in renal and extrarenal transplantation with donation after cardiac death donors with selective use of extracorporeal support. *J Am Coll Surg.* 2008 May;206(5):1028-37; discussion 1037.
- [35] Sánchez-Fructuoso AI, Prats D, Torrente J, Pérez-Contín MJ, Fernández C, Alvarez J, Barrientos A. Renal transplantation from non-heart beating donors: a promising alternative to enlarge the donor pool. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Feb;11(2):350-8.
- [36] Lee CY, Tsai MK, Ko WJ, Chang CJ, Hu RH, Chueh SC, Lai MK, Lee PH. Expanding the donor pool: use of renal transplants from non-heart-beating donors supported with extracorporeal membrane oxygenation. *Clin Transplant.* 2005 Jun;19(3):383-90.
- [37] Molina M, Guerrero-Ramos F, Fernández-Ruiz M, González E, Cabrera J, Morales E, Gutierrez E, Hernández E, Polanco N, Hernández A, Praga M, Rodríguez-Antolín A, Pamplona M, de la Rosa F, Cavero T, Chico M, Villar A, Justo I, Andrés A. Kidney transplant from uncontrolled donation after circulatory death donors maintained by nECMO has long-term outcomes comparable to standard criteria donation after brain death. *Am J Transplant.* 2018 Jun 27.
- [38] Ortega-Deballon I, Hornby L, Shemie SD. Protocols for uncontrolled donation after circulatory death: a systematic review of international guidelines, practices and transplant outcomes. *Crit Care.* 2015 Jun 24;19:268.
- [39] van Heurn LW, Talbot D, Nicholson ML, Akhtar MZ, Sanchez-Fructuoso AI, Weekers L, Barrou B. Recommendations for donation after circulatory death kidney transplantation in Europe. *Transpl Int.* 2016 Jul;29(7):780-9.
- [40] Wind J, Faut M, van Smaalen TC, van Heurn EL. Variability in protocols on donation after circulatory death in Europe. *Crit Care.* 2013 Oct 3;17(5):R217.

- [41] Peters-Sengers H, Homan van der Heide JJ, Heemskerk MBA, Ten Berge IJM, Uite FCW, Idu MM, Betjes MGH, van Zuilen AD, Christiaans MHL, Hilbrands LH, de Vries APJ, Nurmohamed AS, Berger SP, Bemelman FJ. Similar 5-Year Estimated Glomerular Filtration Rate Between Kidney Transplants From Uncontrolled and Controlled Donors After Circulatory Death-A Dutch Cohort Study. *Transplantation*. 2017 Jun;101(6):1144-1151.
- [42] Antoine C, Brun F, Tenaillon A, Loty B. Organ procurement and transplantation from non-heart-beating donors. *Nephrol Ther*. 2008 Feb;4(1):5-14. Epub 2007 Oct 24.
- [43] Chen CC, Chapman WC, Hanto DW. Ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2015 Jan 1;7:117-34.
- [44] Soullier S, Gayraud N, Méjean C, Swarcz I, Mourad G, Argilés A. [Molecular mechanisms involved in kidney ischemia-reperfusion]. *Nephrol Ther*. 2005 Nov;1(5):315-21.
- [45] Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2000 Jul;9(4):427-34.
- [46] Ponticelli C. Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Jun;29(6):1134-40.
- [47] Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc*. 2008 Dec;40(10):3279-88.
- [48] Chatauret N, Badet L, Barrou B, Hauet T. Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury. *Prog Urol*. 2014 Jun;24 Suppl 1:S4-12.
- [49] Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant*. 2015 Jun 24;5(2):52-67.
- [50] Fung A, Zhao H, Yang B, Lian Q, Ma D. Ischaemic and inflammatory injury in renal graft from brain death donation: an update review. *J Anesth*. 2016 Apr;30(2):307-16.
- [51] Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Aug;14(8):2199-210.
- [52] Saat TC, van den Akker EK, IJzermans JN, Dor FJ, de Bruin RW. Improving the outcome of kidney transplantation by ameliorating renal ischemia reperfusion injury: lost in translation? *J Transl Med*. 2016 Jan 20;14:20.

- [53] Menke J, Sollinger D, Schamberger B, Heemann U, Lutz J. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft. *Curr Opin Organ Transplant*. 2014 Aug;19(4):395-400.
- [54] Chandel NS, Budinger GR. The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radic Biol Med*. 2007 Jan 15;42(2):165-74.
- [55] Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med*. 2000 Dec 1;109(8):665-78.
- [56] Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Feb;282(2):C227-41.
- [57] Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*. 2015 Dec;6:524-51.
- [58] Patschan D, Patschan S, Müller GA. Inflammation and microvasculopathy in renal ischemia reperfusion injury. *J Transplant*. 2012;2012:764154.
- [59] Lu CY, Hartono J, Senitko M, Chen J. The inflammatory response to ischemic acute kidney injury: a result of the 'right stuff' in the 'wrong place'? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2007 Mar;16(2):83-9.
- [60] Gu L, Tao Y, Chen C, Ye Y, Xiong X, Sun Y. Initiation of the inflammatory response after renal ischemia/reperfusion injury during renal transplantation. *Int Urol Nephrol*. 2018 Jul 4.
- [61] Kezić A, Stajic N, Thaïss F. Innate Immune Response in Kidney Ischemia/Reperfusion Injury: Potential Target for Therapy. *J Immunol Res*. 2017;2017:6305439.
- [62] Zhao H, Perez JS, Lu K, George AJ, Ma D. Role of Toll-like receptor-4 in renal graft ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014 Apr 15;306(8):F801-11.
- [63] Nankivell BJ, Kuypers DR. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet*. 2011 Oct 15;378(9800):1428-37.
- [64] Zhao H, Alam A, Soo AP, George AJT, Ma D. Ischemia-Reperfusion Injury Reduces Long Term Renal Graft Survival: Mechanism and Beyond. *EBioMedicine*. 2018 Feb;28:31-42.
- [65] Mella A, Messina M, Lavacca A, Biancone L. Complement cascade and kidney transplantation: The rediscovery of an ancient enemy. *World J Transplant*. 2014 Sep 24;4(3):168-75.
- [66] Danobeitia JS, Djamali A, Fernandez LA. The role of complement in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury and fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2014 Nov 1;7:16.

- [67] Cravedi P, Heeger PS. Complement as a multifaceted modulator of kidney transplant injury. *J Clin Invest*. 2014 Jun;124(6):2348-54.
- [68] Grigoryev DN, Cheranova DI, Heruth DP, Huang P, Zhang LQ, Rabb H, Ye SQ. Meta-analysis of molecular response of kidney to ischemia reperfusion injury for the identification of new candidate genes. *BMC Nephrol*. 2013 Oct 24;14:231.
- [69] de Vries DK, Wijermars LG, Reinders ME, Lindeman JH, Schaapherder AF. Donor pre-treatment in clinical kidney transplantation: a critical appraisal. *Clin Transplant*. 2013 Nov-Dec;27(6):799-808.
- [70] Schröppel B, Legendre C. Delayed kidney graft function: from mechanism to translation. *Kidney Int*. 2014 Aug;86(2):251-8.
- [71] Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet*. 2004 Nov 13-19;364(9447):1814-27.
- [72] De Rosa S, Antonelli M, Ronco C. Hypothermia and kidney: a focus on ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Feb 1;32(2):241-247.
- [73] Barrou B, Chatauret N, Hauet T, Thuret R, Kleinclauss F, Timsit MO, Codas R, Matillon X, Badet L. [Ischemia-reperfusion. Preservation solution and hypothermic machine perfusion]. *Prog Urol*. 2016 Nov;26(15):964-976.
- [74] Faure JP, Hauet T, Han Z, Goujon JM, Petit I, Mauco G, Eugene M, Carretier M, Papadopoulos V. Polyethylene glycol reduces early and long-term cold ischemia-reperfusion and renal medulla injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Sep;302(3):861-70.
- [75] Giraud S, Codas R, Hauet T, Eugene M, Badet L. Polyethylene glycols and organ protection against I/R injury. *Prog Urol*. 2014 Jun;24 Suppl 1:S37-43.
- [76] Catena F, Coccolini F, Montori G, Vallicelli C, Amaduzzi A, Ercolani G, Ravaioli M, Del Gaudio M, Schiavina R, Brunocilla E, Liviano G, Feliciangeli G, Pinna AD. Kidney preservation: review of present and future perspective. *Transplant Proc*. 2013 Nov;45(9):3170-7.
- [77] Wang X, Xu M, Jia J, Zhang Z, Gaut JP, Upadhyga GA, Manning PT, Lin Y, Chapman WC. CD47 blockade reduces ischemia/reperfusion injury in donation after cardiac death rat kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2018 Apr;18(4):843-854.
- [78] Jager NM, Poppelaars F, Daha MR, Seelen MA. Complement in renal transplantation: The road to translation. *Mol Immunol*. 2017 Sep;89:22-35.

- [79] Saint Yves T, Delpech PO, Giraud S, Thuillier R, Hauet T. Additives to preservation solutions. *Prog Urol*. 2014 Jun;24 Suppl 1:S31-6.
- [80] Yu ZX, Qi S, Lasaro MA, Bouchard K, Dow C, Moore K, Wu Z, Barama A, Xu J, Johnson K, Marozsan AJ, Wang Y. Targeting Complement Pathways During Cold Ischemia and Reperfusion Prevents Delayed Graft Function. *Am J Transplant*. 2016 Sep;16(9):2589-97.
- [81] Delpech PO, Thuillier R, SaintYves T, Danion J, Le Pape S, van Amersfoort ES, Oortwijn B, Blancho G, Hauet T. Inhibition of complement improves graft outcome in a pig model of kidney autotransplantation. *J Transl Med*. 2016 Sep 23;14(1):277.
- [82] Cau J, Favreau F, Zhang K, Febrer G, de la Motte GR, Ricco JB, Goujon JM, Hauet T. FR167653 improves renal recovery and decreases inflammation and fibrosis after renal ischemia reperfusion injury. *J Vasc Surg*. 2009 Mar;49(3):728-40.
- [83] Powell JT, Tsapepas DS, Martin ST, Hardy MA, Ratner LE. Managing renal transplant ischemia reperfusion injury: novel therapies in the pipeline. *Clin Transplant*. 2013 Jul-Aug;27(4):484-91.
- [84] O'Neill S, Ross JA, Wigmore SJ, Harrison EM. The role of heat shock protein 90 in modulating ischemia-reperfusion injury in the kidney. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012 Oct;21(10):1535-48.
- [85] Farrar CA, Keogh B, McCormack W, O'Shaughnessy A, Parker A, Reilly M, Sacks SH. Inhibition of TLR2 promotes graft function in a murine model of renal transplant ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*. 2012 Feb;26(2):799-807.
- [86] van den Akker EK, Dor FJ, IJzermans JN, de Bruin RW. MicroRNAs in Kidney Transplantation: Living up to Their Expectations? *J Transplant*. 2015;2015:354826.
- [87] Wystrychowski W, Wystrychowski G, Zukowska-Szczechowska E, Obuchowicz E, Grzeszczak W, Więcek A, Wystrychowski A. Nephroprotective effect of pentoxifylline in renal ischemia-reperfusion in rat depends on the timing of its administration. *Transplant Proc*. 2014 Oct;46(8):2555-7.
- [88] Lin Y, Manning PT, Jia J, Gaut JP, Xiao Z, Capoccia BJ, Chen CC, Hiebsch RR, Upadhyay G, Mohanakumar T, Frazier WA, Chapman WC. CD47 blockade reduces ischemia-reperfusion injury and improves outcomes in a rat kidney transplant model. *Transplantation*. 2014 Aug 27;98(4):394-401.
- [89] Qiao X, Li RS, Li H, Zhu GZ, Huang XG, Shao S, Bai B. Intermedin protects against renal ischemia-reperfusion injury by inhibition of oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013 Jan 1;304(1):F112-9.

- [90] Ambrosi N, Guerrieri D, Caro F, Sanchez F, Haeublein G, Casadei D, Incardona C, Chuluyan E. Alpha Lipoic Acid: A Therapeutic Strategy that Tend to Limit the Action of Free Radicals in Transplantation. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 4;19(1). pii: E102.
- [91] Zou C, Hu H, Xi X, Shi Z, Wang G, Huang X. Pioglitazone protects against renal ischemia-reperfusion injury by enhancing antioxidant capacity. *J Surg Res*. 2013 Oct;184(2):1092-5.
- [92] Jin SA, Kim SK, Seo HJ, Jeong JY, Ahn KT, Kim JH, Choi DE, Park JH, Lee JH, Choi SW, Seong IW, Kim SH, Suh KS, Jeong JO. Beneficial Effects of Necrosis Modulator, Indole Derivative NecroX-7, on Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Transplant Proc*. 2016 Jan-Feb;48(1):199-204.
- [93] Mehrabi A, Mood ZhA, Sadeghi M, Schmied BM, Müller SA, Welsch T, Kuttymuratov G, Wente MN, Weitz J, Zeier M, Morath Ch, Riediger C, Schemmer P, Encke J, Büchler MW, Schmidt J. Thymoglobulin and ischemia reperfusion injury in kidney and liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Sep;22 Suppl 8:viii54-viii60.
- [94] Tillet S, Giraud S, Delpech PO, Thuillier R, Ameteau V, Goujon JM, Renelier B, Macchi L, Hauet T, Mauco G. Kidney graft outcome using an anti-Xa therapeutic strategy in an experimental model of severe ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 2015 Jan;102(1):132-42; discussion 142.
- [95] Wang PH, Schwindt TT, Barnabé GF, Motta FL, Semedo P, Beraldo FC, Mazzali M, Dos Reis MA, Teixeira Vde P, Pacheco-Silva A, Mello LE, Câmara NO. Administration of neural precursor cells ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2009;112(1):e20-8.
- [96] Bagul A, Frost JH, Drage M. Stem cells and their role in renal ischaemia reperfusion injury. *Am J Nephrol*. 2013;37(1):16-29.
- [97] Rowart P, Erpicum P, Detry O, Weekers L, Grégoire C, Lechanteur C, Briquet A, Beguin Y, Krzesinski JM, Jouret F. Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Ischemia/Reperfusion Injury. *J Immunol Res*. 2015;2015:602597.
- [98] Sierra-Parraga JM, Eijken M, Hunter J, Moers C, Leuvenink H, Møller B, Ploeg RJ, Baan CC, Jespersen B, Hoogduijn MJ. Mesenchymal Stromal Cells as Anti-Inflammatory and Regenerative Mediators for Donor Kidneys During Normothermic Machine Perfusion. *Stem Cells Dev*. 2017 Aug 15;26(16):1162-1170.
- [99] Hosgood SA, van Heurn E, Nicholson ML. Normothermic machine perfusion of the kidney: better conditioning and repair? *Transpl Int*. 2015 Jun;28(6):657-64.

- [100] Thuillier R, Dutheil D, Trieu MT, Mallet V, Allain G, Rousselot M, Denizot M, Goujon JM, Zal F, Hauet T. 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.
- [101] Dugbartey GJ, Bouma HR, Saha MN, Lobb I, Henning RH, Sener A. A Hibernation-Like State for Transplantable Organs: Is Hydrogen Sulfide Therapy the Future of Organ Preservation? *Antioxid Redox Signal*. 2018 Jun 1;28(16):1503-1515.
- [102] Lobb I, Mok A, Lan Z, Liu W, Garcia B, Sener A. Supplemental hydrogen sulphide protects transplant kidney function and prolongs recipient survival after prolonged cold ischaemia-reperfusion injury by mitigating renal graft apoptosis and inflammation. *BJU Int*. 2012 Dec;110(11 Pt C):E1187-95.
- [103] Zhu JX, Kalbfleisch M, Yang YX, Bihari R, Lobb I, Davison M, Mok A, Cepinskas G, Lawendy AR, Sener A. Detrimental effects of prolonged warm renal ischaemia-reperfusion injury are abrogated by supplemental hydrogen sulphide: an analysis using real-time intravital microscopy and polymerase chain reaction. *BJU Int*. 2012 Dec;110(11 Pt C):E1218-27.
- [104] van Erp AC, van Dullemen LFA, Ploeg RJ, Leuvenink HGD. Systematic review on the treatment of deceased organ donors. *Transplant Rev (Orlando)*. 2018 Jun 22. pii: S0955-470X(18)30004-1.
- [105] Stokfisz K, Ledakowicz-Polak A, Zagorski M, Zielinska M. Ischaemic preconditioning - Current knowledge and potential future applications after 30 years of experience. *Adv Med Sci*. 2017 Sep;62(2):307-316.
- [106] Jonker SJ, Menting TP, Warlé MC, Ritskes-Hoitinga M, Wever KE. Preclinical Evidence for the Efficacy of Ischemic Postconditioning against Renal Ischemia-Reperfusion Injury, a Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Mar 10;11(3):e0150863.
- [107] MacAllister R, Clayton T, Knight R, Robertson S, Nicholas J, Motwani M, Veighey K. REmote preconditioning for Protection Against Ischaemia-Reperfusion in renal transplantation (REPAIR): a multicentre, multinational, double-blind, factorial designed randomised controlled trial. Southampton (UK): NIHR Journals Library; 2015 May.
- [108] Thuret R, Saint Yves T, Tillou X, Chatauret N, Thuillier R, Barrou B, Billault C. Ischemic pre- and post-conditioning: current clinical applications. *Prog Urol*. 2014 Jun;24 Suppl 1:S56-61.

- [109] Jia RP, Xie JJ, Luo FY, Zhu JG. Ischemic preconditioning improves rat kidney allograft function after ischemia/reperfusion injury: the role of tumor necrosis factor- α . *Transplant Proc.* 2008 Dec;40(10):3316-20.
- [110] Krogstrup NV, Oltean M, Bibby BM, Nieuwenhuijs-Moeke GJ, Dor FJ, Birn H, Jespersen B. Remote ischaemic conditioning on recipients of deceased renal transplants, effect on immediate and extended kidney graft function: a multicentre, randomised controlled trial protocol (CONTEXT). *BMJ Open.* 2015 Aug 20;5(8):e007941.
- [111] Krogstrup NV, Oltean M, Nieuwenhuijs-Moeke GJ, Dor FJ, Møldrup U, Krag SP, Bibby BM, Birn H, Jespersen B. Remote Ischemic Conditioning on Recipients of Deceased Renal Transplants Does Not Improve Early Graft Function: A Multicenter Randomized, Controlled Clinical Trial. *Am J Transplant.* 2017 Apr;17(4):1042-1049.
- [112] Akhtar MZ, Sutherland AI, Huang H, Ploeg RJ, Pugh CW. The role of hypoxia-inducible factors in organ donation and transplantation: the current perspective and future opportunities. *Am J Transplant.* 2014 Jul;14(7):1481-7.
- [113] Burgos Revilla FJ, Hevia V, Diez V, Carracedo D, Gomis A, Orosa A, Alvarez S, Gomez V. Machine perfusion: initial results in an expanded criteria donor kidney transplant program. *Transplant Proc.* 2015 Jan-Feb;47(1):19-22.
- [114] Hosgood SA, Thompson E, Moore T, Wilson CH, Nicholson ML. Normothermic machine perfusion for the assessment and transplantation of declined human kidneys from donation after circulatory death donors. *Br J Surg.* 2018 Mar;105(4):388-394.
- [115] Jochmans I, O'Callaghan JM, Pirenne J, Ploeg RJ. Hypothermic machine perfusion of kidneys retrieved from standard and high-risk donors. *Transpl Int.* 2015 Jun;28(6):665-76.
- [116] Reznik ON, Bagnenko SF, Loginov IV, Iljina VA, Ananyev AN, Eremich SV, MoysyukYG. Machine perfusion as a tool to select kidneys recovered from uncontrolled donors after cardiac death. *Transplant Proc.* 2008 May;40(4):1023-6.
- [117] de Vries EE, Hoogland ER, Winkens B, Snoeijs MG, van Heurn LW. Renovascular resistance of machine-perfused DCD kidneys is associated with primary nonfunction. *Am J Transplant.* 2011 Dec;11(12):2685-91.
- [118] Kathis JM, Paul A, Robinson LA, Selzner M. Ex vivo machine perfusion for renal graft preservation. *Transplant Rev (Orlando).* 2018 Jan;32(1):1-9.

- [119] Hameed AM, Pleass HC, Wong G, Hawthorne WJ. Maximizing kidneys for transplantation using machine perfusion: from the past to the future: A comprehensive systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Oct;95(40):e5083.
- [120] Martínez Arcos L, Fabuel Alcañiz JJ, Gómez Dos Santos V, Burgos Revilla FJ. Functional Results of Renal Preservation in Hypothermic Pulsatile Machine Perfusion Versus Cold Preservation: Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Transplant Proc*. 2018 Jan - Feb;50(1):24-32.
- [121] Cannon RM, Brock GN, Garrison RN, Smith JW, Marvin MR, Franklin GA. To pump or not to pump: a comparison of machine perfusion vs cold storage for deceased donor kidney transplantation. *J Am Coll Surg*. 2013 Apr;216(4):625-33; discussion 633-4.
- [122] Wang W, Xie D, Hu X, Yin H, Liu H, Zhang X. Effect of Hypothermic Machine Perfusion on the Preservation of Kidneys Donated After Cardiac Death: A Single-Center, Randomized, Controlled Trial. *Artif Organs*. 2017 Aug;41(8):753-758.
- [123] Moers C, Smits JM, Maathuis MH, Treckmann J, van Gelder F, Napieralski BP, van Kasterop-Kutz M, van der Heide JJ, Squifflet JP, van Heurn E, Kirste GR, Rahmel A, Leuvenink HG, Paul A, Pirenne J, Ploeg RJ. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2009 Jan 1;360(1):7-19.
- [124] Forde JC, Shields WP, Azhar M, Daly PJ, Zimmermann JA, Smyth GP, Eng MP, Power RE, Mohan P, Hickey DP, Little DM. Single centre experience of hypothermic machine perfusion of kidneys from extended criteria deceased heart-beating donors: a comparative study. *Ir J Med Sci*. 2016 Feb;185(1):121-5.
- [125] Jiao B, Liu S, Liu H, Cheng D, Cheng Y, Liu Y. Hypothermic machine perfusion reduces delayed graft function and improves one-year graft survival of kidneys from expanded criteria donors: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013 Dec 10;8(12):e81826.
- [126] Zhong Z, Lan J, Ye S, Liu Z, Fan L, Zhang Y, Fu Z, Qiao B, Shiu-Chung Ko D, Wang Y, Ye Q. Outcome Improvement for Hypothermic Machine Perfusion Versus Cold Storage for Kidneys From Cardiac Death Donors. *Artif Organs*. 2017 Jul;41(7):647-653.
- [127] Yao L, Zhou H, Wang Y, Wang G, Wang W, Chen M, Zhang K, Fu Y. Hypothermic Machine Perfusion in DCD Kidney Transplantation: A Single Center Experience. *Urol Int*. 2016;96(2):148-51.
- [128] Matillon X, Danjou F, Petruzzio P, Thaunat O, Rimmele T, Delsuc C, Faure A, Rabeyrin M, Meas Yedid V, Hanf W, Morelon E, Badet L, Coudas R. Hypothermic pulsatile preservation of kidneys

from uncontrolled deceased donors after cardiac arrest - a retrospective study. *Transpl Int*. 2017 Dec;30(12):1284-1291.

[129] Hoyer DP, Gallinat A, Swoboda S, Wohlschläger J, Rauen U, Paul A, Minor T. Subnormothermic machine perfusion for preservation of porcine kidneys in a donation after circulatory death model. *Transpl Int*. 2014 Oct;27(10):1097-106.

[130] Blum MF, Liu Q, Soliman B, Dreher P, Okamoto T, Poggio ED, Goldfarb DA, Baldwin WM 3rd, Quintini C. Comparison of normothermic and hypothermic perfusion in porcine kidneys donated after cardiac death. *J Surg Res*. 2017 Aug;216:35-45.

[131] Nicholson ML, Hosgood SA. Renal transplantation after ex vivo normothermic perfusion: the first clinical study. *Am J Transplant*. 2013 May;13(5):1246-52.

[132] Tillou X, Thuret R, Doerfler A; CTAFU. Ischemia/reperfusion during normothermic perfusion. *Prog Urol*. 2014 Jun;24 Suppl 1:S51-5.

[133] Parissis H, Mbarushimana S, Ramesh BC, Parissis M, Lampridis S, Mhandu P, Al-Alao B. The impact of off-pump surgery in end-organ function: practical end-points. *J Cardiothorac Surg*. 2015 Nov 10;10:159.

[134] De Somer F. Optimization of the perfusion circuit and its possible impact on the inflammatory response. *J Extra Corpor Technol*. 2007 Dec;39(4):285-8.

[135] Raja SG, Berg GA. Impact of off-pump coronary artery bypass surgery on systemic inflammation: current best available evidence. *J Card Surg*. 2007 Sep-Oct;22(5):445-55.

[136] Shann KG, Likosky DS, Murkin JM, Baker RA, Baribeau YR, DeFoe GR, Dickinson TA, Gardner TJ, Grocott HP, O'Connor GT, Rosinski DJ, Sellke FW, Willcox TW. An evidence-based review of the practice of cardiopulmonary bypass in adults: a focus on neurologic injury, glycemic control, hemodilution, and the inflammatory response. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 Aug;132(2):283-90.

[137] Warren OJ, Smith AJ, Alexiou C, Rogers PL, Jawad N, Vincent C, Darzi AW, Athanasiou T. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1--mechanisms of pathogenesis. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2009 Apr;23(2):223-31.

[138] Gourlay T. Biomaterial development for cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 2001 Sep;16(5):381-90.

- [139] Peek GJ, Firmin RK. The inflammatory and coagulative response to prolonged extracorporeal membrane oxygenation. *ASAIO J.* 1999 Jul-Aug;45(4):250-63.
- [140] Ben-Abraham R, Weinbroum AA, Dekel B, Paret G. Chemokines and the inflammatory response following cardiopulmonary bypass--a new target for therapeutic intervention?--A review. *Paediatr Anaesth.* 2003 Oct;13(8):655-61.
- [141] Millar JE, Fanning JP, McDonald CI, McAuley DF, Fraser JF. The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a review of the pathophysiology. *Crit Care.* 2016 Nov 28;20(1):387.
- [142] Kumar AB, Suneja M. Cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury. *Anesthesiology.* 2011 Apr;114(4):964-70.
- [143] Baikoussis NG, Papakonstantinou NA, Apostolakis E. The "benefits" of the mini-extracorporeal circulation in the minimal invasive cardiac surgery era. *J Cardiol.* 2014 Jun;63(6):391-6.
- [144] McDonald CI, Fraser JF, Coombes JS, Fung YL. Oxidative stress during extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014 Dec;46(6):937-43.
- [145] Boodram S, Evans E. Use of leukocyte-depleting filters during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a review. *J Extra Corpor Technol.* 2008 Mar;40(1):27-42.
- [146] Ng CS, Wan S. Limiting inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pharmaceutical strategies. *Curr Opin Pharmacol.* 2012 Apr;12(2):155-9.
- [147] Salameh A, Dhein S. Strategies for Pharmacological Organoprotection during Extracorporeal Circulation Targeting Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Pharmacol.* 2015 Dec 22;6:296.
- [148] Landis RC, Brown JR, Fitzgerald D, Likosky DS, Shore-Lesserson L, Baker RA, Hammon JW. Attenuating the Systemic Inflammatory Response to Adult Cardiopulmonary Bypass: A Critical Review of the Evidence Base. *J Extra Corpor Technol.* 2014 Sep;46(3):197-211.
- [149] Jarra OA, Saso S, Harling L, Ashrafian H, Naase H, Casula R, Athanasiou T. Organ dysfunction in patients with left ventricular impairment: what is the effect of cardiopulmonary bypass? *Heart Lung Circ.* 2014 Sep;23(9):852-62.
- [150] Fudulu D, Benedetto U, Pecchinenda GG, Chivasso P, Bruno VD, Rapetto F, Bryan A, Angelini GD. Current outcomes of off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting: evidence from randomized controlled trials. *J Thorac Dis.* 2016 Nov;8(Suppl 10):S758-S771.

- [151] Chen YC, Tsai FC, Fang JT, Yang CW. Acute kidney injury in adults receiving extracorporeal membrane oxygenation. *J Formos Med Assoc.* 2014 Nov;113(11):778-85.
- [152] Askenazi DJ, Selewski DT, Paden ML, Cooper DS, Bridges BC, Zappitelli M, Fleming GM. Renal replacement therapy in critically ill patients receiving extracorporeal membrane oxygenation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012 Aug;7(8):1328-36. Epub 2012 Apr 12.
- [153] Ranucci M. Perioperative renal failure: hypoperfusion during cardiopulmonary bypass? *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2007 Dec;11(4):265-8.
- [154] Yimin H, Wenkui Y, Jialiang S, Qiyi C, Juanhong S, Zhiliang L, Changsheng H, Ning L, Jieshou L. Effects of continuous renal replacement therapy on renal inflammatory cytokines during extracorporeal membrane oxygenation in a porcine model. *J Cardiothorac Surg.* 2013 Apr 29;8:113.
- [155] Villa G, Katz N, Ronco C. Extracorporeal Membrane Oxygenation and the Kidney. *Cardiorenal Med.* 2015 Dec;6(1):50-60.
- [156] Kilburn DJ, Shekar K, Fraser JF. The Complex Relationship of Extracorporeal Membrane Oxygenation and Acute Kidney Injury: Causation or Association? *Biomed Res Int.* 2016;2016:1094296.
- [157] Di Tomasso N, Monaco F, Landoni G. Hepatic and renal effects of cardiopulmonary bypass. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2015 Jun;29(2):151-61.
- [158] O'Neal JB, Shaw AD, Billings FT 4th. Acute kidney injury following cardiac surgery: current understanding and future directions. *Crit Care.* 2016 Jul 4;20(1):187.
- [159] Abu-Omar Y, Ratnatunga C. Cardiopulmonary bypass and renal injury. *Perfusion.* 2006 Jul;21(4):209-13.
- [160] Steen S, Liao Q, Pierre L, Paskevicius A, Sjöberg T. Evaluation of LUCAS, a new device for automatic mechanical compression and active decompression resuscitation. *Resuscitation.* 2002 Dec;55(3):285-99.
- [161] Lunney JK, Ho C-S, Wysocki M, Smith DM. Molecular genetics of the swine major histocompatibility complex, the SLA complex. *Dev Comp Immunol* 2009;33:362-374.
- [162] THURET Rodolphe. Intérêt de la prise en charge des donneurs de reins décédés par arrêt cardiaque : développement des méthodes de Gillot et de CRN, intérêt du post-conditionnement. Thèse de doctorat en Physiopathologie. Université de POITIERS, 2013.

- [163] Chardon P, Renard C, Gaillard CR, Vaiman M. The porcine major histocompatibility complex and related paralogous regions: a review. *Genet Sel Evol.* 2000 Mar-Apr;32(2):109-28.
- [164] Lindell SL, Muir H, Brassil J, Mangino MJ. Hypothermic Machine Perfusion Preservation of the DCD Kidney: Machine Effects. *J Transplant.* 2013;2013:802618.
- [165] Jochmans I, Akhtar MZ, Nasralla D, Kocabayoglu P, Boffa C, Kaisar M, Brat A, O'Callaghan J, Pengel LH, Knight S, Ploeg RJ. Past, Present, and Future of Dynamic Kidney and Liver Preservation and Resuscitation. *Am J Transplant.* 2016 Sep;16(9):2545-55.
- [166] Deng R, Gu G, Wang D, Tai Q, Wu L, Ju W, Zhu X, Guo Z, He X. Machine perfusion versus cold storage of kidneys derived from donation after cardiac death: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(3):e56368.
- [167] Bains JC, Sandford RM, Brook NR, Hosgood SA, Lewis GR, Nicholson ML. Comparison of renal allograft fibrosis after transplantation from heart-beating and non-heart-beating donors. *Br J Surg.* 2005 Jan;92(1):113-8.
- [168] Kootstra G, van Heurn E. Non-heartbeating donation of kidneys for transplantation. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007 Mar;3(3):154-63.
- [169] Peters-Sengers H, Homan van der Heide JJ, Heemskerk MBA, Ten Berge IJM, Ultee FCW, Idu MM, Betjes MGH, van Zuilen AD, Christiaans MHL, Hilbrands LH, de Vries APJ, Nurmohamed AS, Berger SP, Bemelman FJ. Similar 5-Year Estimated Glomerular Filtration Rate Between Kidney Transplants From Uncontrolled and Controlled Donors After Circulatory Death-A Dutch Cohort Study. *Transplantation.* 2017 Jun;101(6):1144-1151.
- [170] Brook NR, Waller JR, Nicholson ML. Nonheart-beating kidney donation: current practice and future developments. *Kidney Int.* 2003 Apr;63(4):1516-29.
- [171] Hoogland ER, Snoeijs MG, Winkens B, Christaans MH, van Heurn LW. Kidney transplantation from donors after cardiac death: uncontrolled versus controlled donation. *Am J Transplant.* 2011 Jul;11(7):1427-34;
- [172] Gentil MA, Castro de la Nuez P, Gonzalez-Corvillo C, de Gracia MC, Cabello M, Mazuecos MA, Rodriguez-Benot A, Ballesteros L, Osuna A, Alonso M. Non-Heart-Beating Donor Kidney Transplantation Survival Is Similar to Donation After Brain Death: Comparative Study With Controls in a Regional Program. *Transplant Proc.* 2016 Nov;48(9):2867-2870.
- [173] Sánchez-Fructuoso A, Prats Sánchez D, Marqués Vidas M, López De Novales E, Barrientos Guzmán A. Non-heart beating donors. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 Jun;19 Suppl 3:iii26-31.

- [174] Heyman SN, Khamaisi M, Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia response and the progression of chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2008;28(6):998-1006.
- [175] Bernhardt WM, Warnecke C, Willam C, Tanaka T, Wiesener MS, Eckardt KU. Organ protection by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Methods Enzymol*. 2007;435:221-45.
- [176] Jiao B, Liu S, Liu H, Cheng D, Cheng Y, Liu Y. Hypothermic machine perfusion reduces delayed graft function and improves one-year graft survival of kidneys from expanded criteria donors: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013 Dec 10;8(12):e81826.
- [177] Matignon M, Bonnefoy F, Lang P, Grimbart P. [Organ transplantation and blood transfusion]. *Transfus Clin Biol*. 2011 Apr;18(2):70-8.
- [178] Munguía-Canales DA, Campo-Cañaveral de la Cruz JL, Crowley-Carrasco S, Lazo-Pérez D, Macías-Sotuela L, Varela-de Ugarte A. Lung transplantation with uncontrolled non-heart-beating donor. Review. *Cir Cir*. 2012 Jan-Feb;80(1):86-91.
- [179] Morrissey PE, Monaco AP. Donation after circulatory death: current practices, ongoing challenges, and potential improvements. *Transplantation*. 2014 Feb 15;97(3):258-64.
- [180] Erasmus ME, van Raemdonck D, Akhtar MZ, Neyrinck A, de Antonio DG, Varela A, Dark J. DCD lung donation: donor criteria, procedural criteria, pulmonary graft function validation, and preservation. *Transpl Int*. 2016 Jul;29(7):790-7.
- [181] Demos DS, Iyengar A, Bryner BS, Gray BW, Hoffman HR, Cornell MS, Wilkinson JE, Mazur DE, Bartlett RH, Punch JD, Rojas-Peña A. Successful Porcine Renal Transplantation After 60 Minutes of Donor Warm Ischemia: Extracorporeal Perfusion and Thrombolytics. *ASAIO J*. 2015 Jul-Aug;61(4):474-9.
- [182] Reznik O, Skvortsov A, Loginov I, Ananyev A, Bagnenko S, Moysyuk Y. Kidney from uncontrolled donors after cardiac death with one hour warm ischemic time: resuscitation by extracorporeal normothermic abdominal perfusion "in situ" by leukocytes-free oxygenated blood. *Clin Transplant*. 2011 Jul-Aug;25(4):511-6.
- [183] Reznik ON, Skvortsov AE, Reznik AO, Ananyev AN, Tutin AP, Kuzmin DO, Bagnenko SF. Uncontrolled donors with controlled reperfusion after sixty minutes of asystole: a novel reliable resource for kidney transplantation. *PLoS One*. 2013 May 30;8(5):e64209.
- [184] SOUSSI-BERJONVAL David. Mise au point et évaluation d'un modèle porcin de donneur rénal DDAC-LATA ou Maastricht 3. Thèse de doctorat en Médecine. Université de POITIERS, 2018.

- [185] Van De Wauwer C, Verschuuren EA, van der Bij W, Nossent GD, Erasmus ME. The use of non-heart-beating lung donors category III can increase the donor pool. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011 Jun;39(6):e175-80.
- [186] Inci I, Hillinger S, Schneiter D, Opitz I, Schuurmans M, Benden C, Weder W. Lung Transplantation with Controlled Donation after Circulatory Death Donors. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2018 Jul 2.
- [187] Osaki S, Locher MR, Lushaj EB, Akhter SA, Kohmoto T. Functional evaluation of human donation after cardiac death donor hearts using a continuous isolated myocardial perfusion technique: Potential for expansion of the cardiac donor population. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014 Sep;148(3):1123-30; discussion 1130.
- [188] Dhital KK, Iyer A, Connellan M, Chew HC, Gao L, Doyle A, Hicks M, Kumarasinghe G, Soto C, Dinale A, Cartwright B, Nair P, Granger E, Jansz P, Jabbour A, Kotlyar E, Keogh A, Hayward C, Graham R, Spratt P, Macdonald P. Adult heart transplantation with distant procurement and ex-vivo preservation of donor hearts after circulatory death: a case series. *Lancet*. 2015 Jun 27;385(9987):2585-91.
- [189] Messer S, Page A, Axell R, Berman M, Hernández-Sánchez J, Colah S, Parizkova B, Valchanov K, Dunning J, Pavlushkov E, Balasubramanian SK, Parameshwar J, Omar YA, Goddard M, Pettit S, Lewis C, Kydd A, Jenkins D, Watson CJ, Sudarshan C, Catarino P, Findlay M, Ali A, Tsui S, Large SR. Outcome after heart transplantation from donation after circulatory-determined death donors. *J Heart Lung Transplant*. 2017 Dec;36(12):1311-1318.
- [190] Tsui SSL, Oniscu GC. Extending normothermic regional perfusion to the thorax in donors after circulatory death. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017 Jun;22(3):245-250.
- [191] White CW, Messer SJ, Large SR, Conway J, Kim DH, Kutsogiannis DJ, Nagendran J, Freed DH. Transplantation of Hearts Donated after Circulatory Death. *Front Cardiovasc Med*. 2018 Feb 13;5:8.