THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Ischémie reperfusion en transplantation d'organes mécanismes et innovations thérapeutiques - IRTOMIT (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)
Secteur de recherche : Recherche clinique, innovation technologique, santé

Présentée par :
Ricardo Codas Duarte

Ischémie-reperfusion : impact de la perfusion rénale sur la fonction des greffons

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

Soutenue le 30 septembre 2013 devant le jury

Jury :

Président	**Michel Eugène**	Professeur, CHU de Poitiers
Rapporteur	**Joan Roselló-Catafau**	Doctor, Instituto de investigación biomédica de Barcelona, España
Rapporteur	**Xavier Martin**	Professeur, Hôpital Édouard Herriot de Lyon
Membre	**Thierry Hauet**	Professeur, CHU de Poitiers
Membre	**Lionel Badet**	Professeur, Hôpital Édouard Herriot de Lyon
Membre	**Raphaël Thuillier**	Ingénieur de recherche, Université de Poitiers

Pour citer cette thèse :
Ricardo Codas Duarte. *Ischémie-reperfusion : impact de la perfusion rénale sur la fonction des greffons* [En ligne]. Thèse Recherche clinique, innovation technologique, santé. Poitiers : Université de Poitiers, 2013. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THESE

pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté de Médecine et Pharmacie)

(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : BioSanté N°524

Champ disciplinaire : Biologie, Médecine, Santé

Secteur de Recherche : Recherche clinique, innovation thérapeutique, santé publique

Présentée par :

Ricardo CODAS DUARTE

****

ISCHEMIE-REPERFUSION : IMPACT DE LA PERFUSION RENALE SUR LA FONCTION DES GREFFONS

****

Directeurs de Thèse : Professeur Thierry HAUET et Professeur Lionel BADET

****

Soutenue le 30 septembre 2013

devant la Commission d'Examen

****

JURY

Pr. Xavier MARTIN	**Rapporteur**
Dr. Joan ROSELLO-CATAFAU	**Rapporteur**
Pr. Michel EUGENE	**Examinateur**
Dr. Raphael THUILLIER	**Examinateur**
Pr. Lionel BADET	**Responsable scientifique**
Pr. Thierry HAUET	**Responsable scientifique**

Dedicado a :

A mi esposa Liz
A mi hijo T. Ricardo
A mis padres Ricardo y M. Rosario
A mis Abuelos Jesús Rubén y Gilda
A mi padrino Lionel

REMERCIEMENTS

Monsieur le **Pr Thierry HAUET** : j'ai eu la chance de travailler au sein du laboratoire que vous dirigez. Votre patience, votre disponibilité totale, votre qualité humaine, votre rigueur scientifique et la passion pour votre métier resteront pour moi un exemple tout le long de ma vie.

A mon cher **Pr. Lionel BADET**, mon Maître, mon Parrain, je te remercie de m'avoir soutenu toutes ces années. Je reconnais chez toi des qualités d'un chirurgien exceptionnel. Ton enthousiasme et ton infatigable capacité de travail n'ont probablement d'égal que l'épuisement ressenti lorsque je tente de te suivre….. Ta passion pour la transplantation m'a toujours impressionné. J'ai du faire un chemin très dur, mais passionnant, un chemin long et souvent poussiéreux mais je suis heureux être arrivé à l'objectif, ce qui sans ton aide précieuse aurait été impossible. Mon Lionel, je te dois ce que je suis comme personne et comme chirurgien. Merci !!!!!!!

Cher **Pr. Xavier MARTIN**, j'ai pu apprécier votre enthousiasme permanent, votre simplicité et votre sens de compagnonnage chirurgical. Vos connaissances, vos qualités humaines, chirurgicales et pédagogiques sont un vrai exemple à suivre. Je suis fier d'intégrer votre équipe à Lyon et j'essaierai d'en être un digne représentant. Trouvez ici l'expression de ma plus grande admiration et respect.

Monsieur le **Dr. Raphael Thuillier** : Je te remercie énormément de m'avoir aidé pour rédiger mes articles ; sans toi, je n'aurais jamais pu faire cette thèse.

Monsieur le **Pr Jean-Michel GOUJON** : Je tiens à vous remercier pour votre précieuse contribution sans laquelle l'analyse histologique n'aurait pas été possible.

Le **Dr Frédéric FAVREAU** : dont la contribution aux examens biochimiques a été cruciale.

Monsieur le **Pr. Michel EUGENE** : Merci d'avoir accepté de faire parti du jury de ma thèse.

Monsieur le **Dr. Joan ROSELLO :** Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

M. William HEBRARD et Mme. Catherine HENRY: Des personnes exceptionnelles, dont la gentillesse, la disponibilité, la bonne humeur, la rigueur professionnelle ont fait de mon travail à Surgères un vrai plaisir.

Mon cher **William HANF,** un vrai copain, un frère, celui qui depuis mon arrivée en France m'a toujours aidé. Nous avions un projet ensemble, mais la vie a fait que nos chemins se séparent, peu importe où nous serons demain, notre amitié nous unira pour toujours.

Mlle. **Théresa DAILY**, grand merci pour ta disponibilité et ta réactivité, pour avoir corrigé les fautes dans la langue française, dont je reconnais mes limites.

J'exprime toute ma reconnaissance à tous ceux que j'ai oublié dans mes remerciements et qui m'ont aidé à concrétiser ce travail.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa, por todas esas horas que te he robado, por el amor que me das y por haber formado conmigo un hogar (mi verdadero sueño), te amo y te amaré siempre.

A mi hijo, Thomas Ricardo (eres el regalo mas grande que Dios me dio), gracias por estar aquí conmigo. Tu presencia es la fuente inagotable de mi fuerza. Estaré por siempre a tu lado, pues yo te llamé al mundo y te daré todo lo necesario para que salgas adelante. Te amo hijo mío….

A mis padres Ricardo y María Rosario, gracias por haberme dado la vida, gracias por haberme mostrado el buen camino y por apoyarme en todos mis proyectos. Los quiero mucho.

A mis abuelos Jesús Rubén y Gilda, que tengo la suerte de tenerlos, gracias abuelos par haber hecho de mi el niño mas feliz de la tierra. Les quiero infinitamente.

A mi tío Nancho, me has inculcado una pasión y no una profesión, gracias tío. Espero algún día poder trasmitírselo a alguien de la familia, lo hare en tu nombre y con el mismo cariño con el cual lo has hecho conmigo.

A mi padrino Lionel, eres un ejemplo de vida para mi. Tus cualidades como persona hacen de vos alguien excepcional, le doy gracias a Dios que me haya guiado a tu encuentro.

A mis amigos aquí en Lyon, Santi y Maga, que me ayudan siempre para poder salir al paso de cada problema que se presenta.

A mi compadre y ejemplo Joaquín, gracias viejo por todos esos consejos y por la fortaleza que me has trasmitido en todo momento.

RESUME

ISCHEMIE-REPERFUSION : IMPACT DE LA PERFUSION RENALE SUR LA FONCTION DES GREFFONS

La pénurie d'organes a amené les équipes de transplantation à revoir leurs critères de prélèvement et à élargir l'acceptation des greffons à des organes provenant de donneurs marginaux (ECD et DDAC).

Le recours aux greffons marginaux impose de réduire les lésions induites durant l'IR, et doit conduire à une prise en charge optimisée durant la période de conservation de façon à limiter le risque de PNF et de RRF et de permettre une amélioration de la survie des greffons.

C'est face à cette situation, que la question de la perfusion d'organe et de l'utilisation des machines de perfusion s'est posée et a justifié la réalisation de ce travail.

Un modèle d'autotransplantation chez le porc qui constitue le gold standard pour l'étude des lésions d'IR a été choisi car il permet d'évaluer les effets de l'IR sur le rein.

Les reins ont subi une ischémie chaude de 60 minutes et une ischémie froide de 22 heures, durant laquelle la conservation hypothermique des reins a été randomisée soit en incubation statique dans IGL-1 ou Belzer MPS soit sur machine de perfusion.

Nous avons utilisé comme paramètre d'étude : la survie des animaux, différents dosages biologiques, une analyse histologique et une évaluation immunologique par RTqPCR des certains gènes impliqués dans le mécanisme lésionnel d'IR.

Nos résultats montrent au total :

- Que la machine de perfusion RM3 diminue le risque de RRF et PNF post greffe et qu'il existe donc une supériorité des conditions de conservation lorsque les reins sont placés sur la machine de perfusion.
- La supériorité de la solution IGL-1 sur la solution Belzer MPS ; il existe un effet propre de la solution IGL-1 pour moduler les mécanismes inflammatoires et immunologiques liés aux lésions d'IR.
- Que la reprise de fonction et la PNF dépendent du liquide utilisé et qu'il existe un effet d'addition entre l'IGL-1 et la machine de perfusion.

Mots clés : Ischémie, Reperfusion, Machine de Perfusion, Transplantation Rénale.

ABSTRACT

ISCHEMIA - REPERFUSION: IMPACT OF RENAL PERFUSION ON GRAFTS FUNCTION

Organ shortage has led transplant teams to re-evaluate their acceptance criteria and to increase their use of marginal donor organs (ECD and DDAC). For this reason, it is necessary to reduce the lesions due to IR. By optimizing organ conservation, the risk of PNF and RRF can be limited, and organ survival increased.

The question of organ perfusion and the use of perfusion machines arose in this context, leading to the work we present here.

We chose to evaluate the effects of IR on a porcine auto-graft model, that being the gold standard for the study of IR lesions.

The kidneys were subject to hot ischemia for 60 minutes, and then to cold ischemia for 22 hours, during which they were randomly conserved either through static incubation in IGL-1 or Belzer MPS or on a perfusion machine.

We studied the animal survival rate, various bioassays, histological analysis and immune reactions though RTqPCR of certain genes involved in IR lesion mechanisms.

Our results show:

- That the RM3 perfusion machine decreases the RRF and PNF post-graft risk and thus the perfusion machine conservation is better than static conservation.
- IGL-1 superiority over Belzer MPS; IGL-1 solution independently modulates inflammatory and immunological mechanisms linked to IR lesions.
- That function recovery and PNF depend on the liquid used where there is an additive effect between the use of IGL-1 and the use of a perfusion machine.

Key words: ischemia, reperfusion, perfusion machine, kidney transplantation.

SOMMAIRE

1. Avant-propos ---------- 6

2. Généralités ---------- 8

2.1. Histoire de la transplantation rénale et des machines de perfusion -------9

2.2. Ischémie reperfusion ---------- 13

2.2.1 Phase d'ischémie ---------- 13

2.2.1.1 Ischémie chaude ---------- 13

2.2.1.2 Ischémie froide ---------- 13

2.2.1.3 Ischémie chaude relative ou ischémie tiède ---------- 14

2.2.2 Phase de reperfusion ---------- 14

2.3. Mécanismes lésionnels de l'ischémie et de la reperfusion ---------- 16

2.3.1 Lésions induites durant la phase de conservation (ischémie froide) -------- 16

2.3.2 Lésions induites pendant la phase de reperfusion ---------- 20

2.3.3 Lésion d'IR : Réponse inflammatoire et réponse immune ---------- 23

2.4. Outils de prise en charge de l'ischémie reperfusion ---------- 26

2.4.1 Le pré conditionnement ischémique (PCI) ---------- 27

2.4.2 Liquides de conservation d'organes ---------- 30

2.4.2.1 Histoire des liquides de préservation ---------- 30

2.4.2.2 Liquides de préservation : vers de nouvelles compositions ---------- 32

2.4.2.2.1 Les imperméants ---------- 34

2.4.2.2.2 Les colloïdes ---------- 34

2.4.2.3 Liquides de préservation : Quatrième génération ---------- 36

2.4.3 Machines de perfusion rénale hypothermique ---------- 40

2.4.4 Le post conditionnement ischémique (PoCI) ---------- 47

3. Rationnel du travail expérimental ---------- 53

3.1. Marginalité ---------- 55

3.2. Effet Machine ---------- 59

3.3. Modèle d'autotransplantation rénale chez le porc comme modèle étude des lésions des phénomènes d'IR ---------- 65

4. Objectifs du travail ---------- 67

5. Méthodes ---------- 69

5.1. Protocole de recherche ---------- 70

5.2. Protocole d'anesthésie ---------- 70

5.3. Protocole chirurgical : Prélèvement du rein gauche ---------- 71

5.3.1 Surveillance et paramétrage de la machine lors de la conservation --- 74
5.4. Protocole chirurgical : Autotransplantation rénale --- 75
5.5. Suivi post opératoire immédiat --- 77
5.6. Prélèvements réalisés pour les différentes analyses --- 79
5.7. Sacrifice --- 80
5.8. Analyse Histologique --- 81
5.9. Etude de l'expression transcriptomique par RTq-PCR Quantitative --- 82
6. Publications --- 83
6.1. ARTICLE 1 --- 84
6.1.1 Rappel des objectifs et hypothèses --- 84
6.1.2 Publication --- 84
6.1.3 Synthèse --- 85
6.2. ARTICLE 2 --- 86
6.2.1 Rappel des objectifs et hypothèses --- 86
6.2.2 Publication --- 86
6.2.3 Synthèse --- 87
6.3. ARTICLE 3 --- 89
6.3.1 Rappel des objectifs et hypothèses --- 89
6.3.2 Publication --- 89
6.3.3 Synthèse --- 90
7. Discussion --- 92
8. Conclusion --- 100
9. Perspectives --- 102
10. Bibliographie --- 105
11. Annexes --- 145

FIGURES ET TABLEAUX

FIGURE 1 - EVOLUTION DES MACHINES A PERFUSION ENTRE 1970 ET 2012 (WATERS MEDICAL SYSTEMS). MACHINE DE PERFUSION LIFEPORT® (ORGAN RECOVERY SYSTEM) 12
FIGURE 2- PRINCIPAUX MECANISMES LESIONNELS AU COURS DE L'IR 15
FIGURE 3 - GLYCOLYSE EN ABSENCE D'OXYGENE 17
FIGURE 4 - CONSEQUENCES DE L'ISCHEMIE A NIVEAU CELLULAIRE 18
FIGURE 5 - MECANISMES DE DEFENSE CELLULAIRES FACE AUX ROS. 19
FIGURE 6 - SYNDROME DE REPERFUSION SELON N. PERICO. 20
FIGURE 7- PRODUCTION DE PEROXYNITRITES. 22
FIGURE 8 - VOIES DE DECLENCHEMENTS DE L'APOPTOSE 23
FIGURE 9 - SIGNAUX DE DANGER, REPONSE INFLAMMATOIRE SELON W. LAND. 24
FIGURE 10 - PRINCIPALES FACTEURS DE LA REACTION INFLAMMATOIRE. 25
FIGURE 11 - EFFETS DE L'AFFLUX CALCIQUE INTRACELLULAIRE. 33
FIGURE 12 - MECANISMES DU POCI. 50
FIGURE 13 - EFFETS DU FLUX SUR LA CELLULE ENDOTHELIALE SELON O. TRAUB 62
FIGURE 14 - EFFETS DU FLUX SUR LA CELLULE ENDOTHELIALE SELON R. KAMM 62
FIGURE 15 - ROLES DES INTEGRINES SELON R. ROSS 63
FIGURE 16 - INSTALLATION DE L'ANIMAL 71
FIGURE 17 - REIN GAUCHE COMPLETEMENT DISSEQUE AVANT CLAMPAGE PEDICULAIRE IN SITU 72
FIGURE 18 - ASPECT DU REIN SUITE A 60 MINUTES D'ISCHEMIE CHAUDE IN SITU 72
FIGURE 19 - GREFFON RENAL AU COURS DU LAVAGE PAR UNE DES SOLUTIONS DE PRESERVATION 73
FIGURE 20 - PESEE DU REIN AVANT PERFUSION. 73
FIGURE 21 - REIN INSTALLE SUR LA MACHINE DE PERFUSION 74
FIGURE 22 - PROTOCOLE DE SURVEILLANCE ET DE PARAMETRAGE DE LA MACHINE RM3® LORS DE LA PERFUSION. 75
FIGURE 23 - ANASTOMOSE ARTERIELLE TERMINO LATERALE (ARTERE RENALE – AORTE). 76
FIGURE 24 - ASPECT DU GREFFON RENAL SUITE AU DECLAMPAGE VASCULAIRE 77
FIGURE 25 - SUIVI POST OPERATOIRE, CAGE METABOLIQUE 78
FIGURE 26 - REALISATION D'UNE BIOPSIE PERCUTANEE DU GREFFON. 80

TABLEAU 1 - CARACTERISTIQUES TECHNIQUES DES MACHINES DE PERFUSION. 46
TABLEAU 2 - CLASSIFICATION DE MAASTRICHT 57

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique.

Alpha GST : Alpha-Glutathione-S-Trasnferase.

ATP : Acide triphosphate.

CCL : Chemonkine (C-C motif) ligand.

CD : Cluster de différenciation.

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

COX : Cyclo-oxygénase.

DDAC : Donneurs décédés après arrêt cardiaque.

ECD : Donneurs à critères étendus.

FIAT : Fibrose Interstitielle Atrophie Tubulaire.

HES : Hydroxyethil Starch

HLA : Human Leucocytes Antiben

HO^- : Radical hydroxile.

HSP : Heat shock proteins.

ICAM-1 : InterCellularAdhesion Molecule-1

IFN-gamma : Interféron-gamma.

IGL-1 : Institut Georges Lopez-1.

IL : Interleukine (ex : IL-1Rn, IL-6…)

IR : Ischémie-Reperfusion.

kDa : Kilo Dalton.

MAPK : Mitogen-activated protein kinase.

MCP-1 : Monocyte chemotactic protein-1 (ou CCL2).

MDA : Malondialdehyde.

MnSOD : Manganèse superoxyde dismutase.

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide.

NF-kB : Nuclear factor-kappa B.

ONOOH : Peroxynitrites.

PCI : Pré conditionnement ischémique.

PCIR : Pré conditionnement ischémique remote.

PEG : Polyéthylène glycol

PNF : Non fonction primaire.

PoCI : Post conditionnement ischémique.

PTM : Pores de transition mitochondriaux.

ROS : Radicaux libres.

RRF : Retard de reprise de fonction.

SCOT : Solution de conservation des organes et des tissus.

SOD : Superoxide dismutase.

TGF-beta : Transforming Growth Factor-beta.

TLR : Toll Like receptor.

TNF-alpha : Facteur de Nécrose Tumoral alpha.

UW : University of Wisconsin.

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1

1. Avant-propos

Lors d'une transplantation, quelque soit l'organe greffé, le greffon est soumis à une séquence d'ischémie froide pendant la conservation puis à une ischémie chaude durant la période d'anastomoses vasculaires. Cette séquence est à l'origine de lésions d'ischémie-reperfusion (IR), et expose le transplant à de nombreuses complications à court et à long terme. La connaissance et la maîtrise des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'IR peuvent nous aider à limiter la souffrance cellulaire tout en améliorant la qualité des organes à transplanter.

Depuis quelques années, nous faisons face à une pénurie importante d'organes. L'écart entre le nombre de donneurs et celui de receveurs continue à se creuser malgré l'augmentation du nombre d'organes prélevés. La pénurie d'organes conjuguée au vieillissement de la population ont amené les équipes de transplantation à revoir leurs critères de sélection de donneurs.

Les machines de perfusion constituent aujourd'hui un outil incontournable qui nous permet de transplanter des organes, considérés comme non viables il y a quelques années.

C'est pourquoi nous avons choisi de développer un programme de recherche centré sur l'intérêt que peut avoir l'utilisation des machines de perfusion sur des organes soumis à une ischémie prolongée dans un modèle d'autotransplantation rénale chez le porc ; modèle qui mime les conditions d'exposition sévère à ischémie que nous trouvons habituellement dans la catégorie de donneurs décédés par arrêt cardiaque.

2. Généralités

2.1. Histoire de la transplantation rénale et des machines de perfusion

Les premières tentatives de greffes rénales datent de la fin du XIXème siècle, Jaboulay qui était le patron de Carrel fut l'un des premiers à tenter des xénogreffes réalisées à l'époque au cou ou au pli inguinal dans des modèles animaux.

De ces premières tentatives Alexis Carrel appréhende non seulement les difficultés techniques et met au point au début du XXème siècle une technique d'anastomose vasculaire toujours utilisée aujourd'hui ; mais il pressent également l'existence de cellules spécifiquement orientées contre le greffon ; ses travaux lui vaudront l'obtention du prix Nobel de Médecine en 1914.

L'expérience clinique de la transplantation rénale débute réellement en 1952 à Paris. Aidé par les travaux de R. Kuss qui établit en 1951 la stratégie de transplantation rénale hétérotopique sur les vaisseaux iliaques qui est encore utilisée aujourd'hui, le Pr. Jean Hamburger réalisa avec son équipe, à la veille de Noël une allogreffe de rein à partir d'un donneur vivant, où une mère avait donné un rein pour son fils en insuffisance rénale aigue sans espoir de récupération fonctionnelle, greffe réalisée sans traitement immunosuppresseur et qui donnera trois semaines de survie au patient avant qu'un rejet aigu ne vienne détruire le greffon et conduire à son décès. Deux ans plus tard J. Murray et J. Merill aux Etats Unis conscients de l'expérience française, convaincus que la génétique devait jouer un rôle crucial dans la survie du greffon et aidés par les travaux expérimentaux réalisés par Medaward vont réaliser entre deux jumeaux homozygotes une greffe de rein syngénique avec un excellent résultat fonctionnel qui se maintiendra de nombreuses années (1). Commence alors l'épopée de la greffe rénale, dont le développement actuel et la réussite ont été conditionnés par la découverte de l'implication du système immunitaire dans les mécanismes de rejets, par l'identification de molécules actives pour limiter ces mécanismes où les corticoïdes, l'azatioprine, le sérum anti lymphocytaire et la ciclosporine vont jouer un rôle clé, par la découverte due à J. Dausset du système HLA. La première transplantation rénale à partir d'un donneur cadavérique sera réalisée à Boston en 1962 et c'est quelques années plus tard, en 1968, grâce à la publication réalisée à l'Université d'Harvard concernant les critères

de mort encéphalique que l'activité de prélèvement multi-organes commence à se développer (2, 3). De ce fait, les organes commencent à circuler et le centre où l'organe est prélevé n'est plus forcément le centre où il est transplanté. Assurer des conditions de conservation des organes durant les transports devient une nécessité et les solutions de conservation de première puis de seconde génération font leur apparition.

Dans les années 1990 les résultats de la greffe font de la transplantation une modalité privilégiée de prise en charge de l'insuffisance rénale terminale ce qui induit un déséquilibre entre l'offre et la demande et concourt à une pénurie de greffons rénaux qui se conjugue à un vieillissement de la population des donneurs qui présentent de plus en plus une vasculopathie sous-jacente. Ceci va mécaniquement conduire les équipes de transplantation à utiliser les greffons issus des donneurs marginaux, tels que des donneurs décédés après arrêt cardiaque (DDAC) et des donneurs à critères étendus (ECD) (4-7). Le prix à payer de l'utilisation de tels organes est un taux plus élevé de retard de reprise de fonction (RRF) et d'un risque plus important de non fonction primaire (PNF) (8-13). Le recours aux organes marginaux et l'exposition de ces organes à des temps d'ischémie prolongée vont conduire les équipes de transplantation à s'intéresser aux mécanismes d'ischémie et de reperfusion et à ouvrir la voie à de nombreux travaux de recherche qui permettent aujourd'hui de définir 4 axes d'action principaux :

1- Le pré conditionnement du donneur ou de l'organe qui consiste à préparer l'organe à la période d'ischémie à laquelle il va être exposé.
2- L'optimisation des liquides de conservation.
3- L'optimisation des méthodes de conservation : qui confronte l'incubation statique à la perfusion.
4- Le post conditionnement qui consiste à protéger l'organe au moment de la reperfusion.

C'est de l'optimisation des méthodes de conservation que nous parlerons essentiellement dans ce travail. L'amélioration des liquides de conservation ne permettant pas en particulier de préparer le lit vasculaire du greffon à la reperfusion, l'idée a germé que l'utilisation de machines capables de perfuser des greffons

rénaux doit être en mesure d'améliorer les conditions de conservation des reins prélevés.

Rappelons que la perfusion d'organe sur machine est un concept assez ancien ; en 1935 Carrel et Lindbergh avaient déjà imaginé une machine de perfusion d'organe mais il a fallu attendre 1963 avec Humphries puis Belzer en 1967 (14) pour avoir les premiers prototypes cliniques. D'abord assez utilisées elles ont été abandonnées dans les années 80 avec l'émergence de liquides de conservation de seconde génération du fait de leur coût et de leur complexité d'utilisation (15) ; mais face à une pénurie croissante d'organes et à la volonté d'élargir le pool de donneurs aux greffons marginaux Belzer avait été amené dans les années 90 à réutiliser la perfusion et c'est depuis que leur utilisation s'est intensifiée d'abord aux USA (16) ; et ce n'est finalement que depuis une dizaine d'années que certaines équipes Françaises ont commencé à utiliser les machines **(Figure 1)**.

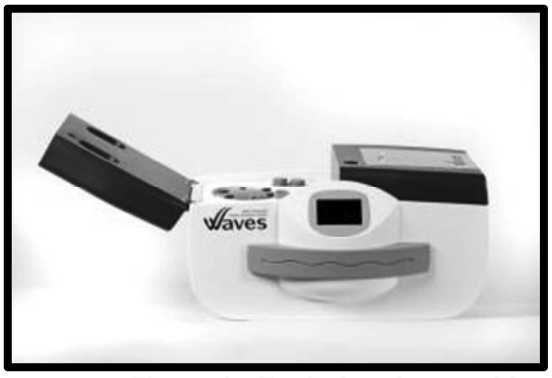
TM®

TM2®

MOX 100®

RM3®

WAVES®



LifePort®

Figure 1 - Evolution des machines à perfusion entre 1970 et 2012 (Waters Medical Systems). Machine de perfusion LifePort® (Organ Recovery System)

2.2. Ischémie reperfusion

Les mécanismes impliqués dans le phénomène d'ischémie reperfusion (IR) **(Figure 2)** peuvent être regroupés en deux phases (17) :

2.2.1 Phase d'ischémie

La première phase est identifiée comme la phase d'ischémie. Elle est caractérisée par l'absence totale de flux sanguin au niveau de l'organe concerné. Dans cette phase on retrouve principalement deux types d'ischémies distinctes :

2.2.1.1 Ischémie chaude

C'est la période durant laquelle l'organe n'est pas irrigué alors que la température corporelle est autour de 37°C. C'est à ce moment que le risque de lésion tissulaire est le plus important. Ce risque augmente au prorata du temps d'ischémie et peut aboutir à la constitution de lésions rénales irréversibles.

2.2.1.2 Ischémie froide

C'est la période durant laquelle l'organe est conservé par une solution de préservation d'organes, la température normalement utilisée oscille autour de 4°C. Cette température est capable d'inhiber partiellement le métabolisme cellulaire (18) ; Van't Hoff a décrit que le métabolisme diminue de 50% à chaque palier de 10 degrés. Malgré cette diminution de la température, le métabolisme ne s'arrête pas complètement menant la cellule à un épuisement des réserves énergétiques. L'ischémie froide commence classiquement au moment du clampage aortique et de la perfusion in situ des organes avec la solution de conservation. La durée ne devrait pas dépasser entre 18 et 20 heures pour les greffons rénaux (19), puisqu'à partir de 20 heures de conservation statique les lésions glomérulaires s'accélèrent de façon exponentielle. C'est de la qualité de la conservation que va dépendre l'intégrité de l'organe.

2.2.1.3 Ischémie chaude relative ou ischémie tiède

Un troisième type d'ischémie a été décrit, c'est *l'ischémie tiède ou ischémie chaude relative*. Celle-ci correspond au moment où le rein est sorti de la glace lors de la transplantation, le temps de réaliser les anastomoses vasculaires ; cette période s'arrête au moment du déclampage vasculaire qui s'accompagne de la reperfusion de l'organe. Les lésions pouvant se développer durant cette période n'ont jamais fait objet d'études très approfondies. L'ischémie tiède est donc assimilée à l'ischémie chaude.

2.2.2 Phase de reperfusion

La phase de reperfusion commence au moment du déclampage vasculaire et revascularisation de l'organe (chez le receveur) qui avait été soumis à une ischémie chaude et froide. Cette phase se caractérise par l'arrivée de sang riche en nutriments et en oxygène au niveau de l'organe transplanté. Malgré le rétablissement de la circulation, certains territoires du greffon sont mal perfusés (tâches violacées macroscopiquement). La vasoconstriction induite par l'ischémie va mettre du temps à disparaitre et durant cette période les zones mal perfusées vont souffrir d'une ischémie chaude qui va majorer les lésions tissulaires. C'est à ce moment que les lésions de la classique séquence d'IR augmentent de manière considérable à cause de la production de radicaux libres (ROS) (20-25) qui vont agresser les cellules, aidés en cela par un fonctionnement mitochondrial défaillant au niveau de l'organe greffé. Une grande partie des lésions touchant les organes sont donc liées à la fabrication de ROS par l'organe et c'est la sommation de tous les évènements induisant la formation et l'accumulation de ROS qui va conditionner l'importance des lésions tissulaires induites au moment de la reperfusion lors de la transplantation rénale (26).

En pratique les lésions seront d'autant plus sévères que l'ischémie totale est longue et que l'organe est fragile (donneurs à critères étendus). L'ischémie chaude est la plus délétère puisque la privation d'oxygène survient alors que le métabolisme cellulaire n'est ni interrompu ni ralenti. Il est bien établi que plus le temps d'ischémie chaude est long, plus le taux de retard de reprise de fonction et le taux de non

fonction primaire sont élevés (27, 28). Si l'arrêt circulatoire et l'ischémie chaude surviennent alors que le donneur n'a pas reçu une forte dose d'héparine ou que le rein n'est pas rapidement lavé avec du liquide de conservation (ex : donneurs décédés par arrêt cardiaque), il y a un risque majeur de formation de trombi par stase sanguine au niveau de la macro et microcirculation de l'organe ; la micro thrombose qui n'est pas toujours identifiée lors du prélèvement va impacter de manière importante sur la reprise de fonction et sur la durée de vie du greffon. L'ischémie froide participe elle aussi à la constitution de lésions d'IR, même si celles-ci sont moins délétères pour l'organe que l'ischémie chaude ; l'ischémie froide rajoute un risque supplémentaire de retard de reprise de fonction et de non fonction primaire. En pratique clinique le retard de reprise de fonction, qui témoigne d'une souffrance cellulaire, oblige les patients transplantés à dialyser dans les jours ou semaines suivant la transplantation (29).

Par ailleurs les lésions d'IR vont également induire une augmentation de l'incidence du rejet aigu qui conditionne en partie la survie du greffon à moyen et long terme (30).

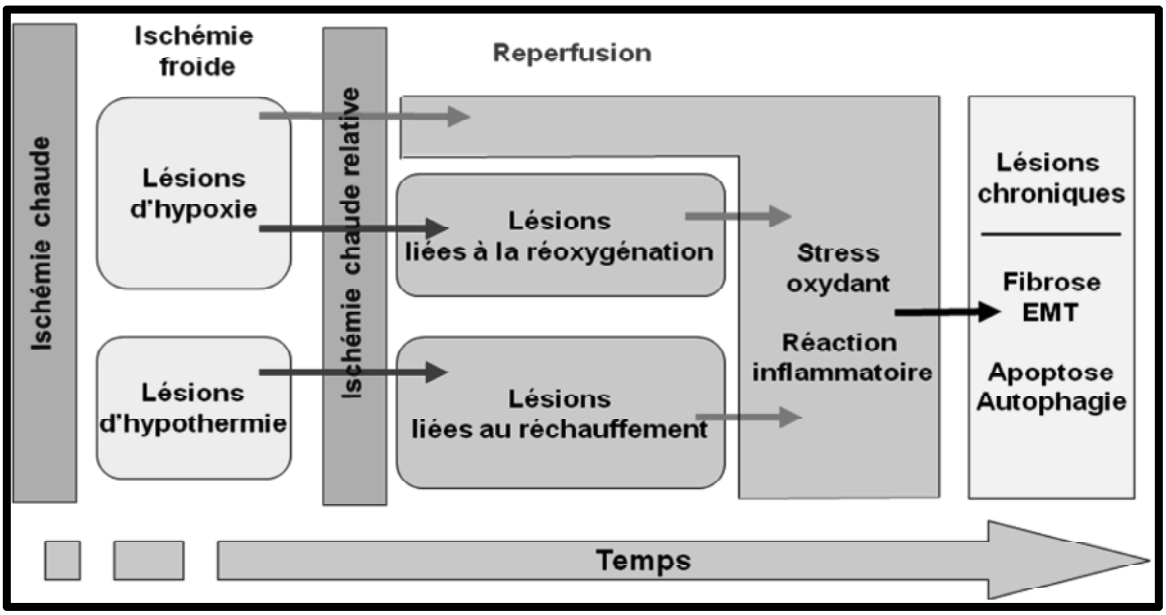


Figure 2 - Principaux mécanismes lésionnels au cours de l'IR

2.3. Mécanismes lésionnels de l'ischémie et de la reperfusion

2.3.1 Lésions induites durant la phase de conservation (ischémie froide)

Au moment du prélèvement d'un organe, celui-ci va être privé de nutriments et d'oxygène. Ceci induit une altération de l'homéostasie cellulaire et tissulaire de l'organe.

Le manque de nutriments et d'oxygène va perturber profondément la fonction cellulaire. Le métabolisme est ralenti par la baisse de la température. Cela va générer une glycolyse anaérobie qui va conduire à l'accumulation de déchets ainsi qu'à une baisse très importante de la réserve d'ATP.

En l'absence d'oxygène, le métabolisme cellulaire oxydatif, principale source de production énergétique cellulaire, va finir par s'arrêter et basculer vers un métabolisme anaérobie. La phosphorylation oxydative mitochondriale étant bloquée, la production d'ATP va se faire par glycolyse anaérobie, ce qui conduira à une production extrêmement diminuée d'ATP. La glycolyse en absence d'oxygène **(Figure 3)** conduit par réduction du pyruvate en lactate à une acidose cellulaire profonde (31-34). Le pH intra cellulaire diminue au fur et à mesure que l'acide lactique et les protons H^+ s'accumulent au sein de la cellule, conséquence directe de l'hydrolyse de l'ATP. L'acidose parvient ensuite à se propager vers le milieu extracellulaire ce qui conduit à des lésions tissulaires définitives (35) par perméabilisation de la membrane cellulaire puis par afflux d'eau.

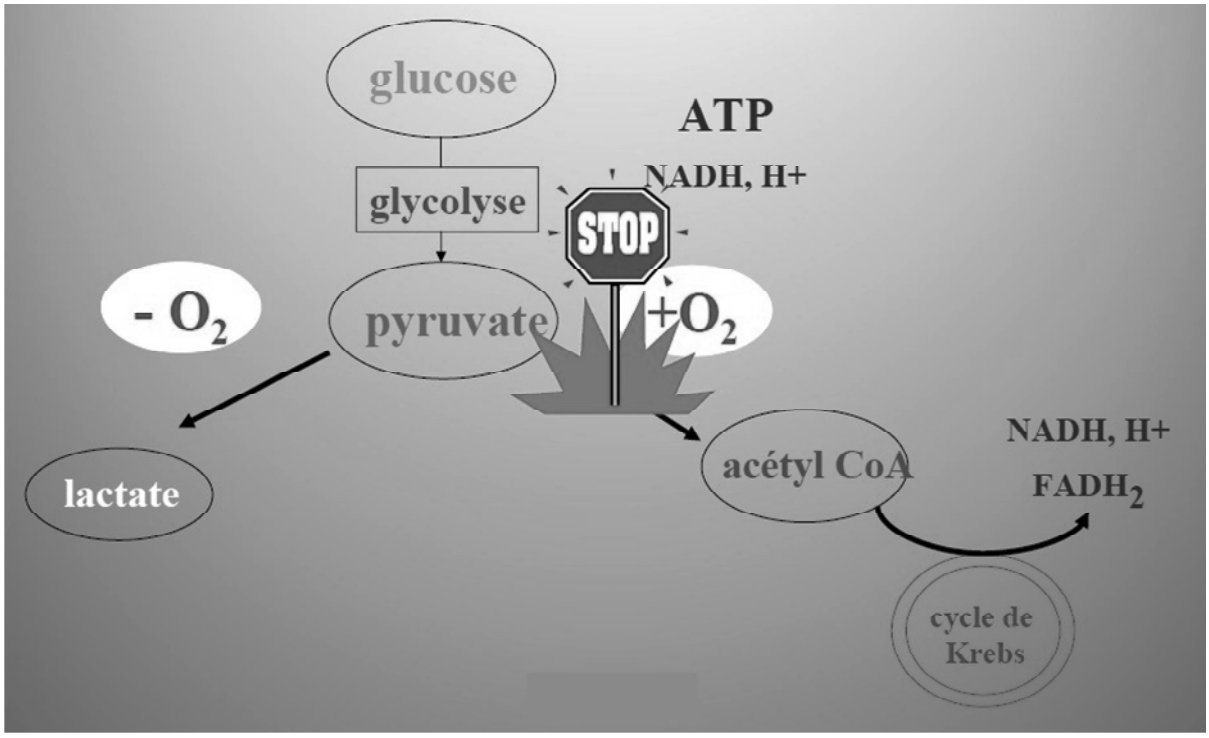


Figure 3 - Glycolyse en absence d'oxygène

La pompe Na^+/H^+ s'active avec la chute du pH, conséquence directe de l'accumulation intracellulaire d'ions H^+. Le Na^+ va être transporté vers l'espace intracellulaire en échange avec le H^+ qui va être transféré vers l'espace extracellulaire. Le Na^+ ainsi présent en quantité importante à l'intérieur de la cellule va attirer l'eau, qui va être responsable d'un œdème intracellulaire. La mitochondrie sera touchée par l'œdème conduisant à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ceci dérive dans la production de ROS oxygénés qui vont détruire la membrane cellulaire (36). Pour éviter ce phénomène délétère pour la cellule, la pompe d'échange Na^+/Ca^{++} est alors activée pour renvoyer vers l'espace extracellulaire l'excédant de Na^+ (32, 37). Le Ca^{++} arrivant au cytosol en échange avec le Na^+ activera plusieurs enzymes protéolytiques et cytolytiques dépendantes de cet ion. Ce processus mène la cellule vers l'apoptose ou mort cellulaire programmée.

L'équilibre cellulaire est altéré suite à l'arrêt de la pompe Na^+/K^+ ATP dépendante par épuisement des réserves énergétiques. L'arrêt du fonctionnement de cette pompe ATPase entraîne une fuite du potassium par diffusion passive vers le milieu extracellulaire ainsi qu'une entrée de sodium (38). Cela altère l'homéostasie puisque la cellule n'est plus capable de transporter les ions contre le gradient de

concentration, l'eau est attirée vers le milieu intracellulaire par l'entrée du sodium conduisant vers l'œdème cellulaire (39). Toutes les fonctions cellulaires nécessaires à l'équilibre de la cellule seront alors touchées par l'œdème conduisant à une perturbation profonde du métabolisme **(Figure 4)**.

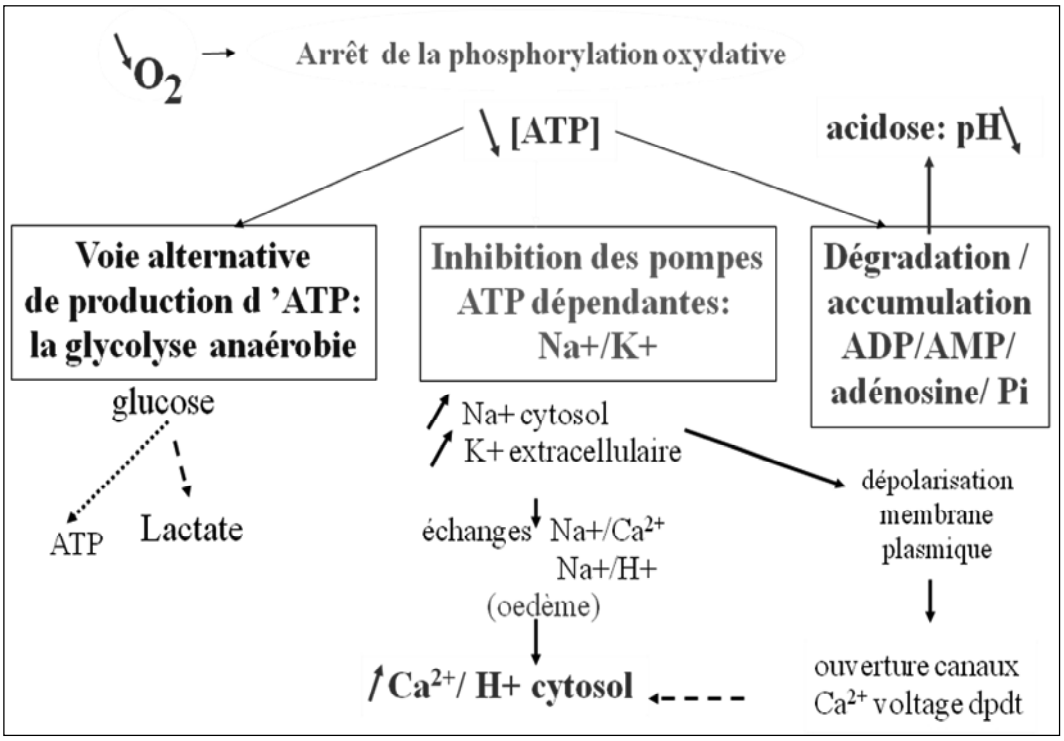


Figure 4 - Conséquences de l'ischémie a niveau cellulaire

La mitochondrie est le principal producteur d'ATP. L'organelle concentre plusieurs voies impliquées dans l'apoptose qui vont s'activer dans les premières trente minutes de la reperfusion (40-45). La production de ROS couplée à l'augmentation de la concentration de calcium dans le cytosol et à la diminution du pH par l'accumulation d'acide lactique conduit vers une perméabilisation de la membrane mitochondriale. La chaîne respiratoire mitochondriale est alors altérée, menant à une augmentation d'anions. Ces anions vont interagir avec l'oxygène restant pour déboucher sur la production d'une espèce radicalaire particulièrement active : l'anion superoxide O_2^- (46).

Il existe des mécanismes de défense capables de protéger la cellule des lésions induites par les ROS basés sur la mise en œuvre de mécanismes enzymatiques **(Figure 5)**. La manganèse superoxyde dismutase (MnSOD) est une

métallo-enzyme qui prend en charge l'anion superoxide O_2^- pour le transformer en radical hydroxile OH^- (47). La glutathion/glutathion peroxydase capte les radicaux hydroxiles pour les transformer en H_2O. Cependant les systèmes de protection cellulaire anti oxydante perdent de leur efficacité au fur et à mesure que le temps d'ischémie augmente, laissant la cellule sans mécanisme de protection au moment de la reperfusion (48).

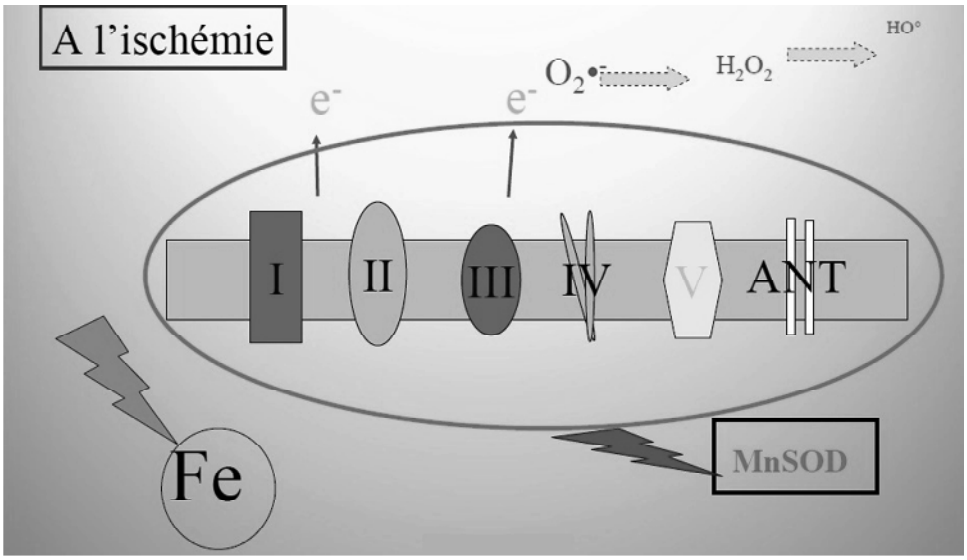


Figure 5 - Mécanismes de défense cellulaires face aux ROS.

Les liquides de conservation hypothermiques utilisés actuellement ont été modélisés pour les protéger des effets néfastes de l'ischémie. Malgré tous les efforts réalisés pour préserver la fonction cellulaire, l'épuisement de la réserve énergétique conduit à une accumulation de déchets toxiques issus du métabolisme anaérobie. Les lésions induites lors de la phase ischémique ne constituent que la partie émergeante de l'iceberg et elles seront exacerbées par l'apport brutal d'oxygène à la reperfusion.

Le métabolisme cellulaire est ralenti grâce à l'hypothermie, cependant la réserve d'ATP s'affaiblit considérablement après 4 heures d'ischémie froide (49). L'hypothermie comme nous l'avons vu n'étant pas capable d'arrêter le métabolisme cellulaire et la production d'ATP en anaérobie étant insuffisante, la cellule se retrouve en situation d'acidose et œdème cellulaire (17, 49, 50).

L'hypothermie provoque également d'autres bouleversements des fonctions cellulaires. Les cellules endothéliales particulièrement sensibles à l'ischémie vont s'activer et entrer en apoptose ce qui conduit à leur desquamation (51). La perte d'intégrité des cellules tapissant les vaisseaux sanguins durant l'ischémie facilite alors la migration des leucocytes activés dans l'espace sous endothélial (diapédèse) lors de la reperfusion ce qui va participer à l'inflammation par activation du système immunitaire inné du receveur. L'ischémie prépare de cette manière le terrain pour la constitution des lésions au moment de la reperfusion.

2.3.2 Lésions induites pendant la phase de reperfusion

La reperfusion se caractérise par la majoration des lésions pré existantes dues à l'incapacité des mécanismes protecteurs de protéger la cellule face à l'exacerbation de la production de ROS. Le mécanisme lésionnel dans cette phase est d'une part inflammatoire et d'autre part immunologique (34, 52) **(Figure 6)**.

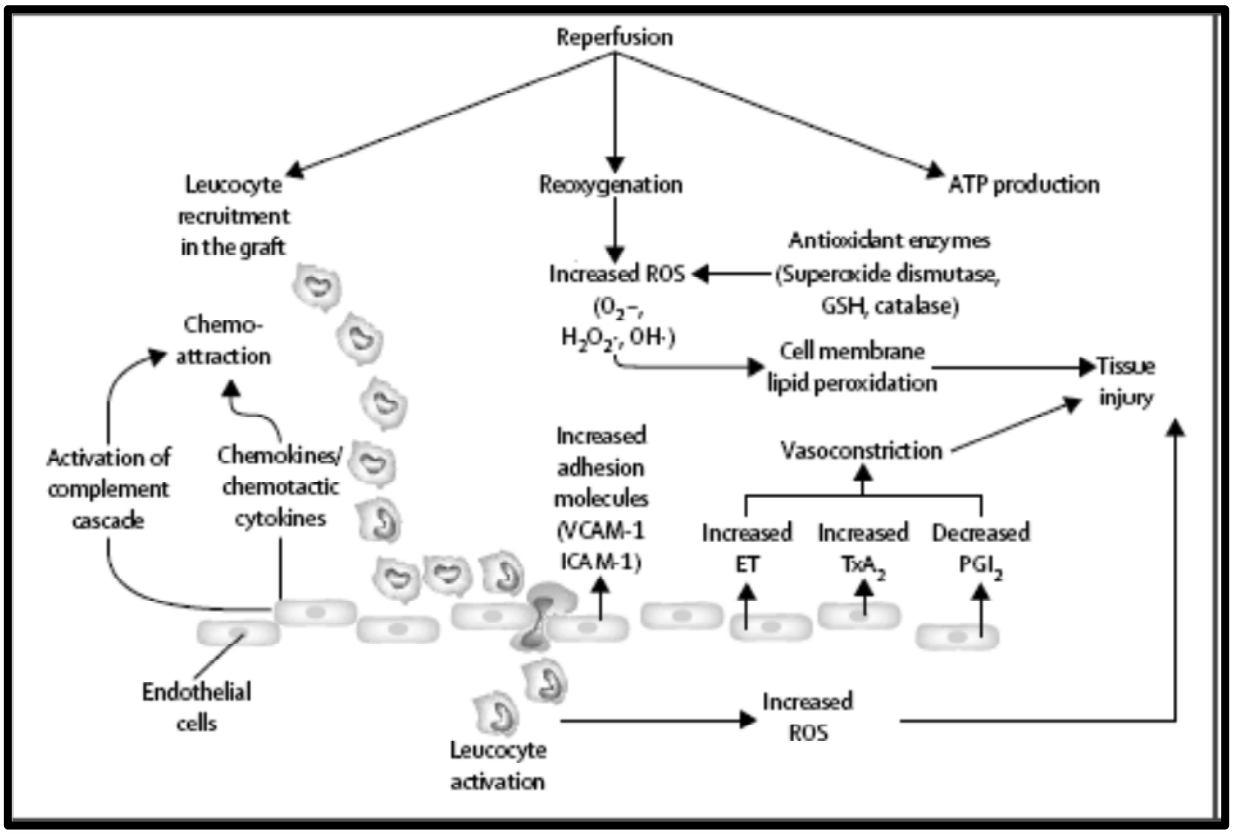


Figure 6 - Syndrome de Reperfusion selon N. Perico.

Durant la phase d'ischémie se produit une vasoconstriction globale au sein du greffon. Cela se traduit à l'échographie doppler par une élévation des résistances intra-rénales et cliniquement par des zones violacées visibles à la surface du greffon. Cela est dû aussi en partie à une compression du lit vasculaire par l'œdème. Ce phénomène est connu comme le « no-reflow » (53).

L'afflux du sang riche en oxygène au greffon sensibilisé pendant l'ischémie va faciliter une réaction immuno-inflammatoire. Les polynucléaires neutrophiles et les macrophages activés expriment des molécules d'adhérence à leur surface qui permettent aux leucocytes de s'accrocher aux cellules endothéliales. Les cellules endothéliales lésées expriment aussi à leur surface des molécules d'adhérence telles que ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) ou VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), les intégrines et les sélectines E, P et L (54). L'hyperexpression de molécules d'adhérence augmente le « Rolling » leucocytaire provoquant une agglomération des cellules au niveau de la lumière vasculaire favorisant encore d'avantage le phénomène de « no-reflow » (53, 55, 56).

D'autres molécules exprimées à la surface des cellules endothéliales endommagées participent au phénomène de « no-reflow ». Les phospholipides pro-coagulants (57) vont induire une micro-thrombose vasculaire qui se rajoute aux mécanismes préalablement décrits pour majorer la souffrance de l'organe lors de la reperfusion (55).

Lors du déclampage vasculaire l'organe va se revasculariser de manière inhomogène car certains territoires seront mal reperfusés. Les lésions qui vont se constituer au sein de ces territoires mal perfusés seront importantes car elles s'effectuent en ischémie chaude à la température corporelle. L'extension des zones touchées par ce phénomène de « no-reflow » conditionnera au moins en partie la reprise de fonction de l'organe, pouvant aller en certains cas jusqu'à la non reprise de fonction.

La souffrance tissulaire lors de la reperfusion va également conduire à la synthèse de monoxyde d'azote (NO). Ce puissant vasodilatateur interagit avec les ROS conduisant à la production de peroxynitrites (ONOOH) **(Figure 7)**. Cette espèce radicalaire contribue fortement aux lésions de l'IR (34).

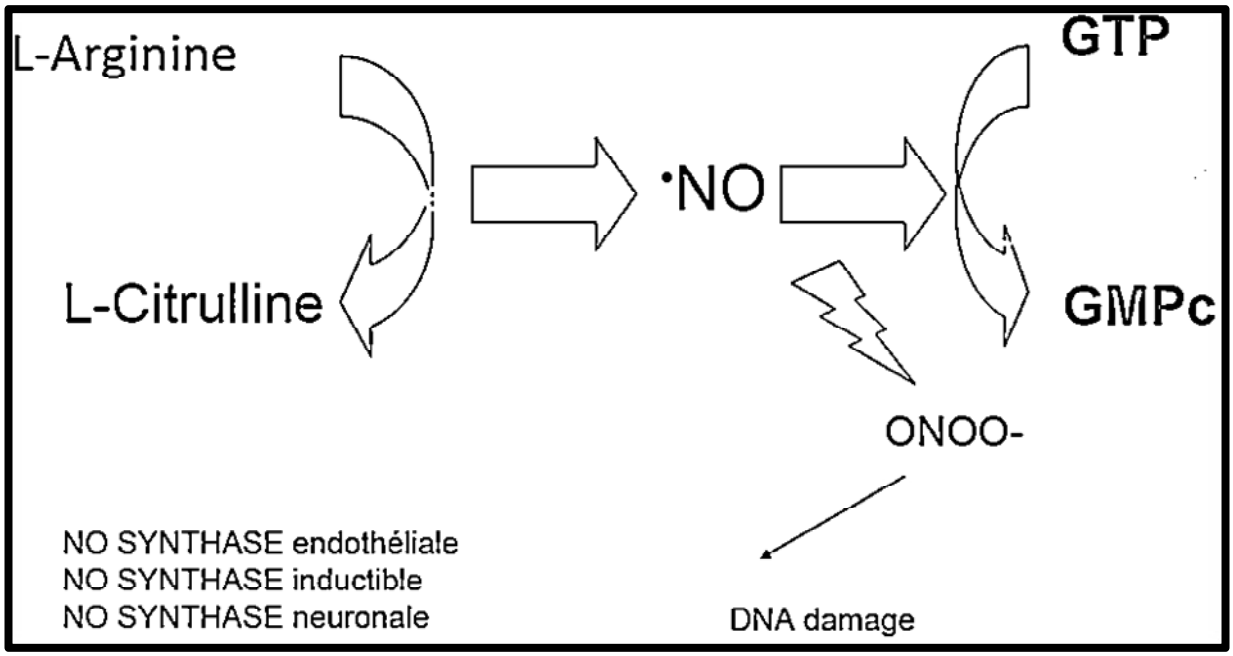


Figure 7- Production de peroxynitrites.

L'afflux massif d'oxygène fait basculer le métabolisme qui fonctionnait en anaérobie vers un métabolisme aérobie. Le sang oxygéné dans le greffon va participer à la production de ROS oxygénés qui vont agresser les cellules aidés en cela par un fonctionnement mitochondrial déficient au niveau de l'organe transplanté. Une grande partie des lésions tissulaires touchant les organes sont donc liées à la fabrication de ROS oxygénés par le rein et c'est la sommation de tous les évènements induisant l'accumulation de ROS qui va conditionner l'importance des lésions tissulaires induites au moment de la reperfusion lors de la transplantation rénale (26).

Les systèmes de défense cellulaire sont dépassés ne pouvant pas prendre en charge la production importante de ROS. L'exacerbation de la production d'espèces radicalaires induit la peroxydation des lipides de la membrane mitochondriale. Cette membrane devient alors incompétente et se rend perméable au cytochrome C (58) qui passe vers le cytosol activant la caspase 9, celle-ci activera la voie intrinsèque de l'apoptose (59) **(Figure 8)**. Le stress oxydant contribue aussi à la libération du

calcium contenu à l'intérieur du réticulum endoplasmique activant un certain nombre d'enzymes protéolytiques. Ce processus conduit à des lésions tissulaires plus ou moins réversibles au sein de l'organe transplanté ; l'importance des lésions conditionnera la réversibilité ou non de lésions et impactera sur le type de reprise de fonction.

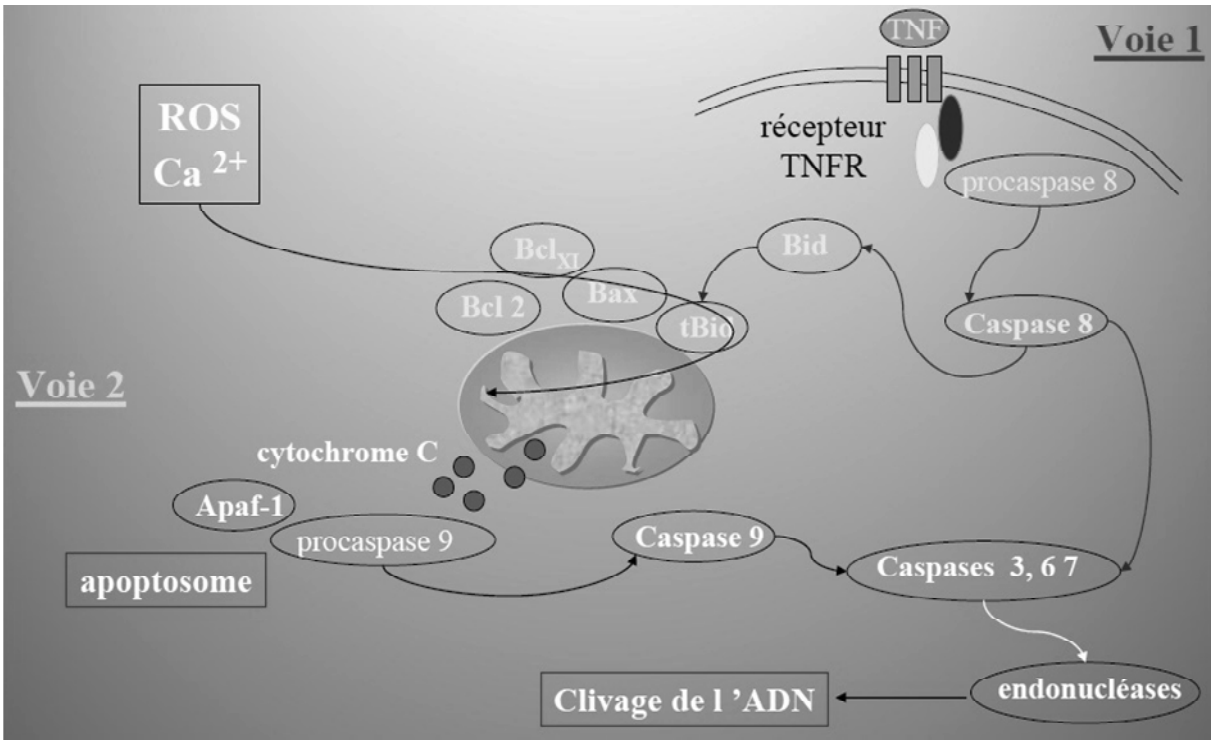


Figure 8 - Voies de déclenchements de l'apoptose

2.3.3 Lésion d'IR : Réponse inflammatoire et réponse immune

Lors d'une greffe rénale, la mort encéphalique (par la libération massive de cytokines pro-inflammatoires) (60), le prélèvement du transplant, et les conditions de conservation provoquent un stress oxydatif important conduisant à des dommages cellulaires plus ou moins réversibles (61, 62). Outre la constitution de ROS, les mécanismes d'agression tissulaire (61, 63, 64) passent par l'activation de la cascade du complément et la stimulation des récepteurs impliqués dans la reconnaissance de signaux «danger» **(Figure 9)**. Ces signaux vont être reconnus par des récepteurs Toll (TLR) et CD44 à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales. La stimulation de TLR-2 et TLR-4 (65) situés à la surface des cellules effectrices du système immunitaire inné (cellules dendritiques, monocytes, granulocytes) va

permettre de déclencher la réponse inflammatoire (62, 66-68) par induction d'une signalisation intra cellulaire impliquant notamment les MAPK ; ceci conduit à l'activation du complément (69, 70) et du complexe d'attaque membranaire et aux lésions cellulaires.

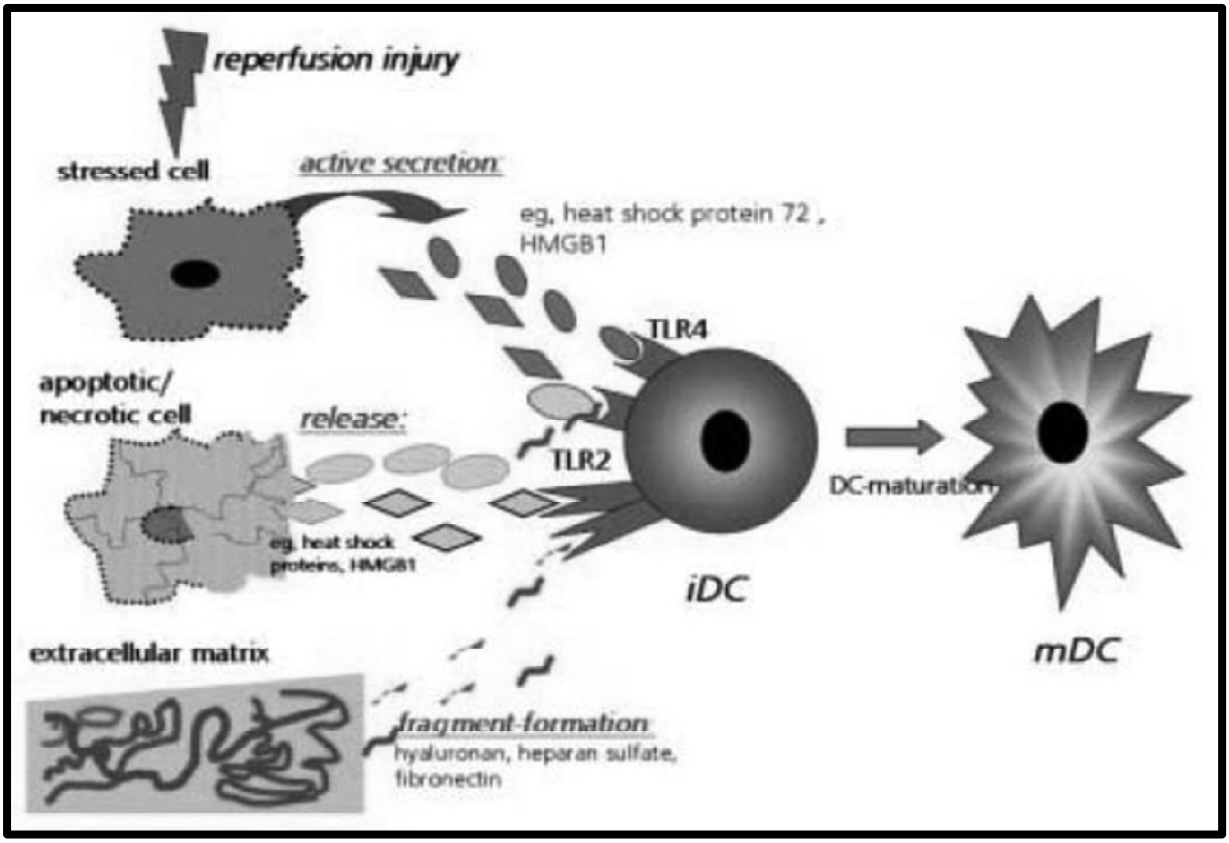


Figure 9 - Signaux de danger, réponse inflammatoire selon W. Land.

Au niveau des tissus lésés, de nombreux composants comme les protéoglycanes, l'acide hyaluronique, des protéines de choc thermique (hsp70), et les molécules cellulaires oxydées et dégradées, vont accentuer l'émission des signaux danger et la boucle de stimulation (71). Les cellules endothéliales, particulièrement sensibles à l'ischémie, vont s'activer et surexprimer les molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et Sélectines E, P, L) favorisant « le Rolling » des leucocytes et leur migration vers les tissus.

Par ailleurs, durant la réponse inflammatoire, certain effecteurs de l'immunité innée (cellules dendritiques et macrophages, principalement) vont présenter les antigènes du greffon libérés lors de la destruction tissulaire aux lymphocytes du receveur, conduisant à l'activation de la réponse immunitaire adaptative (62, 67, 72-

74). La surexpression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II, va catalyser l'allo-reconnaissance. Au niveau tissulaire, les molécules pro-inflammatoires et chimio-attractives **(Figure 10)** vont attirer et activer les cellules immunitaires du receveur (facteurs du complément C3a et C5a, des cytokines et chimiokines comme le TNF-alpha, l'IL-1beta, l'IFN-gamma, l'IL-8 ou CCL2) (62, 66-68, 75-80). Le greffon est ainsi rapidement infiltré par les leucocytes au moment de la reperfusion. (66, 67, 73, 81).

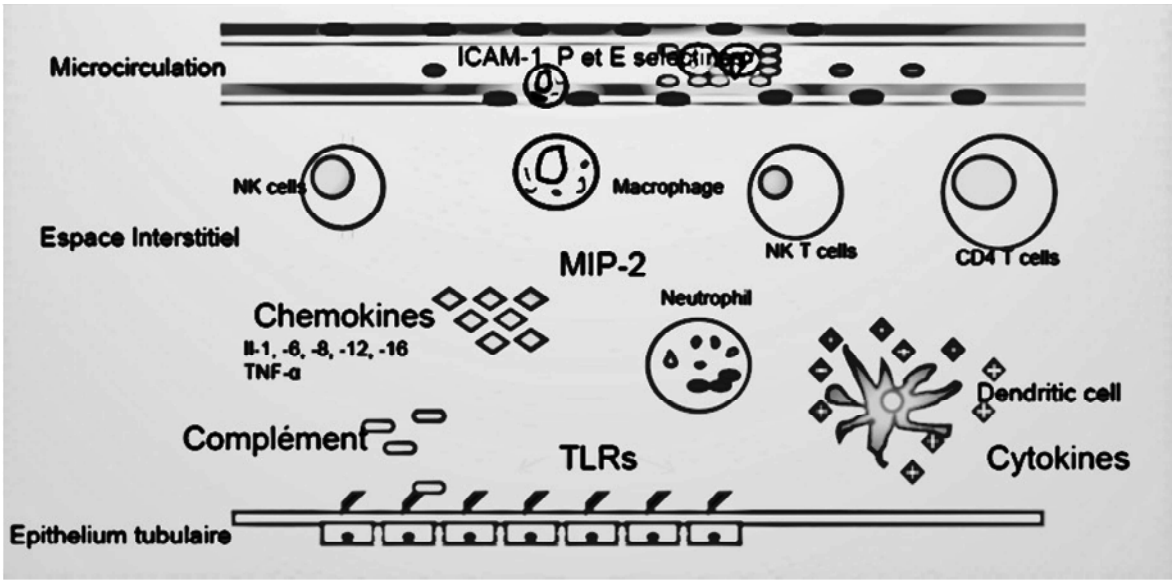


Figure 10 - Principales facteurs de la réaction inflammatoire.

Cette stimulation par l'immunité innée de l'immunité adaptative joue un rôle crucial dans l'induction du rejet (66, 67, 73, 81) qui prend part au long cours à la dysfonction chronique du greffon. Outre l'amélioration de la reprise de fonction des greffons, les différents outils visant à réduire le phénomène d'IR vont donc contribuer à limiter la stimulation des mécanismes inflammatoires médiés par l'immunité innée, et in fine limiter l'agression tissulaire spécifique et non spécifique qui impacte négativement la survie des greffons.

2.4. Outils de prise en charge de l'ischémie reperfusion

La pénurie d'organes est considérée comme l'obstacle principal auquel doit faire face la transplantation rénale aujourd'hui, ce qui rend les greffons rénaux particulièrement précieux (82-84).

Cette pénurie de reins conjuguée à une détérioration de l'état des donneurs a progressivement amené les équipes de transplantation à revoir leurs critères de prélèvement (85-87) et à évaluer l'intérêt clinique que peut revêtir l'utilisation de reins qui étaient considérés il y a quelques années encore comme non transplantables et qui entrent dans la catégorie des reins dits « marginaux » ou « à critères élargis » (88). Ces reins proviennent de donneurs âgés, aux antécédents de pathologie pouvant affecter la filtration (HTA, diabète,…), ou présentant un pourcentage important de glomérulosclérose, une ischémie froide prolongée, voire une insuffisance rénale. Il est clairement établi que les conditions de conservation des organes durant et après leur prélèvement jouent un rôle clef dans leur reprise de fonction immédiate mais également sur leur fonctionnement au long cours. Une grande partie des lésions tissulaires touchant les organes sont au moins partiellement liées à la fabrication par le rein de ROS dès la phase de réanimation, et ces lésions s'accumulent durant le prélèvement, la période de conservation hypothermique, pour se majorer lors du déclampage vasculaire du fait de la reperfusion (26). C'est pour cela qu'un certain nombre d'équipes recherchent des outils plus efficaces qui permettent de limiter les lésions tissulaires induites aux différents temps de la préparation du donneur, du prélèvement d'organe, de l'ischémie et de la reperfusion afin d'optimiser la reprise de fonction des reins. Outre le choix du liquide de conservation et l'utilisation des machines de perfusion qui ont fait la preuve de leur efficacité, d'autres stratégies sont encore en cours d'évaluation. Le pré conditionnement ischémique des greffons rénaux et le conditionnement post ischémique font partie des stratégies étudiées pour lutter contre les lésions d'ischémie reperfusion.

2.4.1 Le pré conditionnement ischémique (PCI)

Le pré conditionnement vasculaire ischémique est bien connu en transplantation cardiaque et hépatique et est utilisé en pratique clinique par quelques équipes. Il consiste à réaliser des ischémies chaudes successives de l'organe de courtes durée (5 minutes environ) qui vont avoir pour objectif de mettre en veille tous les mécanismes de défense tissulaire impliqués dans la lutte contre l'ischémie tissulaire, avant de procéder au clampage complet de l'organe (et à son refroidissement par le liquide de préservation en situation de prélèvement). Il est ainsi montré que les cœurs ou les foies ayant subis un pré conditionnement vasculaire développent moins de lésions tissulaires au moment de la reperfusion ce qui va se traduire par une meilleure reprise de fonction (89-91).

Le mécanisme physiopathologique d'induction de tolérance à l'ischémie n'est pas encore très clair. Des nombreux médiateurs ont été incriminés dans ce processus tels que le NO, l'endothéline, les protéines de choc et l'adénosine ; par contre, ces médiateurs diffèrent probablement entre les organes et entre les espèces (92). L'adénosine, la bradykinine et les opioïdes libérés durant les intervalles d'ischémie induisent la mobilisation des phospholipases cellulaires aboutissant à la translocation de la protéine kinase C du cytosol vers la membrane cellulaire. Ceci joue un rôle essentiel dans la protection cellulaire face à ischémie (92). De plus, il existe un phénomène protecteur humoral qui agit à distance, appelé PCI remote (PCIR) et qui protège les organes face à l'ischémie. Les mécanismes impliqués ne sont pas encore bien connus mais des médiateurs humoraux tels que la bradykinine, l'adénosine et les opioïdes (93) semblent impliqués. Certains auteurs ont décrit un mécanisme de médiation neuronale qui transférerait une protection à distance de l'organe conditionné vers un autre organe susceptible de subir une ischémie prolongée (92).

Le PCI a donc démontré son effet protecteur face à l'ischémie, sur l'organe cible et à distance de cet organe (94-98). Il existe un large spectre de protocoles utilisés pour conférer cet effet protecteur. Le PCI est normalement réalisé via des cycles courts d'ischémies chaudes successives. Les cycles appliqués à un organe cible donné peuvent varier en temps et en nombre. De plus, l'intervalle entre les séquences de PCI et l'ischémie ultérieure peut également varier ; en effet, deux

fenêtres de protection envers l'agression ischémique ont été définies : l'une précoce à partir de la fin du PCI « early window of protection » et la seconde plus tardive pouvant s'étendre à plusieurs semaines après le conditionnement et appelée « late window of protection ».

L'analyse des données expérimentales du PCI a contribué à optimiser les protocoles utilisés dans les modèles animaux et à mieux approcher les conditions cliniques utilisables (99-101). Une méta analyse a montré que dans plusieurs travaux publiés réalisés chez l'animal utilisant comme paramètres d'étude la créatininémie, l'urée et les lésions histologiques, le PCI était en mesure d'induire une protection du rein face aux lésions d'IR (102). Toutefois les limites des modèles expérimentaux doivent être rappelées puisque en particulier chez les rongeurs, la fiabilité de la créatininémie comme marqueur de la fonction rénale soulève des questions, l'impact de l'excrétion tubulaire de la créatinine sur la clairance de la créatinine étant plus important chez la souris que chez l'homme (103). Par ailleurs, d'autres marqueurs de lésions rénales tels que KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1) et NGAL (Neurophil Gelatinase-Associated Lipocalin) pourraient avoir un intérêt dans l'évaluation pré clinique et clinique (104) et fournir des informations supplémentaires sur les conséquences de l'IR. Le sexe s'est curieusement révélé être une variable importante sur les résultats obtenus. Il a été démontré qu'il existe une différence significative en faveur du mâle en ce qui concerne l'efficacité du PCI sur le cœur (105). Enfin la protection conférée par le PCI ou par le PCIR semblerait plus efficace quand les séquences appliquées pour obtenir l'effet protecteur sont réalisées dans les 24 heures précédant l'ischémie principale (late window of protection) (102). Ces données sont particulièrement intéressantes pour la transplantation, car les séquences de PCI ou PCIR pourraient être appliquées en amont du prélèvement chez le donneur pour induire une protection sur les organes prélevés ; ainsi au lieu d'appliquer une séquence de PCI directement à l'organe avec des risques de lésion vasculaire que cela peut comporter chez les donneurs présentant un mauvais terrain vasculaire (artériopathie), il est imaginable de réaliser avant le prélèvement des clampages successifs sur l'un des membres sans mettre en danger l'organe à transplanter (102) avec l'induction d'un effet protecteur tout aussi efficace.

En somme bien que le PCI et le PCIR se soient révélés efficaces pour protéger le rein face à l'ischémie dans plusieurs modèles expérimentaux chez

l'animal (93, 106, 107) ; les PCI et le PCIR n'ont pas fait l'objet d'études de bon niveau de preuve pour le rein chez l'homme. Plusieurs études cliniques ont cependant été réalisées pour le cœur ; un certain nombre d'études ont analysé le PCI chez des patients ayant subi un pontage aorto-coronarien montrant que cette procédure est capable de réduire les besoins en inotropes, les arythmies ventriculaires et de raccourcir le séjour en réanimation (108) ; par contre ce bénéfice n'a pas été démontré sur toutes les variables étudiées (109-113). Malgré l'effet positif du PCI et du PCIR face aux lésions d'IR dans des nombreuses études expérimentales chez l'animal, ces résultats ne sont pas confirmés pour le rein en clinique humaine ; il n'y a pas en particulier de consensus sur le nombre de stimuli ischémiques, ni sur le temps nécessaire entre les cycles pour l'obtention de l'effet protecteur. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués et de voies de signalisation devrait probablement permettre d'obtenir des résultats mieux reproductibles. Le PCI constitue donc une voie de recherche intéressante ; ces effets protecteurs pourraient s'additionner à ceux des liquides et des modalités de conservation utilisés pour lutter contre les lésions d'IR ; les stratégies actuelles devant être améliorées notamment quand il s'agit de greffons marginaux (qui constituent 50 % des greffons et une cible privilégiée pour la constitution des lésions d'IR). Outre les implications en transplantation, le PCI pourrait également se révéler très utile lors de chirurgies rénales qui imposent un clampage pédiculaire plus ou moins prolongé (114, 115).

2.4.2 Liquides de conservation d'organes

2.4.2.1 Histoire des liquides de préservation

Au début de la transplantation rénale, dans les années 50, les organes étaient prélevés chez des donneurs vivants. Ces greffons étaient simplement refroidis au contact de la glace ou rincés avec du Ringer avant la transplantation compte tenu du fait que les temps d'ischémie étaient très courts. L'introduction du prélèvement d'organes à partir des donneurs en mort encéphalique, qui rallonge ce temps d'ischémie, a obligé les équipes de transplantation à développer des solutions de conservation d'organes plus performantes. Historiquement la première solution a été développée par Collins et ses collaborateurs en 1969 (116, 117) ; il s'agissait d'une solution de type intracellulaire (à haute concentration de potassium et basse concentration de sodium) qui permettait de bloquer les mouvements d'eau durant la période de conservation et de limiter l'œdème intracellulaire. Cette solution qui présentait un problème de précipitation liée à la présence de magnésium a rapidement fait l'objet d'une modification par le réseau d'Eurotransplant (suppression du magnésium et rajout du glucose) et a alors porté le nom d'EuroCollins. Cependant l'EuroCollins donnait de très mauvais résultats en transplantation hépatique et pancréatique et c'est pour cela qu'en 1980 Folkert Belzer a développé aux Etas Unis la solution de l'Université de Wisconsin (UW). Il s'agissait là encore d'une solution de type intracellulaire mais à laquelle ont été adjointes différentes molécules dont un imperméant et un colloïde permettant une amélioration considérable des conditions de conservation et de réaliser des transplantations de foies et de pancréas avec de bons résultats ce qu'il n'était jusque-là pas possible d'obtenir avec l'Eurocollins. Grâce aux travaux de Belzer le concept de conservation d'organes solides va prendre un intérêt majeur dans la communauté de transplanteurs (118-120). Outre l'amélioration des résultats de la greffe pancréatique (118) et hépatique (121) l'utilisation du Belzer a également permis une amélioration des résultats en transplantation rénale (122) ; des études ont montré sa supériorité indiscutable face à la solution d'Eurocollins (123-125) ce qui fait que l'UW est devenue le gold standard des solutions utilisées par les équipes de transplantation. Cependant la solution UW présente des inconvénients qui ont été largement décrits (126, 127). La composition de cette solution et notamment son caractère hyperpotassique

s'accompagne d'une dépolarisation membranaire et d'une vasoconstriction de l'organe ; cela a conduit un certain nombre d'équipes à modifier sa composition pour la rendre plus physiologique. Ainsi certains auteurs ont proposé, suite à la réalisation de travaux expérimentaux chez le gros animal, d'inverser la concentration de sodium et de potassium. Cette modification de la composition de la solution UW, devenue une solution de type extracellulaire, permet d'améliorer les conditions de conservation et la reprise de fonction des reins en particulier (126, 128).

Au cours du temps il est devenu clair que le caractère extra cellulaire et l'adjonction aux solutions d'un imperméant (qui ne soit pas du glucose) et d'un colloïde est en mesure d'améliorer les conditions de conservation. En effet une solution intracellulaire riche en potassium et dépourvue de colloïde provoque lors de la conservation une entrée massive d'eau à l'intérieur de la cellule. Cela conduit à une activation des pompes ATP dépendantes afin de maintenir l'homéostasie, mais conduit rapidement à un épuisement des réserves énergétiques et à l'apparition d'un œdème intracellulaire pendant la phase d'ischémie froide. De plus, le caractère hyperpotassique de la solution provoque une vasoconstriction de tout le réseau artériel du greffon accroissant le phénomène de « no-flow » à la reperfusion. La concentration élevée en glucose (utilisé comme imperméant mais métabolisé par la cellule) et en phosphate de la solution d'Eurocollins (hyper-osmolarité), induit des lésions cellulaires par afflux du glucose à l'intérieur de la cellule (129). Le métabolisme du glucose rendu à la cellule provoque en situation d'ischémie une activation de la glycolyse anaérobie qui induit la formation de lactate et expose la cellule à une acidose importante (129, 130). Notons enfin que le Belzer (UW) contient du HES (Hydroxyethyl-Starch) utilisé comme colloïde et que cette molécule a été reconnue comme néphrotoxique dans les années 90 (131-133) ; elle conduit par ailleurs à l'agrégation et à la constitution de micro thrombis de globules rouges qui sont potentiellement délétères au moment de la revascularisation de l'organe.

Fort de ces constatations plusieurs solutions de conservation d'organes extracellulaires de nouvelle génération ont vu le jour, et utilisent comme colloïdes du PEG (Poly Ethylène Glycol) à la place de l'HES avec d'excellents résultats (134, 135).

2.4.2.2 Liquides de préservation : vers de nouvelles compositions

Le plasma, présente physiologiquement une température à 37°C et une osmolarité de 308 mOsmol/L. Les liquides de conservation doivent approcher au maximum cette osmolarité pour limiter les échanges entre les compartiments extra et intra cellulaires et maintenir l'équilibre ionique entre les deux compartiments. L'osmolarité proche du sang nécessite une pression oncotique importante ce qui rend la solution de conservation visqueuse. La viscosité élevée dans une solution de préservation conditionne la qualité du rinçage, celui-ci étant de moins bonne qualité avec les solutions les plus visqueuses.

Les liquides de conservation de référence étaient jusqu'à il y peu des solutions hyperpotassiques, non physiologiques, dont le rapport Na^+/K^+ est à l'opposé de la concentration du plasma (5mM de potassium, 140 mM de sodium, et 2,5 mM de calcium). Il est reconnu que la forte concentration en potassium induit une vasoconstriction par dépolarisation cellulaire qui induit une augmentation de la pression de perfusion et une diminution du débit au moment de la reperfusion. Ceci participe de manière évidente à majorer le phénomène de « no-reflow ».

Par ailleurs, une forte concentration de potassium altère profondément l'homéostasie cellulaire et pousse à l'activation des pompes ioniques Na^+/K^+ ATPase afin de maintenir les concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane cellulaire. Les réserves énergétiques cellulaires sont rapidement consommées alors que la production d'ATP ne peut pas couvrir les besoins. Ceci conduit à une acidose métabolique profonde par production d'acide lactique. Les protons H^+ produits par la dégradation en anaérobie de l'ATP, participent à la lésion tissulaire et à la constitution de ROS. Une des conséquences est l'apparition d'un œdème cellulaire par diffusion passive d'eau vers l'espace intracellulaire.

Durant la phase d'ischémie l'équilibre du calcium est aussi altéré au niveau intracellulaire (réticulum endoplasmique, mitochondrie et cytosol). La distribution du calcium est assurée par les pompes ATP dépendantes, qui en l'absence d'ATP ne peuvent plus prendre en charge l'afflux massif de calcium libre intracellulaire (63). Au moment de la reperfusion (qui conduit à une augmentation brutale de la température

de l'organe) le calcium accumulé va activer des protéases calcium dépendantes présentes dans le cytosol (ex : calpaïne) (17, 42, 50, 63, 136, 137) et vont participer à la constitution des lésions précédemment décrites dans la séquence d'IR (138) **(Figure 11)**.

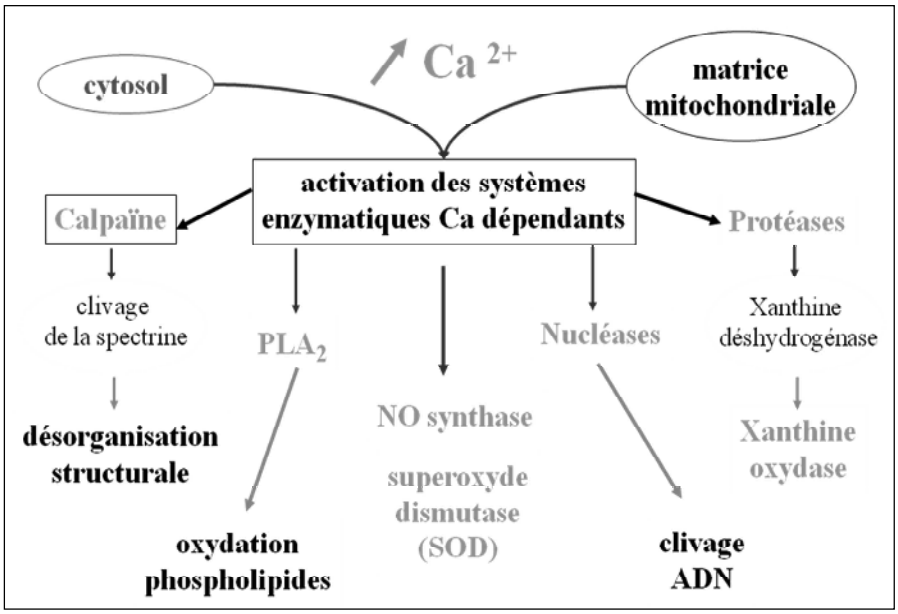


Figure 11 - Effets de l'afflux calcique intracellulaire.

L'acidose générée par la consommation d'ATP en condition d'anaérobie doit être maîtrisée par la solution de conservation en ajoutant un tampon à la solution afin de stabiliser le pH au niveau intra et extracellulaire (139). L'histidine, L'HEPES, le bicarbonate, le phosphate et le tryptophane sont des molécules classiquement utilisées comme tampon pour amortir les variations du pH (139-141).

La dégradation du glucose, source énergétique de la cellule, est à l'origine de l'acidose durant la phase d'ischémie par production d'acide lactique (130). Cet élément nécessaire au métabolisme cellulaire doit être présent dans la solution de préservation mais sa concentration devra être limitée afin d'éviter l'acidose.

L'œdème tissulaire, engendré par le phénomène d'IR conduit à une dégradation de la matrice extra cellulaire qui met en jeu la viabilité de la cellule. L'œdème conduit par ailleurs à une compression du lit vasculaire et à une augmentation des résistances vasculaires ; cela favorise le développement de zones d'ischémie au moment de la reperfusion (phénomène de « no-flow ») (142). De ce

fait les solutions doivent impérativement contenir des molécules qui exercent une pression oncotique protégeant l'organe de l'œdème (61, 142-146).

Il existe traditionnellement deux types de molécules qui limitent l'œdème tissulaire :

2.4.2.2.1 Les imperméants

Les imperméants, qui se divisent en deux catégories :

1) Les sucres tels que la raffinose, la sucrose, le mannitol, etc ; ces molécules sont capables de créer une pression osmotique forte dans le compartiment vasculaire et limitent l'œdème tissulaire.

2) Les anions tels que le citrate, le gluconate ou l'acide lactobionique. Ces molécules ont un double mécanisme d'action pour protéger les cellules, elles limitent l'œdème cellulaire et elles présentent un effet protecteur de membrane.

2.4.2.2.2 Les colloïdes

Les colloïdes tels que l'hydroxyéthyl-amidon, le polyéthylène glycol, l'albumine, le dextran, etc ; ces grosses molécules ont une taille qui ne leur permet pas de traverser les membranes cellulaire : elles exercent une pression oncotique qui limite l'œdème interstitiel et cellulaire. L'adjonction de ce type de molécules est d'autant plus intéressante que le temps d'ischémie est long. L'albumine semble la molécule la mieux adaptée physiologiquement mais son prix constitue une vraie barrière à son utilisation. Les colloïdes tels que l'hydroxyéthyl-Starch (HES) contenu dans l'UW, le polyéthylène glycol présent dans plusieurs solutions de quatrième génération, ainsi que le dextran sont moins onéreux. Le HES est par ailleurs à l'origine d'une néphrotoxicité qui a été décrite par plusieurs auteurs (147-149). Cette molécule induit aussi une agrégation érythrocytaire (150, 151) dont nous avons déjà parlé. Le polyéthylène glycol est doté de trois qualités : il s'agit d'une molécule neutre, non toxique, la pression oncotique apportée par cette molécule limite efficacement l'œdème interstitiel et cellulaire (143, 144, 146, 152) ; et elle pourrait conférer une immunoprotection par son ancrage à la membrane cellulaire ou le PEG masquerait les antigènes situés à la surface des cellules endothéliales (153, 154). Cet immunocamouflage attribué à l'utilisation du PEG a été démontré par plusieurs

études expérimentales pour le cœur (155-157), le foie (158), l'intestin (159), le pancréas total (160) et les îlots pancréatiques (153, 161, 162), le rein (163), le poumon (164, 165), les leucocytes (162) et les globules rouges (166-171).

Durant les années 90, 2 nouvelles solutions de préservation cardiaque, une conçue par H.J. Breitschneider, le Custodiol® ou HTK (histidine-tryptopane-kétoglutarate) et une autre le Celsior® mise au point par P. Menasche, ont été étendues à la préservation des organes abdominaux. Elles se caractérisent par une concentration relativement basse de potassium et sont classées comme des solutions de troisième génération.

Le travail publié par De Boer (172), qui a comparé prospectivement l'UW (solution de deuxième génération) à l'Eurocollins (solution la plus ancienne ou de première génération) et à l'HTK ou Custodiol® (solution de troisième génération) chez des donneur à cœur battant a montré une nette supériorité de l'UW par rapport à l'Eurocollins mais également de HTK par rapport à l'Eurocollins. Cette étude comme d'autres (173) n'a pas pu mettre en évidence de différence entre l'UW et l'HTK pour des temps d'ischémie froide courts. Cependant lorsque les temps d'ischémie froide dépassent 24 heures une étude rétrospective (123) réalisée sur 323 transplantations rénales comparant des reins conservés avec HTK à ceux préservés avec UW, le taux de RRF de greffons serait significativement inférieur dans le groupe UW, et la survie des transplants à un an significativement meilleure avec UW. Le moins bon effet du Custodiol® pour des temps d'ischémie prolongée serait due au fait que cette solution ne contient pas de colloïde.

On peut donc actuellement considérer que la solution idéale doit :

- Respecter les concentrations ioniques du plasma surtout en ce qui concerne le sodium et le potassium (et donc être de nature extracellulaire).
- Etre pourvue d'un imperméant qui ne doit pas être du glucose car il interfère avec le métabolisme cellulaire et majore l'acidose mais doit plutôt être un sucre non métabolisé (Raffinose par exemple) ou du lactobionate.
- Etre pourvue d'un tampon qui permette de compenser l'acidose induite par le métabolisme anaérobie.
- Etre pourvue d'un colloïde non toxique qui protège l'organe de l'œdème avec une option préférentielle pour un PEG.

2.4.2.3 Liquides de préservation : Quatrième génération

Plusieurs solutions dites de quatrième génération ont vu le jour ces dernières années. L'ajout des colloïdes et notamment du PEG aux liquides de préservation a fait l'objet de nombreuses études qui ont démontré leur efficacité pour lutter contre l'œdème interstitiel et cellulaire.

La prévention de l'œdème tissulaire par le PEG avait été décrite par Robinson en 1971 (143). Robinson a poursuivi ses travaux et a montré que le PEG agissait comme un soluté qui ne traverse pas les membranes et qui exerce une pression oncotique qui limite l'œdème tissulaire, sans perturber l'équilibre ionique des compartiments intra et extracellulaires (143-145). Daniel et Wakerley ont utilisé le PEG 20 kDa dans un modèle de cellules rénales porcines, montrant que ce colloïde non toxique permettait de maintenir la viabilité cellulaire au cours de la préservation (146). Ganote en 1977 a montré que le PEG 6 kDa était capable empêcher l'œdème cellulaire lors de la préservation de tissu cardiaque de rat, et limitait les lésions dues à l'absence d'oxygène et à l'hypothermie (152). Le PEG 8 kDa a également été testé dans un modèle d'hépatocytes de rat isolés et préservés pendant 24 heures au froid, celui-ci a montré une efficacité pour réduire l'œdème tissulaire et diminuer la mortalité des cellules (174). Toujours dans un modèle d'hépatocytes de rat, le PEG a encore montré que son pouvoir protecteur était probablement lié à une meilleure conservation des microfilaments d'actine et à une meilleure préservation de l'intégrité de la structure des microtubules (175).

En 1989 la première étude portant sur l'utilisation du PEG en conservation de cœurs de lapins entiers a été publiée ; sur la base de la solution d'Université Wisconsin une modification a été faite au niveau du colloïde employé où l'HES a été remplacé par du PEG 20 kDa, 50g/L. Les résultats de cette étude sont en faveur d'une meilleure conservation de la fonction cardiaque et notamment d'une amélioration de la fraction d'éjection cardiaque lorsque le PEG est substitué à l'HES dans la solution d'UW (156).

Collins et ses collaborateurs se sont aussi intéressés au PEG et ils ont réalisé la première étude clinique publiée dans le Lancet en 1989. Cette étude portait sur

l'utilisation en transplantation cardiaque de la solution de St Thomas modifié par addition de PEG 20 kDa à une concentration de 50 g/L. Un total de 20 patients ont été inclus. Les résultats, très en faveur de l'utilisation du PEG, montraient une diminution du taux de rejet aigu des greffons cardiaques ainsi qu'une survie à 1 an nettement supérieure 95,5% vs 50% par rapport à la solution sans PEG (155). Cette étude a poussé à la réalisation d'autres travaux pour tester l'intérêt de l'utilisation en clinique du PEG. Ainsi ce colloïde a également été testé en conservation hépatique (158), cardiaque (157), intestinale (159), pancréatique (160) ; ces travaux ont confirmé un effet protecteur du PEG qui serait lié au moins en partie à un immunomasquage des molécules de classe I et II du CMH (154). Sur la base de ces publications le PEG est devenu un objet d'études plus approfondies

Dans les années 2000, 2 liquides de préservation ont été créés en France, l'IGL-1® et le SCOT 15®. Ces solutions sont classées comme étant de quatrième génération ; elles sont de type extracellulaire et utilisent comme colloïde le PEG.

L'IGL-1® a fait l'objet de nombreuses publications qui ont montré son efficacité dans la conservation d'organes abdominaux (134, 176). Cette solution caractérisée par une forte concentration en sodium et la substitution du HES par du PEG 35 kDA à 1 g par litre, a été testée dans un modèle murin de rein isolé perfusé ainsi que dans un modèle d'autotransplantation rénale chez le porc (177, 178). Chez le rat ex vivo et chez le porc in vivo, Badet et al. ont pu montrer que l'IGL-1® permettait d'améliorer significativement les fonctions tubulaire et glomérulaire. Cela se traduit par une meilleure reprise de la fonction rénale et une meilleure clairance de la créatinine dans le modèle d'autotransplantation rénale chez le porc en comparaison avec l'UW. Sur le plan histologique chez le porc, l'IGL-1® s'accompagne d'une infiltration cellulaire mononuclée du rein moins dense, par une expression interstitielle atténuée des marqueurs de fibrose, par une diminution des marqueurs d'apoptose et par une diminution de l'expression du CMH. Cette réduction de l'expression du CMH s'accompagne comme l'ont montré d'autres auteurs (100, 179, 180), d'une diminution de l'expression de VCAM-1 et de l'infiltration tissulaire par les CD4+ mais également d'une réduction des lésions de fibrose interstitielle. L'étude de l'expression du marqueur alpha-SMA chez le porc a montré une diminution de la fibrose pour les reins conservés avec de l'IGL-1® (178). Ces résultats sont en rapport avec le caractère extracellulaire de la solution IGL-1®

qui permet de maintenir l'homéostasie ionique, de limiter la vasoconstriction en réduisant la pénétration de calcium dans les cellules et d'éviter la constitution d'œdème des compartiments intra et extra cellulaire (181). D'autres études ont montré les mêmes effets (128) ; pour d'autres organes tels que le foie ou les lésions sinusoïdales et hépatocellulaires sont moins marquées lorsque la solution de conservation utilisée est riche en sodium et pauvre en potassium (182). En clinique humaine l'IGL-1® a fait l'objet d'une étude multicentrique prospective comparative non randomisée avec la solution d'UW, où elle s'est avérée au moins équivalente à la solution d'UW ; dans les premiers 15 jours après la transplantation les patients greffés avec des reins préservés avec l'IGL-1® présentaient une décroissance de la créatininémie plus rapide ainsi qu'une meilleure clairance de la créatinine. Néanmoins cette étude n'a pas pu démontrer une différence significative en ce qui concerne le taux de RRF ni de survie des greffons. Enfin, cette solution a été utilisée avec succès en clinique humaine dans la conservation des greffons hépatiques, pancréatiques, d'îlots pancréatiques et tout dernièrement dans la conservation des tissus composites (183-185).

Dans la solution SCOT 15®, le PEG a un poids moléculaire de 20 kDa. Une des propriétés fondamentales du PEG est de maintenir les molécules d'eau à son contact. Chaque molécule de PEG peut attirer autour de 10000 molécules d'eau ayant une faible mobilité et une haute structuration. Ces molécules d'eau forment une barrière qui masque les sites membranaires. Cela explique le rôle immunoprotecteur des molécules de PEG qui sont en contact avec la membrane cellulaire. Le SCOT 15® est capable des dissimuler les antigènes exprimés à la surface des cellules au moment de la reperfusion, cette qualité du PEG avait déjà été décrite par G.M. Collins et par W.N. Wicomb en 1991 (155). S. Giraud et al. ont pu montrer que le SCOT 15® était capable de prolonger la survie d'une allogreffe d'îlots pancréatiques chez la souris sans aucun traitement immunosuppresseur chez le receveur (153). Par contre l'article publié par H. Perrin et al., est le seul à ne pas être en accord avec la protection immunologique apporté par le PEG (186) probablement parce que le modèle choisi utilisant des unités cellulaires isolées n'était pas adapté. R. Thuillier et al. (187) ont montré dans un modèle d'allo-transplantation rénale chez le porc que la conservation du transplant avec SCOT 15® était capable de prolonger la survie de l'allogreffe de façon significative par rapport aux solutions UW et IGL-1®,

alors que les receveurs n'ont eu aucun traitement immunosuppresseur. La solution SCOT 15® a fait l'objet un rapport préliminaire en transplantation rénale chez l'homme où les auteurs ont pu montrer l'efficacité de ce liquide de conservation. Le SCOT 15® a été comparée à UW avec des meilleurs résultats en terme de taux de RRF, par contre il n'y a pas eu de différence en ce qui concerne la fonction rénale à 3 mois entre le SCOT 15® et UW (188).

Une seule étude qui compare les deux solutions de quatrième génération le SCOT (30g/l de PEG 20 kDa) et IGL-1® (1g/l de PEG 35 kDa) à UW a été réalisée dans un modèle d'allo-transplantation rénale chez le porc. Ce travail montre que la concentration de PEG dans la solution de conservation joue un rôle crucial durant la préservation statique. Ainsi le groupe conservé avec du SCOT présente une supériorité en terme de fonction rénale, de fibrose, de marqueurs de l'inflammation et de l'hypoxie, de marqueurs de transition épithélio mesenchymateuse, par rapport aux solutions d'UW et IGL-1® à un et trois mois du suivi (135). Reste à confirmer ces résultats très intéressants de la conservation statique en clinique humaine.

En somme les solutions de quatrième génération mieux modélisées pour la conservation gagnent du terrain dans la communauté des transplanteurs épaulés par plusieurs publications sérieuses. L'UW longtemps considérée comme la solution de référence sur la base de publications anciennes mais randomisées en clinique humaine devrait progressivement perdre son statut de gold standard.

2.4.3 Machines de perfusion rénale hypothermique

La pénurie d'organe et la modification de l'épidémiologie de la mort encéphalique ont conduit les équipes de transplantation à prélever des greffons jusque-là considérés comme non transplantables en particulier pour les organes provenant de donneurs à critères étendus (critères UNOS, ECD), ou des donneurs décédés par arrêt cardiaque (DDAC).

Dans les conditions de marginalité, la qualité de la préservation des greffons rénaux est cruciale du fait de son impact sur le taux de RRF et sur le taux de PNF (19).

La perfusion rénale hypothermique (PRH) nécessite la canulation de l'artère du rein et la vérification de l'absence de fuites sur le système artériel. Le liquide de perfusion rénale est délivré au greffon, par flux pulsatile (Waters Medical Systems) ou par flux continu à pression variable (Organ Recovery System).

La PRH a été une méthode utilisée par Belzer dans les années 80, il utilisait la perfusion pour les reins soumis à une ischémie froide longue ou pour des reins qu'il considérait de moins bonne qualité (189) mais le coût et la complexité de la PRH lui ont fait préférer la conservation statique (190).

L'utilisation de la machine de perfusion a conduit à la modélisation d'un liquide de conservation spécifiquement utilisable pour la perfusion qui est de nature extra cellulaire et de même composition pour tous les modèles de machines.

Pendant très longtemps une seule machine commercialisée par la société Water Medical Systems (RM3®) **(Figure 1)** était disponible sur le marché. Cette machine se caractérise par une perfusion pulsatile où il existe une alternance de périodes équivalentes à la systole (pression positive de la machine) et de relaxation semblable à la diastole où il n'existe aucune pression forcée induite par la machine mais une restitution d'une partie de la pression due à l'élasticité du système vasculaire si celui-ci est normal. Le système de perfusion développé par Water Medical Systems est le seul qui puisse être considéré vraiment comme pulsatile et dont le fonctionnement se rapproche le plus des conditions physiologiques de

perfusion tissulaire. A contrario, les machines munies d'une pompe à rotation continue comme la machine de perfusion commercialisée par la société Organ Recovery System (LifePort®) s'accompagnent d'une perfusion à pression toujours positive donc continue mais à pression variable (liée à une modification de la vitesse de rotation de la pompe) ; ceci explique que le système vasculaire du greffon soit toujours soumis à une pression positive durant la perfusion **(Tableau 1)**.

La machine de perfusion de Waters RM3® a été largement utilisée ; plus de 45000 perfusions rénales ont été réalisées en clinique humaine. Des études rétrospectives et quelques essais prospectifs non randomisés, concernant l'utilisation de la RM3® ont montré que l'utilisation de cette machine de perfusion permet de diminuer significativement le taux de RRF des transplants (191-195) et améliore la fonction de greffons à deux ans (196) ainsi que leur survie à cinq ans (197).

Le rationnel d'utilisation des machines de perfusion s'est dans un premier temps appuyé sur des données rétrospectives mais également sur des recommandations publiées par l'UNOS qui recommande depuis 2007 l'utilisation des machines de perfusion pour tous les reins mais particulièrement pour ceux issus de donneurs DDAC et ECD.

Sur la base de ces données et d'autres études publiées par quelques équipes européennes, le protocole Français de DDAC oblige depuis 2005 les équipes qui souhaitent développer la greffe à partir de ce type de donneur à utiliser une machine de perfusion pour la conservation des greffons jusqu'à la greffe.

Ce n'est finalement qu'en 2009 qu'un papier du NEJM (198) comparant de façon randomisée l'utilisation de la machine à l'incubation statique pour des paires de reins prélevées chez un même donneur a montré que l'utilisation de la machine permettait d'améliorer la survie de greffon à un an de 4 % mais également de diminuer de façon statistiquement significative le taux de non fonction primaire et de reprise retardée de fonction pour les reins marginaux ; ces résultats ayant été depuis réactualisés et largement confirmés avec plus de trois ans de suivi (199).

Plus en détail, la publication réalisée par le groupe Eurotransplant en 2009 (198) dans le cadre d'une étude randomisée prospective utilisant la machine LifePort®, montre la supériorité de la PRH vs la conservation statique en termes de

RRF (défini dans cette étude comme la nécessité de dialyse dans la première semaine suite à la transplantation), de vitesse de récupération de la fonction rénale, de sevrage de la dialyse (plus rapide) et de survie de greffons rénaux supérieure de 4 % à un an. Les résultats rapportés par les auteurs sont très intéressants car toutes les catégories de greffons ont été randomisées et incluses dans l'étude. L'effet de la PRH est d'autant plus efficace qu'il s'agit d'un rein marginal issus de ECD ou de DDAC (199-201). Une analyse postérieure publiée en 2012 par C. Moers sur l'étude d'Eurotransplant (199) montre que la survie des greffons à 3 ans n'ayant pas de risque de RRF est similaire à celles de reins perfusés, et qu'il existe une différence significative en terme de survie à 3 ans en faveur du groupe perfusé pour les reins à risque de RRF. Par contre, l'analyse réalisée par I. Jochmans concernant les DDAC Maastricht III inclus dans l'étude Eurotransplant indique qu'il n'existe pas de différence significative en terme de survie à un an des greffons ni des patients entre les groupes perfusé et non perfusé, en revanche il existe une différence significative à faveur du groupe perfusé en ce qui concerne le RRF (202).

Il est bien établi que la durée de la conservation statique est étroitement liée à une augmentation du taux de RRF (203, 204), à une élévation de taux de rejet aigu (27, 205), à une diminution de la filtration glomérulaire (206) et à une moindre survie d'allo-greffe (19, 27, 207). Une étude réalisée par Ciancio et al. (208) a montré que des durées de PRH prolongées (au-delà de 30 heures) n'avait pas une influence négative sur l'évolution des greffons par rapport à des durées de PRH moins longues, et que même une durée de PRH prolongée pourrait même avoir un effet protecteur vis-à-vis du greffon face au rejet.

La conservation par PRH semble limiter le risque de rejet du greffon, et cela est très probablement dû à la diminution de l'expression de molécules de surface comme ICAM-1 et les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classes I et II. H. Lauschke et al. ont démontré qu'il existe une diminution de l'expression des molécules de surface sur des foies perfusés (209). Trois études rapportent le taux de rejet aigu prouvé par biopsie rénale des reins perfusés (198, 210, 211). L'essai réalisé par Danielewicz et al (211), a montré un taux de rejet aigu significativement plus important quand les greffons n'étaient pas perfusés, par contre Moers et al. (198) et Watson et al. (210) n'ont pas trouvé de différence significative en terme de rejet aigu entre les groupes de reins perfusés et non perfusés.

L'index de résistance vasculaire rénal (IRR) est souvent utilisé comme outil d'évaluation de viabilité de greffons. L'IRR est calculé directement par la machine de perfusion par le ratio pression moyenne / flux par minute (RM3®). Selon I. Jochmans et al. (212) l'IRR est un facteur de risque indépendant de RRF et de perte du greffon à 1 an. Néanmoins, cette analyse indique que l'IRR a une faible valeur prédictive, ne pouvant pas être utilisé comme seul paramètre dans l'arbre décisionnel, pour accepter ou rejeter un transplant. Cette étude est d'autant plus intéressante que les centres de greffes ne connaissaient pas les valeurs des paramètres de perfusion concernant l'organe à transplanter. Dans cet essai toutes les catégories de greffons ont été inclues sauf ceux parvenant des DDAC de la catégorie I et II de Maastricht puisque pour ces greffons la perfusion était considérée comme impérative compte tenu du risque de PNF élevé.

Il a été montré que la machine de perfusion peut avoir un effet délétère dans certaines conditions, des dommages vasculaires pourraient être induits par les forces de cisaillement mécaniques liées à la perfusion (213-215) du fait de frictions endothéliales répétées ou continues qui pourraient faire le lit de lésions cellulaires et d'une augmentation du risque de thrombose également en rapport avec une hyper expression du facteur de Von Willebrand (215). Le risque de thrombose serait corrélé à la viscosité du liquide de perfusion et serait d'autant plus important que la pression de perfusion est élevée (215) ; il serait limité pour des pression de perfusion ne dépassant pas 40mmHg ce qui explique le choix des équipes de transplantation de ne pas perfuser au-delà de 50mmHg.

L'index de résistance rénale, paramètre proposé pour être utilisé comme outil d'évaluation de la viabilité du greffon et comme argument pronostique dans la reprise de fonction, varie selon le type de système de perfusion utilisé. Le calcul de ces index est réalisé de manière différente pour les deux machines actuellement commercialisées, rendant toute comparaison difficile.

Des travaux rétrospectifs non randomisés anciens publiés par des équipes ayant utilisé la RM3® suggèrent l'existence de deux paramètres probablement prédictifs de RRF : L'index de résistance vasculaire rénal et le débit de perfusion rénale ramené au poids du greffon. Les auteurs semblent s'accorder sur le fait qu'un index de résistance supérieur à 0.40 mmHg / ml / mn en fin de perfusion est un

facteur de risque de RRF (216-219) de même qu'un débit de perfusion rénale < 0.4 ml / min / g de tissu rénal (pesée du greffon réalisée juste avant le début de la perfusion, rein dégraissé) (216, 220, 221) et ceci pour une pression de perfusion systolique comprise entre 40 et 50 mmHg. Les auteurs ont adopté de manière unanime le seuil de 0.40 mmHg / ml / mn comme critère d'acceptation de greffons issus des DDAC. Récemment une étude publiée par l'équipe lyonnaise de transplantation (222) a montré qu'il est possible de modifier la stratégie d'allocation des reins issus de DDAC Maastricht I et II en privilégiant la réalisation de monogreffe lorsque les IRR sont inférieur à 0.35 mmHg / ml / mn et en réalisant des bigreffes lorsque les IRR sont entre 0.4 et 0.5 mmHg / ml / mn, avec de très bon résultats fonctionnels au long cours.

Durant la perfusion, le liquide qui recircule dans la cassette peut faire l'objet d'analyses biologiques. Certain auteurs ont utilisé des marqueurs dans le cadre de l'évaluation des greffons. L'alpha GST (Alpha-Glutathione-S-Trasnferase) est augmentée dans les lésions tubulaires proximales. Il est très sensible mais malheureusement peu spécifique ce qui rend sa valeur pronostique peu fiable (223). L'équipe de transplantation de Newcastle au Royaume Uni utilise cependant ce marqueur comme un des paramètres d'évaluation de viabilité du greffon (224-226) et l'utilise aussi pour décider si un greffon doit être exclu ou accepté pour être transplanté en mono ou bigreffe. Une analyse plus tardive publiée en 2010 par C. Moers sur l'étude d'Eurotransplant (227) montre que la glutathione-S-transférase, la N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) sont des facteurs prédictifs indépendants de RRF mais non de PNF. Dans la même étude d'autres marqueurs ont été analysé tels que la LDH, l'aspartate aminotrasférase, et l'alanine-aminopeptidase ; ces marqueurs n'ont pas montré de valeur prédictive vis-à-vis de la RRF ou de la PNF et il ne semble pas exister de corrélation non plus avec le temps d'ischémie froide ou avec l'IRR des reins perfusés. D'autres marqueurs biologiques ont fait l'objet d'études tels que le calcium ionisé, le pH, le MDA (malonyldialdehyde), mais il n'existe pas un niveau de preuve suffisant qui permet l'introduction de ces paramètres en clinique dans le cadre de l'évaluation d'un greffon avant transplantation.

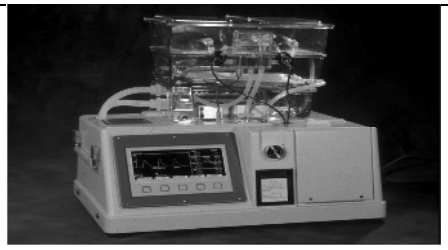
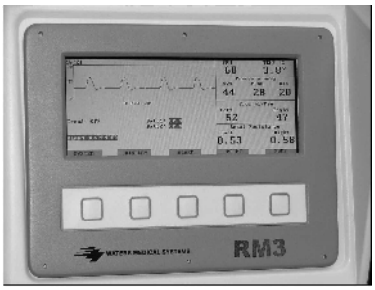
Notons que les marqueurs biologiques sont indépendants du système de perfusion utilisé et que ceci est particulièrement intéressant puisque cela devrait

théoriquement permettre à tous les centres de transplantation d'utiliser ce paramètre indépendamment du type de machine de perfusion choisi pour peu bien sûr qu'un marqueur fiable soit identifié.

Pour résumer, la perfusion sur machine permet de diminuer la vasoconstriction intra-rénale et corticale, et prépare le lit vasculaire à la reperfusion, permet de préserver la viabilité des cellules endothéliales, d'éliminer les microthrombi du cortex rénal , de mieux maintenir le pH intracellulaire, de diminuer l'œdème tissulaire, d'apporter des substrats métaboliques et de l'oxygène, et permet d'éliminer des produits du catabolisme (228). Par ailleurs la machine de perfusion, pourrait permettre une sélection des greffons et une élimination de ceux présentant de mauvaises données hémodynamiques exposant à un risque élevé de PNF.

Ces résultats sont suffisamment probants pour que les tutelles aient accepté de financer l'utilisation des machines de perfusion pour les greffons issus de donneurs marginaux dits à critères étendus (ECD) et que son utilisation soit obligatoire pour les reins issus de DDAC.

Tableau 1 - Caractéristiques techniques des machines de perfusion.

RM3® / WaterS Medical	LifePort / Organ Recovery System
	
Perfusion pulsatile générée par système mécanique permettant de délivrer un volume de liquide de conservation (bolus) par unité de temps.	Perfusion générée par une pompe à rotation continue dont la vitesse de rotation varie de façon cyclique.
Réglage du volume (du bolus) de liquide délivré par unité de temps qui détermine la pression de perfusion	Réglage de la pression comme paramètre de perfusion
Mesure directe du débit de perfusion	Calcul du débit de perfusion
Calcul de l'index de résistance rénale selon la formule : IR = ((syst+2diast) / 3) / débit	Calcul de l'index de résistance rénale selon la formule : IR = ((syst+diast)/2)/ débit
Perfusion à PaO2 ambiante avec possibilité d'oxygénation du rein durant la perfusion	Perfusion rein immergé sans possibilité d'apport d'O2 : baisse de la PaO2
Pas de protection du rein en cas de panne de la machine de perfusion	Protection du rein en cas de panne de la machine : rein immergé dans du liquide de conservation
Refroidissement du liquide de perfusion par un cooler externe ou par un bac à glace pour les transports	Refroidissement du liquide de perfusion uniquement par bac à glace
Ecran de surveillance des paramètres de perfusion et enregistrement des données 	Ecran de surveillance des paramètres de perfusion et enregistrement des données
Machine difficilement transportable	Machine facilement transportable de très faible encombrement
Cassettes de perfusion pour 1 ou 2 reins par machine	Système de perfusion permettant de perfuser un rein par machine

2.4.4 Le post conditionnement ischémique (PoCI)

Le post conditionnement vasculaire ischémique consiste à réaliser lors de la transplantation une revascularisation graduelle par périodes successives de clampage et déclampage du pédicule du greffon. Plusieurs travaux de recherche expérimentaux réalisés en particulier en transplantation cardiaque chez le rat ont pu mettre en évidence des meilleures reprises d'activité cardiaque après une période d'ischémie prolongée lorsque la reperfusion du cœur est effectuée graduellement en assurant deux ou trois périodes de revascularisation brève de 1 à 2 minutes entrecoupées d'ischémies chaudes de 5 minutes environ. Les cœurs présentent moins de lésions tissulaires ce qui s'accompagne d'une meilleure reprise fonctionnelle de l'activité cardiaque (229).

Plusieurs travaux expérimentaux réalisés chez les rongeurs ont démontré que le PoCI pouvait avoir un effet bénéfique sur la reprise de fonction rénale et sur l'apoptose suite à une période d'ischémie (230-232).

Dans les modèles expérimentaux chez le petit animal, les chercheurs ont essayé de mimer les conditions auxquelles sont soumis les greffons avant la transplantation en induisant une ischémie chaude par clampage pédiculaire pendant une période de temps définie. La transplantation rénale chez le petit animal est techniquement très difficile, ce qui fait que la plupart des travaux publiés se sont limités à la réalisation d'une ischémie chaude, sans avoir recours ni aux liquides de conservation ni à une période d'ischémie froide plus ou moins longue ce qui éloigne ces travaux de la réalité clinique de la transplantation rénale (230-240).

En ce qui concerne les modèles utilisés chez le gros animal, les reins doivent être exposés à une ischémie chaude plus longue pour obtenir un niveau d'agression tissulaire similaire à celui obtenu chez le petit animal (241, 242). Le sexe, apparaît être une variable importante car la femelle est plus résistante que le mâle à l'ischémie (243). D'autre part les résultats publiés sont contradictoires et il apparaît bien que l'absence de consensus concernant les protocoles utilisés rend difficile l'utilisation du PoCI en clinique humaine, le plus difficile semblant d'obtenir comme pour le pré conditionnement la bonne séquence de PoCI.

L'effet protecteur du PoCI serait déclenché par la libération d'adénosine, d'opiacés, de bradykinine, d'érythropoïétine, d'oxyde nitrique endogène, d'acétylcholine, et de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumoral ou l'IL-6 et par une diminution de l'expression de protéines telles des facteurs tissulaires comme la thrombine (244). Par ailleurs, quelques études expérimentales ont montré que le post conditionnement pouvait être induit par l'administration directe de molécules ciblant les voies de signalisation concernées (245, 246) (post conditionnement pharmacologique). Certaines molécules, comme des antagonistes de la P-Selectine ou des inhibiteurs de la thrombine, peuvent être administrées durant la période de conservation et induisent un effet protecteur face à l'ischémie.

La formation des ROS qui sont considérés comme les principaux agresseurs tissulaires dans le syndrome d'IR (247-249) joue un rôle critique dans la balance survie cellulaire / apoptose (72, 250, 251). Le stress oxydatif peut être en partie quantifié. La superoxide dismutase (SOD) et le malondialdehyde (MDA) sont des marqueurs du stress oxydatif et des ROS ; il existe en pratique une augmentation de ces marqueurs lorsque des lésions d'IR sont engagées. Deux essais réalisés pour étudier l'IR ont utilisé ces marqueurs ; l'expression du MDA était significativement plus basse dans le groupe avec PoCI que dans le groupe d'ischémie seule (235, 241). Grâce au PoCI la formation de ROS après l'ischémie est atténuée, ce qui est en accord avec une consommation moindre de la SOD. Jiang et al (242) ont utilisé un modèle d'auto transplantation rénale, qui en plus de l'ischémie chaude comporte une ischémie froide de 24 heures ; les résultats obtenus montrent une augmentation de la SOD et une diminution du MDA dans le groupe ayant eu l'ischémie + PoCI comparé au groupe avec ischémie sans PoCI (242). La glutathione peroxidase (GSH) une enzyme qui présente une activité anti oxydante, cette enzyme est également augmentée après PoCI (235). Ces résultats montrent que le PoCI est capable de déclencher la mise en alerte de mécanismes protecteurs qui atténuent la production de ROS grâce à l'action des enzymes catalytiques.

Le dysfonctionnement des mitochondries lors de l'ischémie puis de la reperfusion participe à la constitution des lésions. L'ouverture des pores de transition mitochondriaux (PTM) induit une perméabilité pathologique de la membrane qui mène à l'apoptose (252). Zhang et al. (238) ont mesuré le potentiel de membrane

mitochondrial pour évaluer les PTM et ils ont trouvé un potentiel de membrane supérieur quand un PoCI était réalisé. L'utilisation de ce paramètre pourrait aider à quantifier le niveau des lésions mitochondriales consécutives à l'ischémie. Les canaux de potassium ATP dépendants mitochondriaux (mK-ATP) offrent un effet protecteur favorisant la survie cellulaire (253). Il a été prouvé que les mK-ATP sont impliqués dans la protection conférée par le PoCI (254-256). Zhang et al. (238) ont montré que les mK-ATP ont une implication dans le PoCI rénal, l'effet des mK-ATP pouvant être diminué par l'administration d'un inhibiteur sélectif (5-hydroxydecanoate) (255).

L'IR conduit à l'induction d'une cascade inflammatoire (72, 251) dont la conséquence va être l'apoptose ou la nécrose cellulaire. L'augmentation des protéines pro-apoptotiques telles que la caspase-3, la Bax et la cytochrome C est bien décrite après exposition à une séquence d'IR (231) ; le PoCI diminue la production de ces protéines.

Eldaif et al. ont confirmé que l'adénosine active la protéine kinase C qui agit sur la perméabilité mitochondriale et favorise la survie cellulaire (232). L'effet de l'oxyde nitrique (NO) sur les lésions d'IR a également été étudié ; le NO pourrait avoir un effet double et antagoniste, il atténuerait d'une part l'activité des neutrophiles et augmenterait d'autre part la formation de peroxynitrite, élément oxydant cytotoxique ce qui complique l'interprétation des résultats de l'effet du NO. Le PoCI augmenterait la NOS (oxyde nitrique synthéase) au niveau endothélial et la libération de NO serait associée à une amélioration de la récupération de la fonction rénale. Si un inhibiteur du NO est utilisé, l'effet protecteur du PoCI est annulé. Cela tend à montrer qu'au final le NO a un effet plutôt protecteur (233).

Le Facteur de Nécrose Tumoral alpha (TNF-alpha) semble être un des médiateurs clé de la réaction inflammatoire (257). Durant la phase d'ischémie le développement de zones de nécrose est accompagné de la production de cytokines (258) qui en activant des différentes voies de signalisation telles que le facteur-kB conduisent à la mort cellulaire par apoptose. Miklos et al. (239) ont examiné le niveau sérique de TNF-alpha ainsi que l'infiltration rénale du TNF-alpha 2 heures après la reperfusion. Le TNF-alpha sérique et l'infiltration tissulaire étaient

significativement augmentés après une ischémie seule en comparaison avec les reins ayant eu un PoCI.

La cyclo-oxygénase (COX) -2 augmente après IR (259). L'inhibition de la COX-2 serait associée à une amélioration des conditions de conservation du rein (236, 260).

Le complément et notamment le C3a et le C5a sont impliqués dans la cascade de la réaction inflammatoire du au phénomène d'IR (255, 261). Le PoCI pourrait prévenir l'activation du complément résultant dans une diminution de l'inflammation (237) **(Figure 12)**.

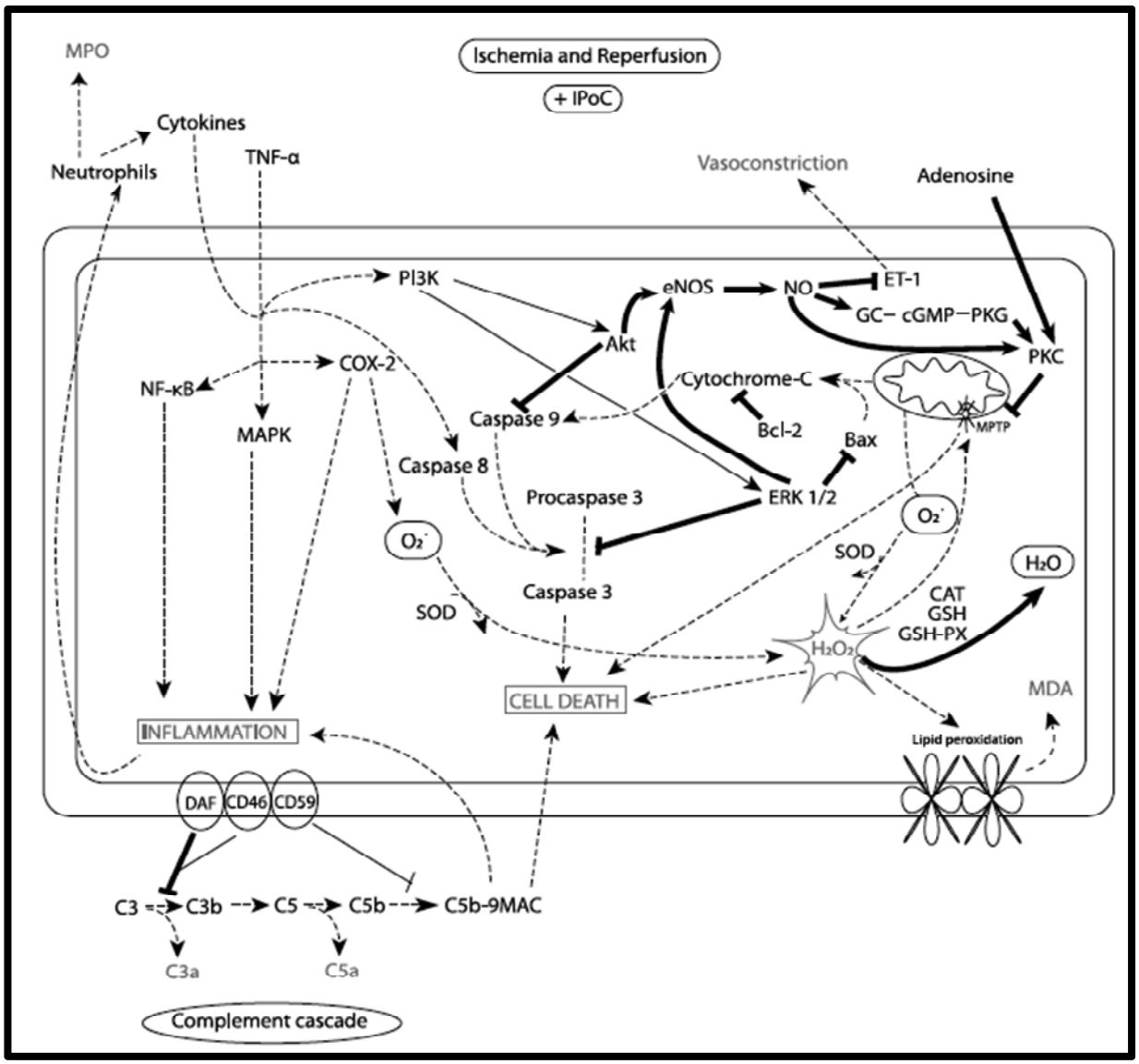


Figure 12 - Mécanismes du PoCI.

Les traits en pointillés indiquent une diminution des paramètres après PoCI. Les traits épais indiquent l'augmentation des paramètres suite au PoCI (262).

L'inflammation due à l'agression tissulaire induit l'infiltration du rein par des polynucléaires neutrophiles qui vont libérer des cytokines, des protéases et de la myélopéroxidase (MPO). L'activité de la MPO est réduite par le PoCI, ce qui suggère une moindre infiltration tissulaire par des neutrophiles (235, 241).

Ces données suggèrent que le PoCI contribue à diminuer la formation de ROS. Pendant la reperfusion au moment de l'afflux massif d'oxygène qui majore la formation des ROS, les antioxydants induits par le PoCI seraient capables de métaboliser les ROS par conversion de superoxide en H_2O.

Les paramètres les plus souvent utilisés pour évaluer l'intérêt de l'utilisation du PoCI et son impact sur la fonction rénale sont la créatininémie et l'urée (262). Dans la majorité des études expérimentales réalisées jusqu'à aujourd'hui le PoCI semble réduire la sévérité des lésions d'IR. Les travaux expérimentaux d'Eldaif et al. (232) qui utilisent un seul algorithme pour induire le PoCI chez le rat montrent que la fonction rénale est comparable entre le groupe ayant subi une ischémie + PoCI et le groupe contrôle. Cela confirme que le PoCI est capable de diminuer considérablement les effets néfastes du syndrome d'IR sur la fonction rénale.

Pour le cœur la durée de l'ischémie conditionne les résultats du PoCI (263) ; un effet délétère du PoCI sur extension de l'infarctus du myocarde a été observé suite à une ischémie principale de 15 à 30 minutes, tandis qu'un effet protecteur a été obtenu quand l'ischémie principale est comprise entre 45 et 60 minutes. Finalement, l'effet protecteur était affaibli quand l'ischémie était comprise entre 90 et 120 minutes. Dans le rein, aucun effet délétère sur la fonction de l'organe n'a été décrit.

Jablonski et al. ont décrit un score pour mesurer les lésions histologiques lors des phénomènes d'IR (250). Au niveau histologique, il existerait moins de lésions quand le PoCI est utilisé. Serviddio et al. (234) utilisent une échelle d'évaluation semi quantitative et montrent une différence significative au niveau histologique entre les reins soumis à une ischémie avec et sans PoCI. Zhang et al. (238) ont montré une différence significative en terme d'apoptose entre les groupes avec et sans PoCI. Enfin, le PoCI induit une diminution de la fibrose tubulointerstitielle 12 semaines après que l'ischémie ait été appliquée due très probablement à une inflammation moins intense à la phase aiguë de l'ischémie (240). En somme, le PoCI serait

capable de diminuer les lésions tissulaires et d'améliorer la reprise fonctionnelle de l'organe. Ce bénéfice serait assuré grâce à la prévention de la formation de ROS, à la stimulation d'enzymes anti oxydantes, à l'augmentation de la résistance des mitochondries face à l'ischémie et finalement à la réduction d'apoptose.

Reste encore à définir et ce n'est pas le moindre des problèmes le meilleur algorithme pour induire un effet protecteur maximal avec le PoCI.

Cette procédure de PoCI est simple à réaliser et pourrait être largement répandue. Cependant elle n'est pas dépourvue de risque puisque le clampage et le déclampage successif d'artères athéromateuses de greffons marginaux pourraient entraîner des lésions mécaniques de plaques et exposer à un risque de thrombose qui devra être évalué.

3. Rationnel du travail expérimental

Pour des raisons méthodologiques liées surtout à la multiplicité des événements pouvant interférer dans la reprise de fonction d'un organe transplanté nous avons considéré que des études préliminaire chez l'animal, dans des conditions expérimentales optimales, standardisées et reproductibles doivent être réalisées en amont de l'utilisation clinique des machines. C'est pour connaître spécifiquement l'intérêt de l'utilisation des machines de perfusion que nous nous sommes engagés dans ce projet puisque très peu de données expérimentales étaient disponibles lorsque nous avons commencé ce travail en 2008 dans le cadre d'un Master 2 ; travail poursuivi dans l'unité de recherche U 1082 sous la forme d'une thèse dont nous rapportons ici les travaux réalisés et les résultats sous la forme de trois articles originaux qui seront discutés.

3.1. Marginalité

La pénurie d'organes, problème majeur en transplantation, est une réalité à l'échelon national (84) et international (82, 83) depuis une vingtaines d'années. De fait elle est considérée comme l'obstacle principal auquel doit faire face la transplantation rénale aujourd'hui et malgré un grand nombre de proposition faites depuis plusieurs années pour enrayer cet écueil, la pénurie persiste, privant les patient insuffisants rénaux chroniques d'un accès légitime à la transplantation rénale. En effet la transplantation rénale est aujourd'hui considérée comme l'option thérapeutique de choix au stade terminal de l'IRC (264) puisqu'elle est la seule à avoir démontré une meilleure survie (265) et une meilleure qualité de vie pour un coût inférieur à celui de la dialyse et cela quelque soit l'âge des patients (266) s'ils sont éligibles pour la greffe.

L'inadéquation entre l'augmentation forte du nombre de patients candidats à la greffe et le nombre faiblement croissant de greffons disponibles, conduit inéluctablement à une augmentation du nombre de patients inscrits sur les listes d'attente et du temps qu'il devront passer sur la liste avant de pouvoir bénéficier d'une greffe, et pose un véritable problème de santé publique.

Par ailleurs, le profil des donneurs d'organes en état de mort cérébrale s'est profondément modifié depuis vingt ans, passant d'une situation où les donneurs étaient des patients jeunes et où la cause principale de mort encéphalique était les accidents de la voie publique ; à une situation où l'âge moyen de la population des patients donneurs atteint actuellement 52 ans, où la cause de mort encéphalique est de plus en plus liée à des accidents vasculaires cérébraux, se développant sur des terrains de diabète, d'hypertension artérielle, et expliquant une détérioration progressive de la qualité des greffons (84).

La pénurie de donneurs conjuguée à une détérioration de leur état général a progressivement amené les équipes de transplantation à revoir leurs critères de prélèvement (85-87). Aidées par l'amélioration de la réanimation, des techniques chirurgicales de prélèvement et de greffe, et des solutés de conservation, par l'arrivée des machines de perfusion et par l'amélioration des traitements

immunosuppresseurs, les équipes de transplantation sont à l'heure actuelle poussées à utiliser des reins qui avant étaient considérés comme non transplantables et qui entrent dans la catégorie des reins dits « marginaux ». Ces donneurs marginaux (à critères élargis) sont définis par les critères UNOS (267); les reins proviennent le plus souvent de donneurs âgés de 60 ans ou plus ou d'un âge compris entre 50 et 60 ans mais aux antécédents de pathologies pouvant porter atteinte à la fonction rénale comme l'hypertension, le diabète, etc., ou des DDAC, ou tout simplement des donneurs présentant un pourcentage important de glomérulosclérose, une ischémie froide prolongée, des sérologies virales positives voire une insuffisance rénale débutante ou modérée. Cette situation pousse nécessairement les équipes de transplantation à élargir l'acceptation des greffons à des organes provenant de donneurs marginaux. Les reins issus d'ECD représentent aujourd'hui plus de 50% des greffons proposés à l'échelon national (84).

Les greffons provenant de DDAC pourraient permettre d'accroître le pool de donneurs d'environ 20 à 30% selon les centres (268). Plusieurs équipes européennes ont tenté durant les années 80 et 90 d'utiliser ce type de greffons avec des résultats initialement marqués par des taux de PNF des greffons qui restaient inacceptables. Ce n'est qu'au prix d'une sélection stricte des donneurs (en particulier du respect d'un temps minimum entre l'arrêt cardiaque et la mise en œuvre des premières manœuvres de réanimation) et de l'utilisation des machines de perfusion dans la conservation des greffons que le taux de PNF est devenu acceptable et la survie de greffons très satisfaisante (269).

La classification de Maastricht (270) a permis de définir 4 stades chez ces donneurs **(Tableau 2).** Les catégories I et II de Maastricht sont dites non contrôlées car l'arrêt cardiaque est non prévisible donc le prélèvement ne peut être anticipé. A l'inverse, les catégories III et IV de Maastricht permettent de mieux organiser le prélèvement et la greffe (271).

Tableau 2 - Classification de Maastricht

Stade	Définition
Stade I	Arrêt cardiaque (AC) en dehors de tout contexte de prise en charge médicalisée et réanimation de qualité < 30 min après AC.
Stade II	AC en présence de secours qualifiés mais dont la réanimation ne permettra pas une récupération hémodynamique.
Stade III	Décision d'arrêt de soins en raison du pronostic.
Stade IV	Mort encéphalique + AC irréversible en cours de prise en charge en réanimation.

Une étude réalisée par W. Hanf et al. à Lyon (272) a cherché à savoir si les greffons provenant des DDAC non contrôlés avaient une fonction rénale, une fibrose interstitielle et une atrophie tubulaire (FIAT) superposables à celle des greffons provenant des donneurs à critères élargis (ECD). La qualité de ces deux catégories de reins a été comparée à celle des reins optimaux des patients greffés rein pancréas, dont les organes proviennent des donneurs optimaux. Dans cette étude les DDAC non contrôlés avait 81.5% de RRF vs 27.6% pour les ECD. En ce qui concerne la fibrose évaluée à 3 et 12 mois, il n'existait pas de différence entre les deux catégories de reins marginaux. La fonction rénale mesurée par clairance de l'inuline à 3 ans ne montrait pas de différence entre les ECD et DDAC non contrôlés. Par contre il est important d'insister sur le fait que les critères de sélection des DDAC doivent être très stricts afin d'éviter la non fonction primaire de greffons.

Le recours aux greffons marginaux impose de réduire au maximum les lésions induites durant l'IR. Ceux-ci doivent bénéficier d'une prise en charge optimisée durant la période de conservation de façon à limiter le risque de PNF et de RRF et de permettre une amélioration de la survie des greffons au long cours (223, 273-276). Lorsqu'on considère la survie des greffons marginaux dans les séries nord-

américaines le risque relatif de perte de greffon est 1.7 fois supérieur à celui des donneurs non marginaux (267, 277, 278) et on assiste à une évolution plus rapide des dysfonctions chroniques de greffons liées essentiellement au développement d'une FIAT (272).

C'est face à cette situation, que la question de la perfusion d'organe et de l'utilisation des machines de perfusion dans le cadre de la préservation, avec ou sans ajout de molécules ou d'intrants, s'est posée et a justifié la réalisation de ce travail.

3.2. Effet Machine

Les mécanismes d'action de la machine de perfusion sont à priori multiples et seraient liés :

1- A une évacuation des déchets potentiellement toxiques grâce au lavage continu du greffon.
2- A l'apport d'oxygène et à la préservation des réserves d'ATP
3- A la réduction de l'expression de molécules de surface.
4- Au maintien de la viabilité et de la fonction de l'endothélium du greffon.
5- A la réduction de la fibrose rénale à long terme.
6- A la capacité d'évaluer la viabilité des organes ; et de les sélectionner.

1. *Evacuation des déchets potentiellement toxiques par lavage continu du greffon.*

L'élimination des déchets potentiellement toxiques par lavage continu du greffon est une hypothèse intuitive, elle reste très peu étudiée dans la littérature. En anaérobie comme nous l'avons précisé dans les généralités le greffon génère un grand nombre de métabolites toxiques. La PRH permettrait dans une certaine mesure d'éliminer les déchets du métabolisme et de limiter l'effet toxique qu'ils peuvent avoir sur le greffon.

2. *Apport d'oxygène et préservation des réserves d'ATP.*

Le principe de la conservation hypothermique est de réduire la température aux alentours de 4°C pour ralentir le métabolisme et donc réduire la consommation d'oxygène. Néanmoins, à cette température 10% du métabolisme est encore actif, ce qui impose de fournir une quantité minimale d'oxygène pour éviter l'épuisement des réserves d'ATP (279, 280) dont la consommation n'est que fortement ralentie (281-283). L'épuisement des réserves en ATP lorsqu'il survient, conduit à une inactivation de la pompe Na^+ / K^+ ATP dépendante puis à l'augmentation des concentrations de calcium, de sodium et d'eau dans la cellule,

amenant aux lésions cellulaires précédemment décrites. L'apport d'oxygène permet aussi de limiter les lésions des mitochondries qui jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie cellulaire alors que l'on pouvait craindre que l'apport d'oxygène sur une chaîne respiratoire mitochondriale découplée ne soit délétère et induise la production de ROS (283). Cependant l'apport d'oxygène doit être mesuré car il existe lorsque les concentrations sont élevées un risque d'induire d'avantage de lésions tissulaires (279).

En situation de conservation statique la pression partielle d'oxygène est faible, ceci est d'autant plus vrai que le greffon se trouve dans un système clos et étanche. En situation de PRH utilisant la machine de perfusion de Waters RM3® l'oxygénation est permanente avec une pression partielle aux alentours de 21% (équilibration avec l'air ambiant), et la possibilité d'augmenter la pression partielle par adjonction d'oxygène dans le système de perfusion. A contrario, lorsqu'on utilise la machine de perfusion d'Organ Recovery System LifePort® le greffon se trouve dans une cassette étanche (système clos) isolé de l'air ambiant et sans possibilité d'apport d'oxygène ce qui explique qu'après 4 heures de perfusion la pression partielle en oxygène soit nulle (expérience réalisée dans notre unité de recherche).

Une étude comparative dans un modèle d'autotransplantation rénale avec 60 minutes d'ischémie chaude réalisée dans notre unité de recherche et récemment publiée (284) montre qu'il y a un bénéfice à oxygéner le rein pendant la conservation avec une meilleure reprise de fonction rénale, et une diminution des lésions tissulaires et tubulaires et de la fibrose à 3 mois. Ces résultats sont contradictoires avec ceux publiés précédemment par Gallinat et al. (285) qui ne trouvent pas de bénéfice à l'ajout de l'oxygénation pendant la perfusion. Dans le modèle d'autotransplantation rénale chez le porc utilisé par Gallinat et al. le rein n'avait pas été soumis à une ischémie chaude préalable au prélèvement, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence entre les groupes oxygéné et non oxygéné, puisque les lésions induites par la simple ischémie froide sont de moindre intensité que quand on l'associe à une ischémie chaude préalable ; et qu'elles sont de fait plus facilement réversibles.

Le bénéfice de l'oxygénation durant la PRH étant établi, restera à évaluer l'intérêt que pourrait avoir l'utilisation de certaines molécules telles que l'hémoglobine de ver marin, qui joue un rôle de transporteur d'oxygène mais également d'anti oxydant pendant la PRH. Cette hémoglobine a déjà été testée en conservation statique avec des résultat encourageants dans notre unité de recherche (286).

3. *Réduction de l'expression de molécules de surface.*

Le rapport entre immunité innée et adaptative est actuellement bien établi de même que le rapport entre IR et stimulation d'immunité innée (75, 77, 78). Il est aujourd'hui démontré qu'une stimulation de l'immunité innée non spécifique peut également stimuler l'allo-reconnaissance et le rejet dans une situation de transplantation d'organe. L'expression de certaines molécules qui participent au processus d'adhésion telles que l'ICAM-1 ou d'autres molécules impliquées dans l'allo-reconnaissance comme le complexe majeur d'histocompatibilité de classes I ou II apparaît significativement diminuée après perfusion par machine (209). La qualité de la préservation d'organe peut donc avoir des conséquences directes sur le degré d'allo-réactivité (163, 287, 288).

4. *Maintien de la viabilité et de la fonction de l'endothélium du greffon.*

Il s'agit très probablement d'une pierre angulaire de la conservation d'organes. Le maintien de la viabilité endothéliale a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche qui démontrent que les forces de cisaillement (shear stress) jouent un rôle important sur la survie et la fonction des cellules endothéliales in vitro. Ainsi lors d'une conservation statique (absence de flux, dont des forces de cisaillement), les cellules endothéliales changent de morphologie et s'engagent dans un mécanisme les conduisant à l'apoptose. A contrario, si l'endothélium est soumis à un flux continu, les cellules maintiennent leur morphologie et restent viables sans s'engager dans un mécanisme de destruction cellulaire (289) **(Figure 13).** Ceci a bien été montré en microscopie électronique sur des cellules endothéliales de reins humains (290, 291). Sur le plan mécanistique il semblerait que les intégrines présentes à la surface de l'endothélium, agissent comme des

mécanorécepteurs **(Figure 14)** capables de convertir un stimulus mécanique (forces de cisaillement) en un signal biochimique dirigeant les cellules soit vers l'apoptose soit vers un maintien de leur survie **(Figure 15)** (292). Cependant, l'induction de flux turbulents ou la perfusion avec des pressions trop élevées sont délétères pours les cellules endothéliales (215).

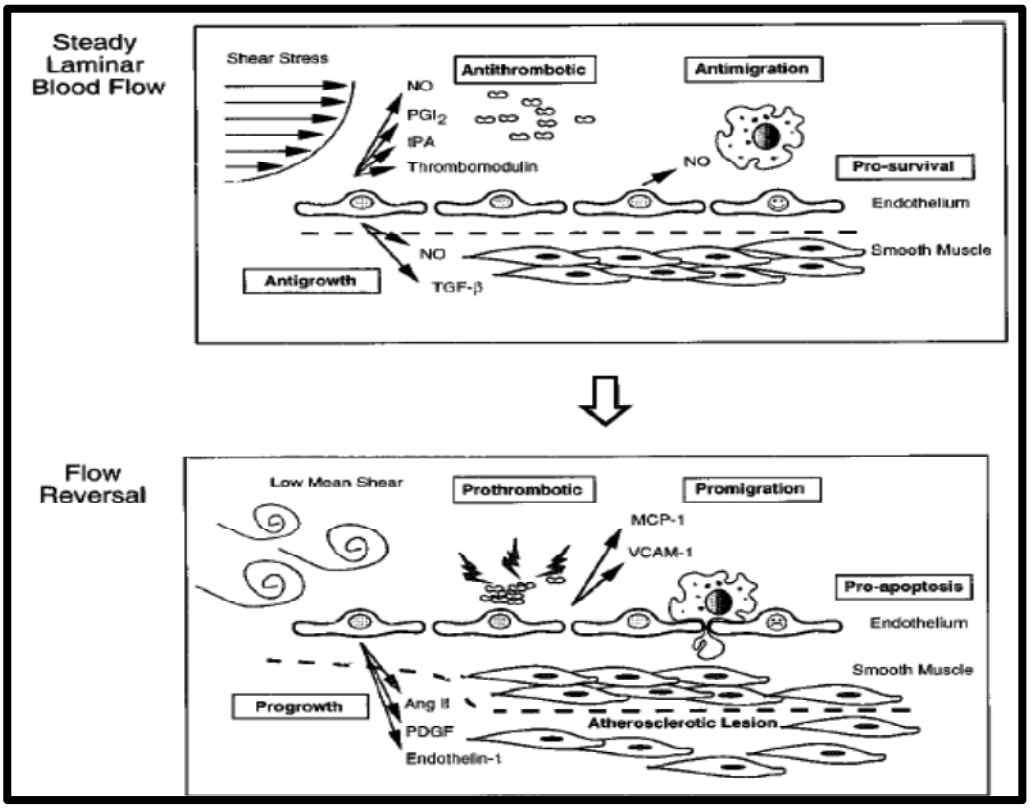


Figure 13 - Effets du flux sur la cellule endothéliale selon O. Traub

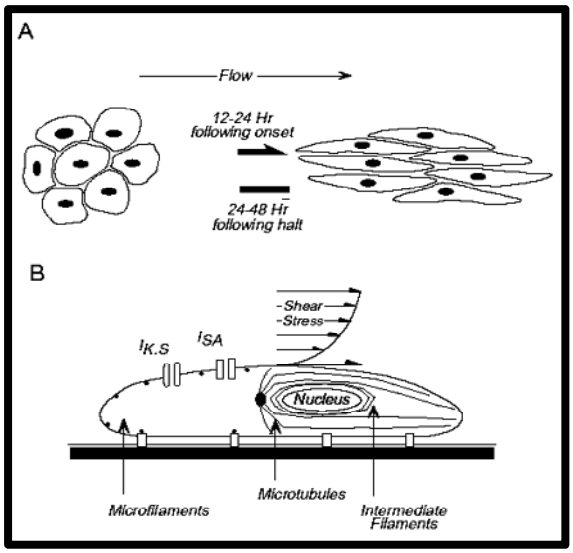


Figure 14 - Effets du flux sur la cellule endothéliale selon R. Kamm

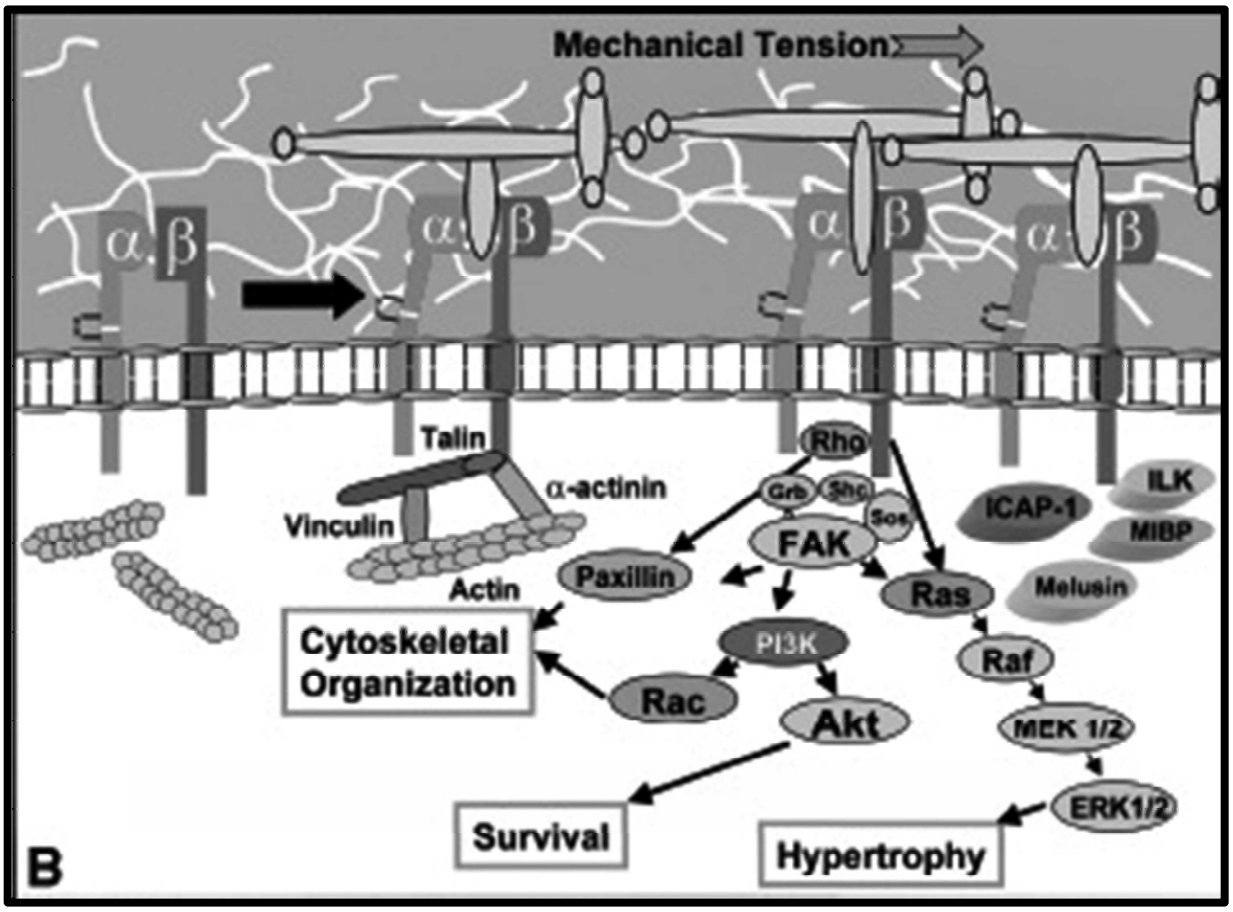


Figure 15 - Rôles des intégrines selon R. Ross

5. *Réduction de la fibrose rénale à long terme.*

Nous avons pu montrer dans notre laboratoire de recherche utilisant un modèle d'autotransplantation rénale chez le porc avec ischémie contrôlée (modèle mimant les conditions auxquelles sont soumis les greffons rénaux issus de DDAC), que la conservation par PRH était capable de diminuer très significativement la fibrose rénale sur les biopsies réalisées à 3 mois (287). Ceci explique probablement le gain apporté par la machine de perfusion en terme de survie dans l'étude réalisée par le groupe d'Eurotransplant (198, 199).

6. *Capacité à évaluer la viabilité des organes (sélection des greffons).*

La PRH permet de disposer potentiellement de paramètres d'évaluation supplémentaires de la qualité du greffon. Plusieurs études ont

montré l'intérêt d'intégrer l'IRR et le flux pour évaluer la viabilité du greffon, et décider s'il peut être transplanté ou non (216, 217, 219-221). Cependant, l'inconvénient majeur de l'IRR est sa faible valeur prédictive (212), qui fait qu'il ne peut à priori pas être pris comme seul paramètre pour décider de l'acceptation ou du refus d'un greffon. La fiabilité de ce paramètre est probablement corrélée à la qualité du réseau vasculaire du transplant le rendant particulièrement discutable quand il s'agit de reins provenant d'ECD présentant une vasculopathie du greffon. A contrario, l'absence de lésion vasculaire que l'on retrouve pour les DDAC Maastricht I et II pourrait permettre de fiabiliser ce paramètre d'évaluation (222). D'autre part les marqueurs biologiques pourraient également intervenir dans la décision d'accepter ou de ne pas accepter un greffon (223-227).

Le sentiment est cependant que des paramètres isolés ne permettront probablement pas d'aboutir à une sélection des greffons et qu'il faudra recourir à l'avenir à des arbres décisionnels multifactoriels tenant probablement compte de l'histoire clinique du donneur, de l'histologie, des paramètres de perfusion et de caractéristiques du receveur.

3.3. Modèle d'autotransplantation rénale chez le porc comme modèle étude des lésions des phénomènes d'IR

La survie de greffons rénaux n'est pas seulement en rapport avec des facteurs de rejet allo-immun, mais aussi avec des facteurs moins spécifiques qui relèvent par exemple du mécanisme d'IR initial susceptible de stimuler l'immunité innée et adaptative. Cette partie de la recherche longtemps négligée par les équipes de transplantation constitue aujourd'hui un axe de recherche particulièrement important ; en effet les mécanismes mis en jeu durant l'ischémie et la reperfusion conditionnent au moins en partie la survie de greffons et leur capacité fonctionnelle. Comme nous l'avons déjà mentionné, c'est pour les greffons issus des donneurs marginaux que le risque de voir se développer une PNF ou une dysfonction chronique du greffon rapide est le plus important, rendant pour ce type de greffon les conditions de conservation particulièrement déterminantes.

De ce fait les équipes de transplantation ont recherché à mimer au laboratoire dans des modèles expérimentaux les conditions de marginalité auxquelles les greffons peuvent être exposés, afin de mieux approcher le type de lésion auxquelles sont exposés ces organes et de mieux explorer les voies qui permettent d'améliorer les conditions de conservation.

Le porc est actuellement reconnu comme l'animal dont la physiologie et l'anatomie se rapprochent le plus de celles retrouvées chez l'homme (en dehors du singe). Cette similitude fait que cet animal a été choisi par la majorité des équipes travaillant dans le domaine de l'IR en transplantation rénale, comme modèle animal de référence (293-296).

Ce modèle expérimental d'autotransplantation rénale chez le porc large White a été développé au sein de l'unité Inserm U 1082 /I.N.R.A. à Surgères.

Ce modèle d'autotransplantation chez le porc avec néphrectomie controlatérale constitue aujourd'hui le gold standard pour l'étude des lésions d'IR. Ce modèle permet en particulier d'évaluer précisément les effets de l'IR sur le rein.

Le modèle permet d'évaluer les fonctions tubulaire et glomérulaire des greffons, la reprise de fonction rénale, la survie des greffons et des receveurs, les marqueurs de l'inflammation (immunité innée) et de la transition épithélio mésenchymateuse, et l'importance de la fibrose au long cours.

Le fait qu'il s'agisse d'un modèle d'autotransplantation permet de mieux étudier l'impact réel et spécifique des lésions d'IR sur le rein, en s'affranchissant de la réaction allo-immune nécessairement présente, et confondante dans la situation d'une greffe allo-génique qui impose l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur néphrotoxique et s'accompagne des lésions tissulaires d'allogreffe.

Dans ce modèle le rein gauche a été disséqué puis clampé pendant 60 minutes in situ (ischémie chaude), puis conservé au froid pendant 22 heures.

Même si elle ne reproduit pas parfaitement toutes les conditions retrouvées chez un DDAC l'adaptation du protocole expérimental associant une ischémie chaude de 60 minutes et une ischémie froide de 22 heures, permet de se rapprocher des conditions auxquelles sont exposées les greffons rénaux issus des DDAC non contrôlés.

4. Objectifs du travail

Comme nous avons vu précédemment, les modalités de conservation vont pouvoir influencer la reprise de fonction et la survie de greffons. Nous avons cherché à évaluer dans notre modèle expérimental l'intérêt que pouvait avoir l'utilisation de la machine de perfusion durant la période d'ischémie froide.

Ce travail de thèse a donc eu pour but d'évaluer :

1- Les effets de la perfusion rénale pulsatile vs la conservation statique sur la reprise de fonction du greffon et sa survie.
2- La capacité de la machine de perfusion à limiter les lésions d'IR et, de préserver l'intégrité tissulaire des greffons.
3- Si le type de solution de conservation utilisée sur la machine a un impact sur le résultat fonctionnel.
4- Les effets de la perfusion rénale à court terme et à long terme.
5- Les cibles moléculaires impliquées dans les mécanismes de protection.

5. Méthodes

5.1. Protocole de recherche

Nous avons étudié la survie, la fonction, l'histologie et les différents marqueurs à un mois et puis à 3 mois des reins autotransplantés chez le porc.

Les porcs sont soumis à une alimentation standard (Société Arrive, Saint Fulgent, France) et ont un accès libre à l'eau. Les animaux sont placés dans des box individuels et soumis à une température ambiante constante (22 ± 2°C). Une restriction alimentaire est débutée 24 avant l'intervention.

Toutes les manipulations réalisées chez l'animal sont en conformité avec les recommandations des Ministères de l'Agriculture, de la Santé et de la recherche dans le pur respect des règles éthiques et avec l'accord des comités d'éthique national et régional.

Les expériences ont été réalisées sur des porcs Large White mâles, âgés de 4 mois d'un poids de 40 ± 4 kg.

5.2. Protocole d'anesthésie

L'animal est anesthésié au masque de Hunter par un mélange gazeux de sévoflurane 8% (Sévorane®) associé à du protoxyde d'azote et de l'oxygène en proportions égales. Le sévoflurane est ensuite remplacé par de l'isoflurane 2% (Forène®). Une voie veineuse est posée par l'intermédiaire d'un cathéter de 20G en plastique (Becton Dickinson Vascular Access Inc. Sandy, UT, USA) dans une veine marginale de l'oreille gauche.

Une sonde d'intubation oro-trachéale (n°6.5) est mise en place sous contrôle visuel à l'aide d'un laryngoscope. La curarisation de l'animal est effectuée par injection de bromure de pancuronium 0.15 mg/kg en bolus, puis à la demande. On pratique une ventilation contrôlée avec une fréquence respiratoire de 16/min et on maintient un taux de CO2 expiré entre 35 et 45 mmHg (respirateur LKB médical ENGSTRON SYSTEM). Une sonde gastrique est mise en place et sera enlevée en fin d'intervention.

Un cathéter de péridurale Portex® 16G est introduit par ponction percutanée en position sacro-coccygienne. L'analgésie per-opératoire est effectuée par ce cathéter péridural par lequel sont injectés 0.25 ml/kg de xylocaïne adrénalinée à 1%, des réinjections de 0.125 ml/kg sont réalisées toutes les heures. Le cathéter péridural est retiré le lendemain de la transplantation.

La surveillance peropératoire est assurée par le contrôle de la fréquence cardiaque et de la saturation en oxygène. Les pertes hydrosodées sont compensées par 10 ml/kg/h de gélofusine 4%.

5.3. Protocole chirurgical : Prélèvement du rein gauche

L'animal est en décubitus dorsal **(Figure 16)**. Après désinfection cutanée à la polyvidone iodée et la mise en place des champs stériles, on débute par une cervicotomie gauche afin de mettre en place un cathéter jugulaire externe gauche, extériorisé après un trajet sous-cutané derrière l'oreille gauche. Ce cathéter est laissé en place 15 jours pour l'administration des solutés de réanimation et des traitements ainsi que la réalisation des prélèvements sanguins.

Figure 16 - Installation de l'animal

La voie d'abord est une incision transrectale gauche chez le mâle. Le rein gauche est abordé par une voie extra-péritonéale. Le pédicule est disséqué sur toute sa longueur jusqu'à l'aorte pour l'artère et la veine cave inférieure pour la veine **(Figure 17)**. L'uretère est disséqué de façon atraumatique sur 15 cm et sectionné après ligature.

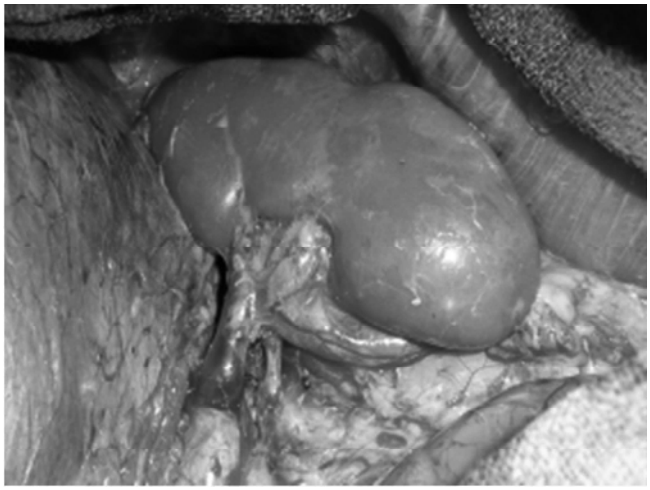


Figure 17 - Rein gauche complétement disséqué avant clampage pédiculaire in situ

5000 UI d'héparine sodique sont injectés en bolus 10 minutes avant le clampage pédiculaire. Le rein gauche est soumis à 60 minutes d'ischémie chaude par ligature directe du pédicule (double ligature au Dexon® 0) **(Figure 18)**, puis prélevé au plus près de l'aorte et de la veine cave afin de laisser une longueur maximale sur le greffon.

Figure 18 - Aspect du rein suite à 60 minutes d'ischémie chaude in situ

Le rein est immédiatement plongé dans du sérum physiologique à 4°C, un cathéter est introduit dans l'artère rénale permettant ainsi de flusher l'organe **(Figure 19)** avec la solution de conservation de choix (IGL-1 ou BELZER MPS) à 4°C.

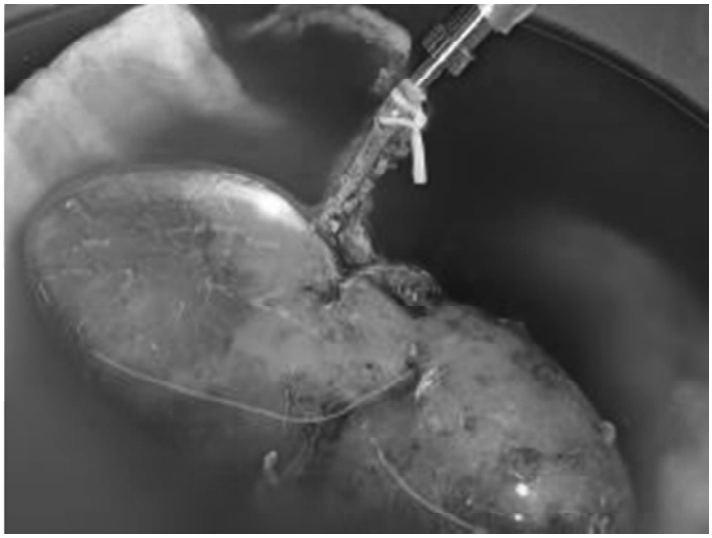


Figure 19 - Greffon rénal au cours du lavage par une des solutions de préservation

Après lavage, le rein est pesé **(Figure 20)** puis soumis à 22 heures de conservation hypothermique statique ou dynamique sur machine de perfusion RM3® (Waters Medical System) à 4°C **(Figure 21)**.

Figure 20 - Pesée du rein avant perfusion.

Figure 21 - Rein installé sur la machine de perfusion

Après vérification de l'hémostase, la fermeture est réalisée en deux plans par des surjets de fil résorbable Asufil® 1.

Les animaux prélevés sont alors isolés en cage biologique, à jeun et réhydratés pendant les 22 heures avant l'autotransplantation.

5.3.1 Surveillance et paramétrage de la machine lors de la conservation

Le principe de fonctionnement de la RM3® Waters Medical Systems est de se rapprocher des conditions physiologiques de perfusion en délivrant à un rythme choisi (nombre de pulsation par minutes) un volume de perfusat (volume stroke) dont l'importance va conditionner la pression de perfusion systolique dans l'artère rénale. Au plus le volume est important face à une résistance du lit artériel donnée au plus la pression de perfusion sera importante. Le volume de perfusion devra varier avec l'ouverture du lit vasculaire et doit permettre dans les conditions habituelles d'atteindre et de maintenir au cours du temps une pression de perfusion de 40mmHg environ **(Figure 22)**. La machine calcule en temps réel la résistance artérielle de l'artère rénale en considérant la pression moyenne et le flux (mesuré

indépendamment par un capteur doppler). La machine de perfusion enregistre la pression de perfusion, le débit et les index de résistances. Ces paramètres seront récupérés à la fin de la procédure à l'aide d'un ordinateur.

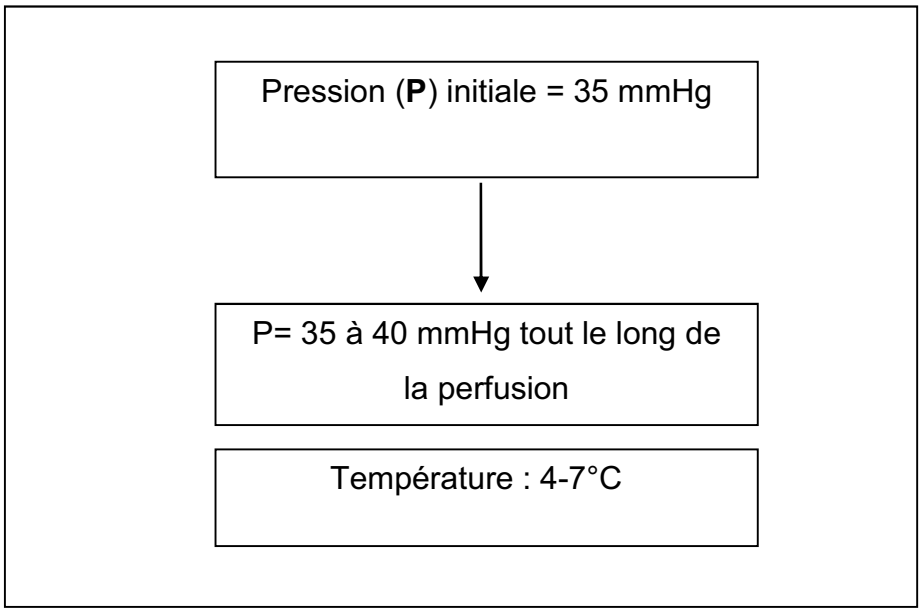


Figure 22 - Protocole de surveillance et de paramétrage de la machine RM3® lors de la perfusion.

5.4. Protocole chirurgical : Autotransplantation rénale

L'animal est de nouveau anesthésié, intubé et ventilé selon le même protocole d'anesthésie.

L'intervention débute par une cervicotomie droite afin d'aborder l'artère carotide interne droite qui sera liée. En amont de la ligature, on pratique une artériotomie transversale afin de pratiquer une mesure sanglante de la pression artérielle tout au long de la greffe.

L'incision transrectale est reprise. Le péritoine est incisé et ouvert. L'aorte et la veine cave sont abordées par voie transpéritonéale, on procède à la néphrectomie droite après double ligature au Dexon® 0 de l'uretère, de l'artère et de la veine rénale droite. Le péritoine parietal postérieur est fermé par un surjet de Vicryl® 4.0

La transplantation est hétérotopique. La dissection de l'aorte et de la veine cave inférieure est réalisée sous le pédicule rénal gauche, sur une longueur de 5 cm. 5000 UI d'héparine sodique sont injectés en bolus 10 minutes avant le clampage aortique.

Le rein, après une nouvelle pesée et préparation des vaisseaux, est mis en place, dans la fosse lombaire gauche en position rétro péritonéale après incision du péritoine parietal postérieur. L'aorte est clampée latéralement par un clamp de Satinsky. Une aortotomie longitudinale est pratiquée en emportant une pastille de l'aorte et une anastomose latéro-terminale est confectionnée avec du fil de polypropylène 5/0 double aiguillé **(Figure 23)**. A la fin de l'anastomose artérielle, un clamp de Bulldog est posé sur l'artère rénale et le clampage aortique est levé. La veine cave est alors clampée latéralement et une large veinotomie longitudinale est pratiquée. Une anastomose termino-latérale au fil de polypropylène 5/0 double aiguillé est réalisée. A la fin des anastomoses, les clamps sont levés simultanément **(Figure 24)**.

Figure 23 - Anastomose artérielle termino latérale (artère rénale – aorte).

La durée des anastomoses vasculaires doit être de 30 +/- 5 minutes.

On finit par le rétablissement de la continuité urinaire. Une anastomose urétéro-vésicale directe, sans trajet anti-reflux, est effectuée avec un fil résorbable de Maxon® 4/0. Cette anastomose est protégée par une endoprothèse de type double J de longue durée (Karl Storz ; Gmbh & co, Tuttlingen, Allemagne) que l'on laissera en place jusqu'au sacrifice de l'animal à 3 mois.

Figure 24 - Aspect du greffon rénal suite au déclampage vasculaire

Le rein est rétropéritonisé par fermeture au Vicryl® 4.0 du péritoine parietal postérieur. L'intestin grêle est déroulé en totalité afin de s'assurer l'absence d'invagination grêlo-grêlique fréquente chez le porc. On s'assure également de l'absence de torsion de l'axe mésentérique et de l'absence de volvulus du côlon. La paroi est fermée en deux plans à l'aide du Vicryl® 2. Le cathéter carotidien est retiré après ligature de l'artère carotide, la cervicotomie est alors suturée.

5.5. Suivi post opératoire immédiat

Les porcs autotransplantés restent en surveillance dans les box de suivi post-opératoire pendant 7 jours **(Figure 25)**. Toutes les thérapeutiques sont commencées en post-opératoire immédiat.

Rééquilibration hydroélectrolytique : Durant cette période, les porcs reçoivent 500 mL de chlorure de sodium 0.9 % en perfusion intraveineuse avec la pompe Abott®. Quand les porcs commencent à uriner, on compense volume par volume la

diurèse en plus des 500 mL de perfusion de base. Pour une diurèse > 4000 mL, on apporte 500 à 1000 mL de Ringer lactate en complément du chlorure de sodium pour totaliser la compensation des pertes.

Figure 25 - Suivi post opératoire, cage métabolique

Antibioprophylaxie : Les porcs reçoivent tous les jours 1 injection intraveineuse d'Amoxicilline et d'Acide Clavulanique 1 g/j à partir du jour du prélèvement et les 7 jours suivants. Puis 1 injection intramusculaire d'Amoxicilline reconstituée grâce à 10 mL de chlorure de sodium 0.9% à chaque biopsie rénale.

Prophylaxie anti-ulcéreuse : Par 1 ampoules intraveineuse de Lanzoprazole 40 mg reconstitué avec 0.2 mL de chlorure de sodium 0.9% pendant les 5 premiers jours après l'intervention.

Analgésie : En ce qui concerne l'analgésie, pendant les 3 premiers jours, on injecte 1 ampoule intraveineuse de Nalbuphine 20 mg et au 3ème jour 1 ampoule intraveineuse d'Acupan (Laboratoires Biocodex ; Montrouge, France).

Diurétiques : Les porcs reçoivent du Furosémide 125 mg en IVSE (soit 0.6 mL/h) le jour de la greffe et le protocole est ensuite dépendant de la diurèse :

- Si diurèse nulle :

  J1 : 250 mg (soit 1.1 mL/h).

  J2 : 300 mg (soit 1.3 mL/h).

J3 : 350 mg (soit 1.5 mL/h), à maintenir les jours suivants si il n'y a pas de diurèse.

- Si la diurèse est < 1500 mL/jour, on maintient la dose de Furosémide en l'état.
- Si la diurèse est > 1500 mL/jour, on divise la dose de Furosémide par 2 et on l'arrête le jour suivant.

Au terme des 7 jours de surveillance, les animaux sont renvoyés à l'animalerie où ils sont gardés en box individuels avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Si au terme des 7 jours les porcs n'ont pas repris de diurèse, ils sont sacrifiés et autopsiés (greffon envoyé en anatomopathologie).

Le suivi des animaux est théoriquement de 3 mois, au terme desquels les porcs sont sacrifiés et le greffon envoyé en anatomopathologie.

5.6. Prélèvements réalisés pour les différentes analyses

Les prélèvements sont effectués pour évaluer :

- La fonction rénale
- La diurèse
- La protéinurie et fraction d'excrétion du sodium.
- L'histologie.

Prélèvements sanguins : ils sont réalisés à J0, J1, J3, J5, J7, J11 puis à J14 sur le cathéter jugulaire, à M1 et à M3 au moment du sacrifice par ponction artérielle fémorale.

Prélèvements urinaires : ils sont réalisés sur les urines de 24 heures à J0, J1, J3, J5, J7, J11, J14, M1 et avant le sacrifice à M3.

Les échantillons biologiques sont évalués par Modular bioanalyser (Roche, Diagnostics, France).

Biopsies transcutanées **(Figure 26)**: elles sont réalisées sous contrôle échographique à J7, J14 et M1 sous anesthésie générale au masque (induction par sévofluorane 8% puis relais par forène 3%).

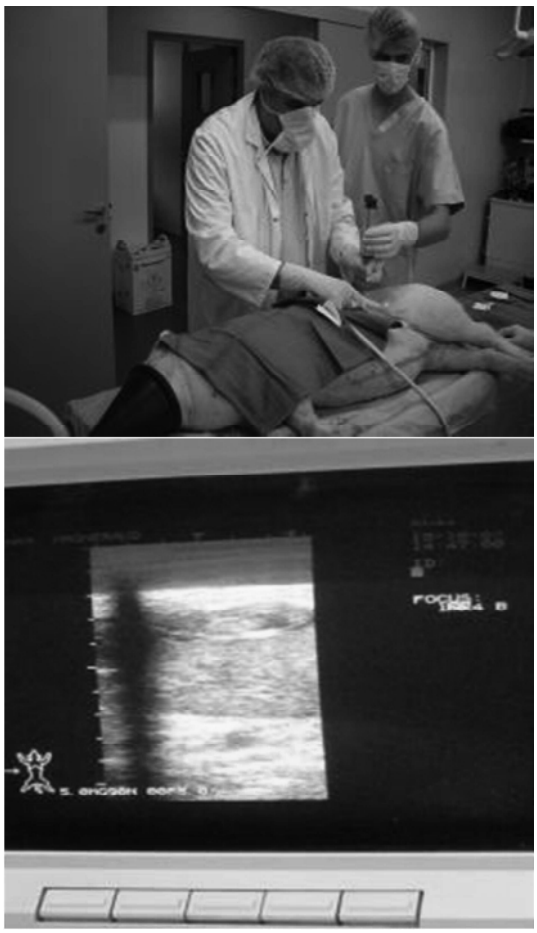


Figure 26 - Réalisation d'une biopsie percutanée du greffon.

5.7. Sacrifice

Après une prémédication par une injection intramusculaire de kétamine 2.5 mg/kg, les porcs sont endormis au masque et mis en décubitus latéral droit. Une lombotomie sous-costale est réalisée. Le rein transplanté est libéré de l'espace rétropéritonéal. Le pédicule est clampé en masse et une injection intraveineuse létale de KCl est pratiquée. Après néphrectomie, des prélèvements sur la médullaire et le cortex du greffon sont réalisés et conservés dans du formol ou de l'azote liquide pour une analyse différée.

5.8. Analyse Histologique

Les fragments destinés à l'étude histologique standard ont été fixés dans une solution de formol tamponné à 4%. Après passage dans des bains d'alcool de concentration successivement croissante, ils ont été inclus en paraffine. Les lames sont ensuite colorées à l'Hémalun-éosine-safran et au Periodic Acid Schiff. Ces colorations permettent d'évaluer le degré de nécrose épithéliale et l'état des microvillosités apicales. L'intensité des lésions est évaluée de façon semi-quantitative sur une échelle de 0 à 5 selon une méthode déjà validée au laboratoire (297) :

- 0 : Absence de lésions ;
- 1 : Lésion concernant moins de 10 % de la section examinée ;
- 2 : Lésions concernant 10 à 25 % de la section examinée ;
- 3 : Lésions concernant 26 à 50 % de la section examinée ;
- 4 : Lésions concernant 51 à 75 % de la section examinée ;
- 5 : Lésions concernant plus de 75 % de la section examinée.

Les fragments de tissu rénal des animaux sacrifiés à 3 mois ont été analysés pour déterminer la progression de la fibrose interstitielle à long terme grâce à l'analyse semi-quantitative de lames colorées au Picrosirius, marqueur spécifique des collagènes fibrillaires interstitiels de type I et III (298). L'importance de la fibrose a été scorée à l'aide de l'échelle suivante :

- 0 : Absence de fibrose.
- 1 : Fibrose minime corticale systématisée intéressant moins de 25% de la surface examinée, avec des tubes non altérés et un infiltrat cellulaire mononuclé uniquement localisé dans les zones de fibrose.
- 2 : Fibrose interstitielle corticale systématisée et mutilante intéressant entre 25 et 50% de la surface examinée, avec une atrophie tubulaire focale et un infiltrat inflammatoire plus dense.
- 3 : Fibrose corticale sévère mutilante visible sur plus de 50% de la surface examinée. Les glomérules sont le siège ici d'une sclérose évoluée avec de

fréquents « pains à cacheter » et l'infiltrat cellulaire interstitiel apparaît plus diffus et plus agressif.

Nous avons aussi réalisé une immunohistofluorescence quantitative sur les fragments obtenus à 3 mois marqués par des anticorps anti-vimentine (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) et avec un anticorps secondaire Cy3 (Invitrogen). Cette procédure nous a permis de déterminer l'intensité de la transition épithélio mésenchymateuse.

5.9. Etude de l'expression transcriptomique par RTq-PCR Quantitative

Les biopsies obtenues au moment du sacrifice de l'animal ont été immédiatement congelées dans de l'azote liquide. L'extraction d'ARN a été réalisée avec le trizol selon les recommandations du fabricant (Fischer Scientific, France). L'ADN génomique est éliminé en utilisant le DNA-free kit (Applied Biosystems, USA). L'ADN complémentaire (cDNA) est obtenu par une première transcription reverse en utilisant des amorces aléatoires. La réaction de PCR en temps réel est réalisée dans des plaques optiques (96 puits) avec 10 ng de cDNA sur l'appareil ABI Prism 7300, selon les recommandations du fabricant (Applied Biosystems). Les amorces porcines sont conçues par OligoPerfect™ (Invitrogen, USA). Pour chaque gène étudié, il est déterminé le nombre de cycle Ct nécessaire pour atteindre le seuil de détection. Le ΔCt du gène étudié est obtenu par la soustraction de la valeur Ct de l'ARNr 18S (bruit de fond) de celle du gène. Au final, la quantité relative d'ARNm est obtenue par l'équation suivante (299):

$$QR_{\text{Quantité relative}} = 2^{-(\Delta Ct \text{ gène étudié groupe expérimental} - \Delta Ct \text{ gène étudié groupe témoin})}$$

6. Publications

6.1. ARTICLE 1

Codas R, Badet L, Eugene M, Giraud S, Thuillier R, Hauet T, et al. Evaluation of pulsatile perfusion machine RM3 for kidney preservation in a swine model of renal autotransplantation. Transplant Proc. 2009 Oct;41(8):3296-8.

6.1.1 Rappel des objectifs et hypothèses

Les machines de perfusion sont utilisées en clinique depuis plusieurs années surtout aux USA. Le changement important dans la démographie des donneurs d'organes a poussé les équipes de transplantation à utiliser des reins considérés jusque-là comme non transplantables, notamment ceux provenant des DDAC. La plus grande partie des travaux réalisés en clinique montre l'efficacité de la perfusion pour diminuer le taux de RRF et de PNF chez des donneurs de la catégorie de Maastricht III. Nous avons donc choisi d'utiliser un modèle se rapprochant des conditions de prélèvement d'organe dans le cadre des DDAC de la catégorie de Maastricht I et II (non contrôlees). Ces deux catégories sont les seules utilisées en France dans la mesure où la loi n'autorise pas pour le moment l'arrêt de soins (Maastricht III).

L'objectif a été d'évaluer si la machine de perfusion rénale (RM3®) est en mesure de limiter les lésions rénales dues au phénomène d'IR et de maintenir l'intégrité du greffon par rapport à la conservation statique dans le modèle d'autotransplantation rénale chez le porc modélisé pour approcher les conditions cliniques du Maastricht I et II.

6.1.2 Publication

ELSEVIER

Evaluation of Pulsatile Perfusion Machine RM3 for Kidney Preservation in a Swine Model of Renal Autotransplantation

R. Codas, L. Badet, M. Eugene, S. Giraud, R. Thuiller, and T. Hauet, on behalf of group FLIRT

ABSTRACT

Aim. Transplantations of kidneys from non–heart-beating donors (NHBD) are intended to increase the donor pool by 20% to 30%. Nevertheless the rate of primary nonfunction and delayed graft function is generally higher among this group of donors. The goal of this study was to assess whether kidney preservation by a pulsatile perfusion machine was able to limit the renal lesions due to ischemia reperfusion injuries as compared with static incubation. We have used a model of an autotransplanted kidney exposed to controlled warm ischemia in the pig to mimic the clinical conditions of NHBD.

Material and Methods. Left kidneys from 11 large white pigs aged 4 weeks were harvested after vascular clamping of the renal vessels for 1 hour. Kidneys were preserved for 22 hours. Two groups were studied: the MPS static group (static incubation with Belzer MPS; n = 6) versus the MPS RM group (renal perfusion with Belzer MPS; n = 5). Kidneys were then autotransplanted into pigs after a right nephrectomy. The primary end point was animal survival rate at 1 month. Secondary endpoints were evolution of the plasma creatinine values, proteinuria, tubular sodium reabsorption, and histological features at 1 month.

Results. For all biological parameters, the differences between the perfusion and the static incubation groups were significant, except creatinine, with favorable effects for the perfusion machine group. The histological data at 1 month showed recovery of the normal kidney architecture in the MPS RM group.

Conclusion. In our pig experimental model that reproduced the clinical conditions of a NHBD, we demonstrated better kidney preservation when the pulsatile perfusion machine was used as compared with static conservation.

DURING the last 15 years, there has been a continuous increase in patients with end-stage renal failure awaiting kidney transplantation. At the same time the number of cadaveric donors[1,2] has not increased sufficiently, leading to a dramatic shortage of kidneys for transplantation. Therefore, a growing number of transplantation centers use kidneys from marginal donors as new organ sources. In this setting several centers have renewed their interest in the use of non–heart-beating donors (NHBD) also called "deceased donors after cardiac arrest."[2,3] Transplantations performed with kidneys harvested from NHBD are intended to increase the donor pool by 20% to 30%. Kidney transplantation from NHBD display an increased rate of delayed graft function (DGF; up to 80%)[4,5] and, more importantly, of primary nonfunction (PNF), which may occur in more than 15% of cases.[5] This rate of PNF is not acceptable; the use of kidneys collected from NHBD requires proper tools to assess their suitability. This evaluation must allow the discard of bad kidneys if it is to limit the DGF rate. Kidney viability can be assessed in several ways[6,7]; donor history[8,9] and microscopic evaluation of biopsy specimens[10] are the factors usually considered, but they are not sufficiently accurate to entirely avoid PNF. The use of a pulsatile perfusion machine (MPP), in which kidneys connected via the renal artery to the machine are

From the Service de Chirurgie Urologique et de la Transplantation, Hôpital E Herriot HCL, Université Lyon, Lyon, and Université de Médecine et Pharmacie, CHU de Poitiers, Poitiers, France.

Address reprint requests to Dr Lionel Badet, Hopital E Herriot, Pavillon V, 5 place d'Arsonval 69003 Lyon, France.

0041-1345/09/$–see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2009.08.045

© 2009 Published by Elsevier Inc.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

perfused by a preservation solution, allows one to control the perfusion pressure and to assess flow and resistance indices over time. During the perfusion, clots are cleared and free radicals, which are released during the period of warm ischemia, may be washed away. The MPP has been shown to improve the quality of human NHBD kidneys by reducing the DGF rate. It appears to be an important tool to test kidney viability.[11–15] The goal of our study was to assess whether kidney preservation by MPP was able to limit the renal lesions due to ischemia reperfusion injuries as compared with kidney preservation by static cold storage (CS). We have used a model of an autotransplanted kidney exposed to controlled warm ischemia (WI) in the pig to mimic the clinical conditions of NHBD. Herein we have presented our results at 1 month.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experiments were performed in accordance with federal legislation regarding the protection of animals. Large white pigs aged 4 weeks and weighing 40 +/−5 kg were housed in metabolic cages. They were fed ad libitum with a constant nutrient laboratory grower diet and allowed free access to tap water. All animals demonstrated normal renal function before the start of the study.

Experimental Design

We used a well-established porcine renal autotransplantation technique.[16,17] The WI time was standardized at 1 hour. The left kidneys from 11 pigs were harvested after vascular clamping of the renal vessels (WI). Kidneys were preserved for 22 hours at 4°C in CS or subjected to MPP (pressure settings: 35/40 mm Hg) using Belzer MPS (University of Wisconsin machine perfusion solution). We compared an MPS static group (CS with Belzer MPS solution usually used on the machine; n = 6) with an MPS RM group (renal perfusion using the MPP and Belzer MPS as perfusion solution; n = 5). The primary end point was the animal survival rate at 1 month. Secondary endpoints were evolution of the plasma creatinine values, proteinuria, tubular sodium reabsorption, and histological features at 1 month.

Renal Autotransplantation

Kidneys were then autotransplanted in pigs after a right nephrectomy. Vascular anastomoses were performed end-to-side (renal vein–vena cava) and end-to-side (left renal artery–aorta), using 5-0 polypropylene running sutures. Reperfusion was established by release of the venous and arterial clamps, 30 minutes after clamping. The ureter was cannulated using a double J stent into the bladder.

RESULTS

No significant differences in cold ischemic times and anastomosis times were observed between the groups (Table 1). For all biological parameters, the difference between the perfusion and the CS groups was significant ($P = .05$), except the plasma creatinine, with a favorable effect for MPP preservation. The histological data at 1 month showed significantly less tissue lesions in the 2 kidney perfusion groups, with almost ad integrum recovery of the normal kidney architecture in the MPS RM group (data not shown).

Table 1. Results at 1 Month

Feature	MPS Static	MPS RM
Animal survival	3/6	5/5
Plasma creatinine (μmol/L)	160 ± 33	126 ± 10
Proteinuria g/24 h	1.73 ± 0.18	0.43 ± 0.22
Tubular sodium reabsorption rate	0.17 ± 0.02	0.08 ± 0.02

DISCUSSION

Donor organ shortage is a major problem in modern transplantation. The acceptance of NHBD is one possible way to deal with this problem. It is estimated that fully developed NHBD programs can increase the available kidneys for transplantation by 20% to 30%.[18] However, kidneys retrieved from NHBD endure a period of WI, which can potentially damage them significantly. It is, therefore, of the greatest importance to assess the viability of kidneys prior to transplantation; MPP seems to be, at this moment, the most objective way to predict which kidneys may not function and should be discarded before use.

This study demonstrated that MPP improved preservation of porcine kidneys. In the past, several experimental studies have addressed the role of machine perfusion in renal preservation using canine models. In contrast to humans, dogs are relatively resistant to ischemic injury.[19] We chose the pig as an experimental model because its renal anatomy and physiology are close to the human situation.[16,20,21] An autotransplantation model was used to exclude allogeneic immune responses, allowing unbiased investigation of ischemia/reperfusion injuries. To determine renal function of the autotransplanted kidney, we performed a contralateral nephrectomy.

This characteristic of pig kidneys makes them ideal to use for perfusion on the RM3 MPP, which is used in human organ transplantation. In our pig experimental model that reproduces the clinical conditions of NHBD, we demonstrated a better condition of kidney preservation when MPP was used compared with CS in the same solution. Histopathological study of the biopsy specimens showed recovery of the normal kidney architecture at 1 month, which correlated with the biochemical data. The beneficial effect of the machine appeared to be independent of the type of preservation solution.

REFERENCES

1. Oniscu GC, Brown H, Forsythe JL: How great is the survival advantage of transplantation over dialysis in elderly patients? Nephrol Dial Transplant 19:945, 2004

2. Available at: www.uktransplant.org.uk. Accessed February 2004

3. Kimber RM, Metcalfe MS, White SA, et al: Use of non heart beating donors in renal transplantation. Postgrad Med J 77:681, 2001

4. Metcalfe MS, Butterworth PC, White SA, et al: A case control comparison of the results of renal transplantation from heart-beating and non heart beating donors. Transplantation 71:1556, 2001

5. Gerstenkorn C: Non-heart-beating donors: renewed source of organs for renal transplantation during the twenty-first century. World J Surg 27:489, 2003

6. Nicholson ML: Renal transplantation from non-heart-beating donors. Br J Surg 83:147, 1996

7. Brook NR, Waller JR, Nicholson ML: Nonheart-beating kidney donation: current practice and future developments. Kidney Int 63:1516, 2003

8. Brasile L, Stubenitsky BM, Booster MH, et al: Overcoming severe renal ischemia: the role of ex vivo warm perfusion. Transplantation 73:897, 2002

9. D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Belzer FO: Non-heart-beating donors: one response to organ shortage. Transplant Rev 9:168, 1995

10. Balupuri S, Strong A, Hoernich N, et al: Machine perfusion for kidneys: how to do it at minimal cost. Transpl Int 14:103, 2001

11. Wight JP, Chilcott JB, Holmes MW, et al: Pulsatile machine perfusion vs. cold storage of kidneys for transplantation: a rapid and systematic review. Clin Transplant 17:293, 2003

12. Wight J, Chilcott J, Holmes M, et al: 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 7:1, 2003

13. Van der Vliet JA, Kievit JK, Hene RJ, et al: Preservation of non-heart-beating donor kidneys: a clinical prospective randomised case-control study of machine perfusion versus cold storage. Transplant Proc 33:847, 2001

14. Polyak MM, Arrington BO, Stubenbord WT, et al: The influence of pulsatile preservation on renal transplantation in the 1990s. Transplantation 69:249, 2000

15. Kozaki K, Sakurai E, Kubota K, et al: Prediction of kidney nonfunction after transplantation with machine perfusion preservation. Transplant Proc 32:275, 2000

16. Nicholson ML, Hosgood SA, Metcalfe MS, et al: A comparison of renal preservation by cold storage and machine perfusion using a porcine autotransplant model. Transplantation 78:333, 2004

17. Lodge JP, Perry SL, Skinner C, et al: Improved porcine renal preservation with a simple extracellular solution-PBS140. Transplantation 51:574, 1991

18. Papalois V, Vlachos K, Barlas A, et al: Ethical issues in non heart beating donation. Bull Med Etihcs :13, 2004

19. Ploeg RJ, Goossens D, McAnulty JF, et al: Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution. Transplantation 46:191, 1988

20. Dalmose AL, Hvistendahl JJ, Olsen LH, et al: Surgically induced urologic models in swine. J Invest Surg 13:133, 2000

21. Douglas WR: Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, sus scrofa, in human medical research. Space Life Sci 3:226, 1972

6.1.3 Synthèse

Les reins ont subi une ischémie contrôlée de 60 minutes in situ (ischémie chaude) et une ischémie froide de 22 heures. Durant les 22 heures de conservation hypothermique les reins ont été randomisés pour être conservés soit en incubation statique soit sur machine de perfusion.

Nos résultats montrent :

1- Que le taux de survie des animaux est significativement plus élevé dans le groupe perfusé que dans le groupe incubation statique.
2- Que les reprises de fonctions tubulaire et glomérulaire sont améliorées et plus rapides dans le groupe perfusé comparé au groupe non perfusé.
3- Que la protéinurie marqueur de l'altération glomérulaire au plus long cours est significativement moins importante dans le groupe perfusé.
4- Que l'étude histologique des reins réalisée après un mois de suivi est caractérisée par une récupération quasi-totale de l'architecture tubulaire dans le groupe perfusé.

Ceci permet de conclure à une supériorité des conditions de conservation lorsque les reins sont placés sur la machine de perfusion au lieu d'être laissés en incubation statique seule.

6.2. ARTICLE 2

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 Jan;109(1):141-7.

6.2.1 Rappel des objectifs et hypothèses

Depuis 2005 la législation Française permet de transplanter des greffons issus de DDAC, afin d'élargir le pool des donneurs en transplantation rénale compte tenu de la pénurie d'organes. Nous avons pu montrer dans notre première publication que la machine de perfusion est en mesure d'améliorer les conditions de conservation des reins soumis à des ischémies contrôlées mimant les conditions retrouvées dans la population des DDAC Maastricht I et II.

Nous avons cherché à déterminer si le type de liquide de conservation utilisé durant la perfusion par la machine RM3® était en mesure d'influencer la qualité de la préservation. La perfusion avec du Belzer MPS modélisé par les fabricants de machines pour la perfusion a été comparée à la perfusion par de l'IGL-1®, solution de quatrième génération habituellement utilisée pour la conservation en incubation statique.

6.2.2 Publication

BJUI
BJU INTERNATIONAL

Renoprotective effect of pulsatile perfusion machine RM3: pathophysiological and kidney injury biomarker characterization in a preclinical model of autotransplanted pig

Ricardo Codas[1], Raphael Thuillier[2,3,4], Thierry Hauet[2,3,4,5,6] and Lionel Badet[1,2,4,6,7]

[1]Service d'Urologie et Chirurgie de la Transplantation, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, [2]Inserm U927, Université Poitiers, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Poitiers, [3]Service de Biochimie, CHU de Poitiers, Poitiers, [4]FLIRT, Fédération pour L'étude de l'Ischémie Réperfusion en Transplantation, Poitiers, [5]Plate forme IBiSA, domaine du Magneraud, Surgères, [6]Réseau CENTAURE, Nantes, and [7]Faculté de Médecine Lyon-Sud, Oullins; Univ Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France

Accepted for publication 20 January 2011

OBJECTIVES

- To assess the effect of machine perfusion (MP) on renal function recovery vs kidney preservation in static cold storage (CS), in a large animal preclinical model.
- To assess whether MP benefits are dependent on the preservation solution used.

METHODS

- Using an established autotransplantation pig kidney model associated with a contralateral nephrectomy we studied the impact of MP against the deleterious effects of warm ischaemia (WI; 60 min), then 22 h of cold ischaemia using MP or static CS, followed by autotransplantation.
- We used Berzer MP solution (MPS), recommended for MP, and Institut Georges Lopez preservation solution (IGL-1), designed for CS.
- The pigs were divided into four study groups: MPS-CS: static CS with MPS ($n = 7$); MPS-MP: renal perfusion with MPS using the Waters Medical Systems (Rochester, MN, USA) RM3 pulsatile machine ($n = 7$); IGL-CS: static CS with IGL-1 solution ($n = 7$); IGL-MP: renal perfusion with IGL-1 solution ($n = 7$).
- The effect of ischaemia was determined using different variables: pig survival; plasma creatinine; proteinuria; oxidative stress; tubular sodium reabsorption rate; and tissue damage at 1 month.

RESULTS

- Pig survival was higher in MP and IGL groups compared to MPS-CS.
- Plasma creatinine levels did not differ among the groups, but proteinuria assay showed significant benefits for the MP vs static CS groups.
- Histological evaluation of kidney grafts showed more injury in the CS groups than in the MP groups.
- Urinary measurement of tubular enzyme activity differed substantially among the groups, highlighting the benefits of MP in maintaining brush border integrity.

CONCLUSIONS

- In our model reproducing the conditions of deceased after cardiac arrest donors we show that MP decreases the risk of renal dysfunction and preserves kidney parenchyma.
- A non-invasive urinary enzyme assay can provide valuable information on graft integrity.
- The preservation solution used is important as the wrong solution can decrease the benefits of MP.

What's known on the subject? and What does the study add?
Machine perfusion of kidney graft improves short term outcome. However, the technique still requires optimisation, as the rate of delayed graft function remains high.

Machine perfusion of kidney graft has significant benefits on chronic outcome in terms of interstitial fibrosis and kidney function. Improvement of the technique is possible using alternative perfusion fluids, such as fourth generation preservation solutions containing polyethylene glycol.

KEYWORDS

preclinical studies, animal models, machine preservation perfusion, ischaemia reperfusion injury, preservation solution, delayed graft function

© 2011 THE AUTHORS

INTRODUCTION

The best treatment for patients with end-stage renal disease is kidney transplantation, with long-term benefits compared with dialysis for patient survival and health-related quality of life [1,2]. The shortage of organs and donor demographic changes have led to the concept of the so-called 'marginal' donor, which refers to elderly donors who died from cardiovascular causes, whose organs present cardiovascular risk factors or a reduction in GFR [3]. Organs from marginal donors have additional damage resulting from acute ischaemia and are more sensitive to preservation methods [4]. Several centres have renewed their interest in deceased after cardiac arrest donors (DCAs) which could potentially increase the donor pool by 20–30% [5]; however, DCA kidney transplantation has a higher rate of delayed graft function and, most importantly, a higher incidence of primary non-function [6–8]. The development of better organ preservation methods is, therefore, of paramount importance and deserves scientific consideration.

Machine perfusion (MP) is based on a controlled circulation of a perfusate and allows control of the perfusion pressure and the assessment of flow and resistance indices over time. MP improves the quality of DCA kidneys in humans, reduces the delayed graft function rate and is an important tool for testing the viability of kidneys [9,10], but the protective mechanisms of MP remain unclear [11].

Our aim was to assess if MP kidney preservation can better limit the renal lesions caused by ischaemia reperfusion injury than preservation in static cold storage (CS). We used an autotransplanted pig kidney model exposed to controlled warm ischaemia (WI) to mimic the clinical conditions of DCA organs. We previously validated this model and obtained data that could be extrapolated to human DCA kidneys [12,13]. Porcine kidneys are of similar size and weight to adult human kidneys and are known to have similar anatomical and physiological characteristics [14]. Rodent ischaemia-reperfusion acute kidney injury models do not resemble human renal injury because rodents have unilobular, unipapillary kidneys where segmental arteries are bypassed [14,15]. Pigs, monkeys and humans have multilobular and multipapillary kidneys and an elaborate system of interlobular and segmental arteries to supply the numerous kidney lobes. Moreover, the pig kidney model allows a follow-up for several weeks and consequently a detailed picture of injury. Together, these characteristics are valuable for the clinical translation of experimental studies.

We assessed the effect of MP using Belzer MP solution (MPS), a solution close to University of Wisconsin (UW) solution (used for cold-storage) where lactobionate is replaced by gluconate and potassium is reduced to achieve an extracellular level, and using a novel preservation solution developed by Institut Georges Lopez (IGL-1), which combines the advantages of UW solution and Celsior solution that are associated with polyethylene glycol polymer of 35 kDa at low concentration [16,17].

MATERIALS AND METHODS

PIG MODEL AND SURGICAL PROCEDURE

Left kidneys from 28 large white pigs aged 4 weeks and weighing 40 (±4) kg were collected after vascular clamping of the renal vessels for 1 h (WI). Then the organ was removed and immediately cold-flushed with preservation solution (MPS or IGL-1). Kidneys were preserved for 22 h at 4 °C. The animals were divided into four study groups: MPS-CS: static CS with MPS ($n = 7$); MPS-MP: renal perfusion with MPS using the Waters Medical Systems (Rochester, MN, USA) RM3 pulsatile machine ($n = 7$); IGL-CS: static CS with IGL-1 solution ($n = 7$); IGL-MP: renal perfusion with IGL-1 solution ($n = 7$). Afterwards, the kidney was re-implanted and the contralateral kidney was removed. Heterotopic autotransplantation of the left kidney using end-to-side aorta and vena cava anastomosis was performed via the mid-line incision, as previously reported [18,19]. In all cases, re-warming ischaemia during implantation until anastomosis was 30 (±5) min. The primary endpoint was the pig survival rate at 1 month. A control group of three animals was performed to assess the normal values of creatinine in pigs with a single nephrectomy at 1 month.

RENAL FUNCTION EVALUATION

Pigs were placed in metabolic cages for 24-hourly urine collections. Blood and urinary samples were collected and plasma creatinine, Na+ fractional excretion and proteinuria were measured on days 7, 14 and at 1 month using a modular automated analyser (Roche Diagnostics, Meylan, France).

MORPHOLOGICAL STUDY

Ultrasonography-guided biopsies from the deep cortex/outer medulla region of the kidney were collected on days 7, 14 and at 1 month, then processed for light microscopy. Conventional stains were applied (haematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff). Histological lesions (brush border integrity, and intratubular detachment) were expressed using a semiquantitative scale [20]: 0: no detection; 1: criteria detected in <10%; 2–10: criteria detected in ≤25%; 3–26: criteria detected in ≤50%; 4–51: criteria detected in 75%; 5: criteria detected in >75% of kidney samples. This evaluation was performed on 5–10 high powered fields (200X).

MEASUREMENT OF RATIO OF OXIDIZED GLUTATHIONE TO TOTAL GLUTATHIONE

Oxidized gluthatione (GSSG)/reduced glutathione (GSH) + GSSG was measured as described previously [21]. GSH was determined by the formation rate of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. GSSG was measured by the 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)-GSSG reductase recycling assay after removal of GSH from 2-vinylpryridine. Total glutathione and GSSG levels were defined as the change in optical density (OD) at 412 nm for 1 min at 37 °C.

KIDNEY INJURY BIOMARKERS

The activities of the brush border enzyme alanine aminopeptidase (AAP) and lysosomal enzyme *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) were determined in urine on days 1, 3 and 7 after reperfusion, as previously described [22]. NAG and AAP activity (U/L) was expressed as a ratio with urinary creatinine (mmol/L) so as to adjust for differences in urinary flow in the sample.

© 2011 THE AUTHORS

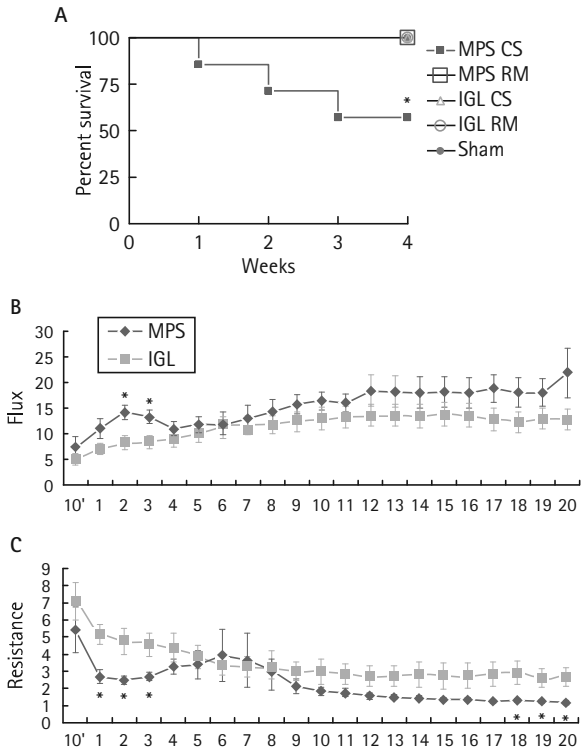


FIG. 1.
*Pig survival and perfusion parameters. **A**, Kaplan-Meier representation of pig survival. **B**, Flux values over time in MP grafts. **C**, Resistance indexes over time in MP grafts. Values are mean (SEM). *P < 0.05 vs MPS-CS; ǂP < 0.05 compared with IGL-CS; °P < 0.05 compared with MPS-MP.*

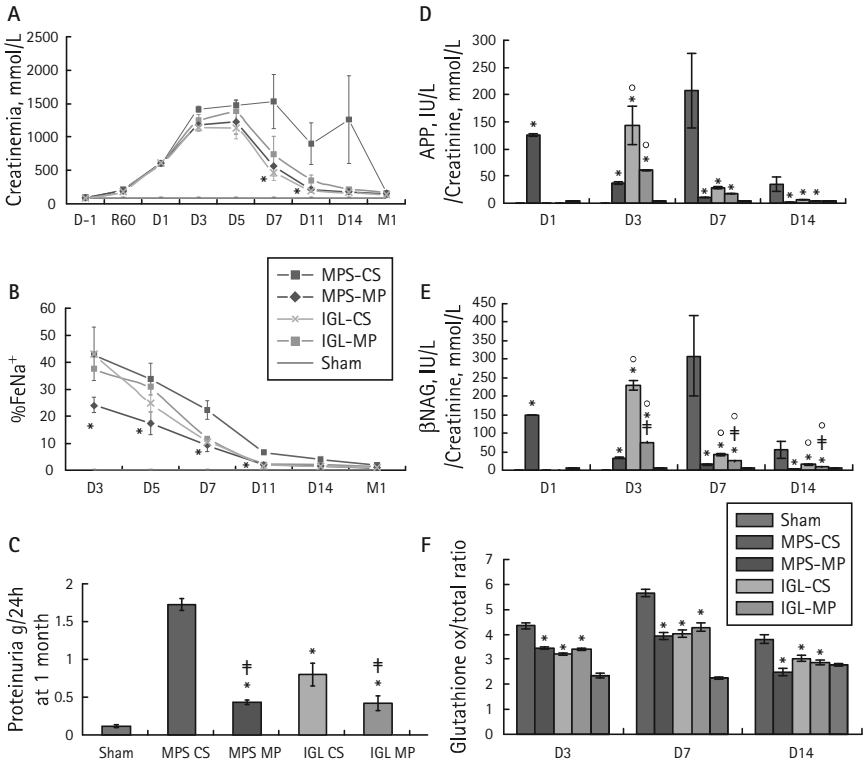


*FIG. 2. (**A**,**B**,**C**) Kidney function after reperfusion. **A**, Serum creatinine level before and after transplantation. **B**, Ratio of excreted sodium before and after transplantation. **C**, Proteinuria at 1 month. (**D**,**E**,**F**) Urine enzymes and glutathione redox status measurement. **D**, AAP activity in urine. **E**, NAG activity in urine. **F**, GSSG to total GSH ratio in the blood. Values are mean (SEM). *P < 0.05 vs MPS-CS; ǂP < 0.05 compared with IGL-CS; °P < 0.05 compared with MPS-MP. D1: day 1; D2: day 2 etc.; M1: 1 month.*

STATISTICAL ANALYSIS

For contrasting qualitative and quantitative variables, Student's *t*-test was used (as there were comparisons between only two samples), or its non-parametrical equivalent, the Mann-Whitney test. anova was used to compare groups, followed by the Bonferroni post-test correction, or the Kruskal-Wallis test (non-parametrical equivalent to anova). Results are expressed as mean (sem). A *P* value of <0.05 was considered to indicate statistical significance.

RESULTS

PIG SURVIVAL

After 1 month, 4/7 pigs survived in the MPS-CS group, one pig did not resume urine production after 1 week (primary non-function) and 2/7 animals were killed on days 16 and 21 because of impairment of their general condition (no weight gain, polyuria, prostration, not eating), which implied renal failure. All pigs survived in the other groups (Fig. 1A, $P < 0.05$).

RESISTANCE PROFILES AND RENAL FLOW DURING PERFUSION

Renal flows increased as renal resistance (RR) decreased, coinciding with the opening of the renal vascular bed during perfusion. There were greater flow volumes and less resistance in the MPS-MP group than in the IGL-MP group during the first hours of MP (Fig. 1B). All perfused grafts had a lower RR at the end of the perfusion (Fig. 1C).

RENAL FUNCTION AND PROTEIN EXCRETION

There was a faster recovery of serum creatinine levels in the MPS-MP, IGL-CS and IGL-MP groups than in the MPS-CS group (Fig. 2A, $P < 0.05$ on days 7 and 11). There was no statistically significant difference in terms of serum creatinine level at 1 month among groups or compared with control values [the mean (sem) creatinine level in pigs with a single nephrectomy at 1 month was 107 (8) mmol/L].

Tubular sodium reabsorption rate values are shown in Fig. 2B. Animals that were killed were not included in the calculations. There was a statistically significant difference ($P < 0.05$) in tubular sodium reabsorption

© 2011 THE AUTHORS
BJU INTERNATIONAL © 2011 BJU INTERNATIONAL

rates between the MPS-MP and the MPS-CS groups. There was no difference between IGL-MP and IGL-CS groups, but both groups were different compared with the MPS-CS on days 7 and 11 ($P < 0.05$).

Protein excretion is shown in Fig. 2C. The lowest levels were noted in the perfused groups, regardless of the solution used ($P < 0.05$). The IGL-CS group had lower proteinuria than the MPS-CS group ($P < 0.05$)

TABLE 1 Morphological evaluation of graft tissues

	Intratubular detachment			Brush border integrity		
Group	Day 7	Day 14	1 Month	Day 7	Day 14	1 month
Sham	0	0	0	0	0	0
MPS-CS	4.5 (0.4)	4.3 (0.4)	**3.8 (0.2)**	4.7 (0.5)	4.3 (0.4)	**3.7 (0.5)**
MPS-MP	3.6 (0.4)	2.8 (0.2)*	**2.1 (0.3)***†	3.6 (0.5)	2.8 (0.2)*,†	**2.2 (0.3)***,†
IGL-CS	4.0 (0.2)	3.7 (0.3)‡	**3.0 (0.3)**‡	4.0 (0.2)	3.5 (0.3)‡	**2.9 (0.3)**‡
IGL-MP	3.7 (0.5)	3.0 (0.3)*	**2.7 (0.3)***	3.7 (0.5)	3.2 (0.3)*	**2.3 (0.2)***

**P < 0.05 vs IGL-CS and MPS-CS; †P < 0.05 vs IGL-MP; ‡P < 0.05 vs MPS-CS. Values are mean (SEM). Scale: 0: no detection; 1: criteria detected in <10%; 2–10: criteria detected in ≤25%; 3–26: criteria detected in ≤50%; 4–51: criteria detected in 75%; 5: criteria detected in >75% of kidney samples.*

BIOCHEMICAL ANALYSIS

The activity of AAP and NAG, tubular cell enzymes of the renal brush border, in urine indicates tubular damage (Fig. 2D,E). The MPS-MP group showed a decrease in the urinary activity of these enzymes, which is an indication of ongoing repair mechanisms ($P < 0.05$ vs all other groups). The IGL-MP group had consistently lower levels than the IGL-CS group ($P < 0.05$). Between the two CS groups, IGL preservation was better than MPS for recovering tubular integrity.

The GSSG to total glutathione ratios (Fig. 2F) showed that oxidative stress in MPS-CS pigs was significantly greater than in all the other groups for the duration of the follow-up ($P < 0.05$).

HISTOPATHOLOGY

Histological evaluation is shown in Fig. 3 and Table 1. Cellular detachment and brush border loss were less severe in perfused groups on both day 14 and at 1 month ($P < 0.05$). There were fewer lesions in the IGL-CS group than in the MPS-CS group ($P < 0.05$), but the lowest grades of lesions were found in the MPS-MP group, significantly lower than IGL-MP.

DISCUSSION

The optimization of marginal organs for transplantation is of great importance for renal transplant programmes [23,24]. The optimum preservation conditions seem to be important for limiting ischaemia reperfusion injuries, especially for marginal donor kidneys. An improvement in organ preservation quality may have a significant effect on renal allograft outcome and modulate the risk of long-term complications [25]. To date, the predominant organ preservation method has been static CS. Pulsatile perfusion, or MP, is an interesting alternative, but its protective mechanisms and benefits remain unclear [26–28]. In the present study we used an experimental model mimicking the conditions of DCA to assess if MP could improve functional recovery after kidney transplantation.

There is increasing clinical evidence of the benefits of MP compared with CS in kidney transplantation. The results of a multicentre randomized controlled trial of paired kidneys highlighted the ability of MP to reduce delayed graft function [9]. Retrospective and prospective studies published in the literature have shown the benefit of MP [11], but do not clearly show the independent effect of MP with different preservation solutions.

Our experimental porcine autotransplantation kidney model with 60 min of WI and 22 h of hypothermic pulsatile perfusion using the RM3 machine (Waters Medical Systems) reproduces the conditions of uncontrolled DCA (Maastricht classes I and II). It provides preclinical, relevant information comparing the effects of MP with the commonly used static CS solutions. The model allows the direct assessment of Ischemia Reperfusion Injury (IRI) and renal and tubular cell function without the complication of immunogenic factors or recipient characteristics [28].

In the present study, the first line of evidence is that MP can reduce the risk of renal dysfunction for kidneys exposed to prolonged ischaemia. Tubular and glomerular functions were evaluated using tubular sodium reabsorption rates and proteinuria, respectively. Histological data showed that there was more tissue damage in non-perfused kidneys. Perfused grafts showed an efficient recuperation of renal architecture at 1 month after renal autotransplantation. These histological data are in accordance with biological data in the blood and urine.

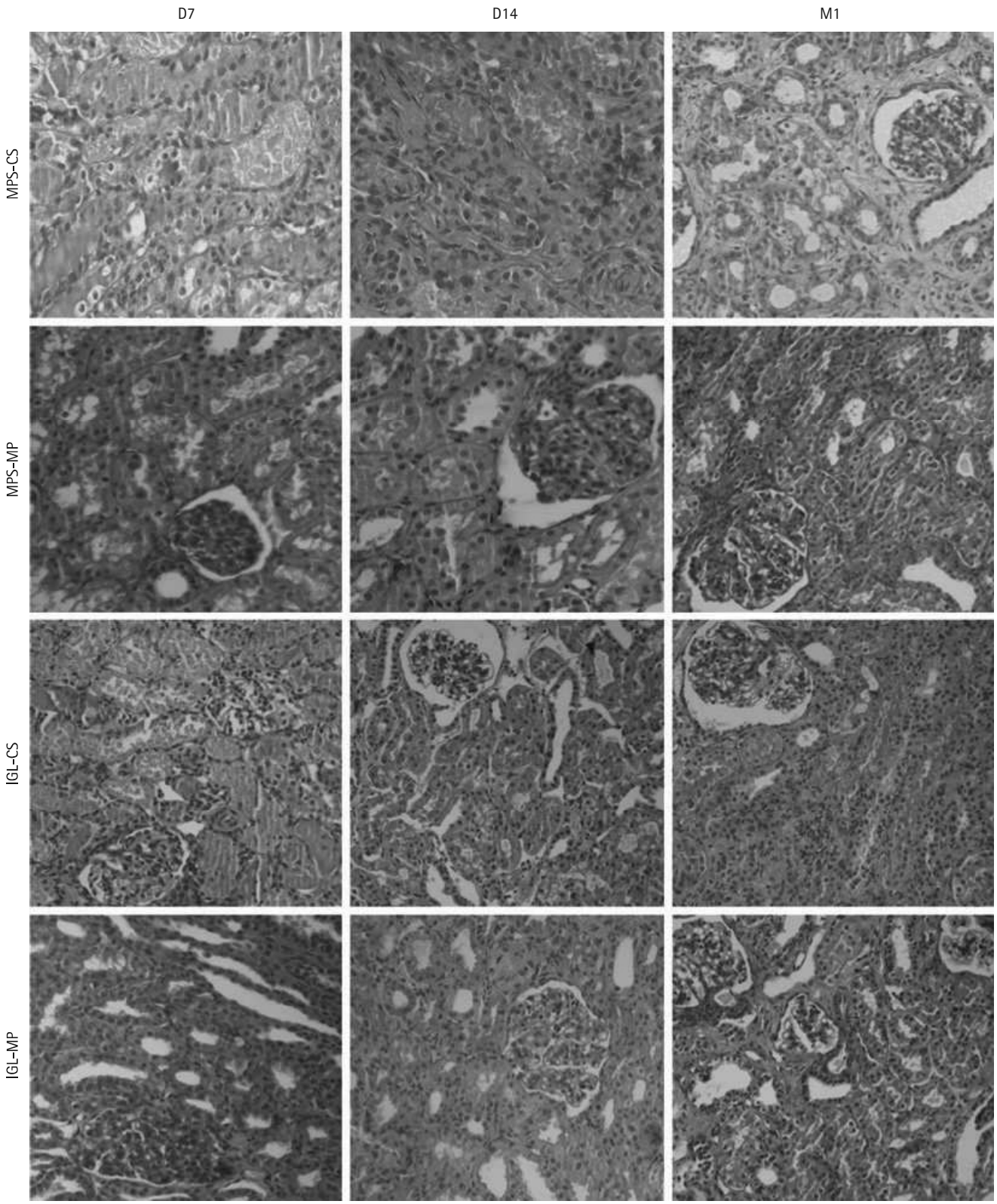
We found that MP benefits are independent of the solution used; however, the compatibility of the preservation fluid for perfusion is important. The use of colloids at high concentration, for example, is probably unsuitable for perfusion because the formation of PEG clusters block renal microcirculation.

Arterial resistance levels were lower in the MPS-MP group than in the IGL-MP group. This finding is probably related to the size of the colloid in the IGL-1 solution (polyethylene glycol 35kD, with a high molecular weight) when compared with MPS solution which contains hydroxyethylstarch. This less effective perfusion may be the reason that IGL-MP was not as effective as MPS-MP in the present study. Interestingly, MPS in CS conditions is less effective than IGL, which previously showed benefits in CS [29]. This may also be attributable to colloid, as previous studies have reported a deleterious effect of hydroxyethylstarch in CS related to accelerated aggregation of erythrocytes during CS preservation or volume expansion [30–32], an effect which appears to be mitigated by MP.

The rise in perfusion flow and the decrease in RR observed in the present study suggest that an increase in perfusion flow at a preset perfusion pressure could be a reliable indicator of graft viability [33,34]. For DCA

© 2011 THE AUTHORS

FIG. 3. Graft histology. Representative PAS staining of kidney biopsies at days 3 (D3) and 7 (D7) after transplantation. (M1: 1 month).



© 2011 THE AUTHORS
BJU INTERNATIONAL © 2011 BJU INTERNATIONAL

organs, a resistance index higher than 0.4 on the RM3 machine could lead to a high risk of primary non-function after 6 h of perfusion.

The present results confirm those of a previous study that found that MP with MPS was more effective than static CS [35]. In the present study we expand on these findings with the addition of IGL-1 groups, and confirm the compatibility of this less expensive solution with MP for a similar level of protection.

Interestingly, variations in plasma creatinine and sodium excretion measurements were not significantly different among the groups. This shows that classic techniques are less able to discriminate between MP and CS than more invasive techniques such as histology, or less used techniques such as urinary enzyme measurement and glutathione redox ratio. This may explain the relatively low impact of MP recorded in clinical studies, where these later assays are not usually performed. Furthermore, the assay performed detected dysfunction within the grafts earlier than classic assays (as early as day 3), offering an earlier readout on the quality of the graft and permitting better management of the patient early on, which possibly lowers the chances of later dysfunction. The results of the present study support the need to extend the array of assays used in patient follow-up.

Interestingly, although the classic evaluation of kidney function using serum creatinine and sodium excretion levels shows a return to baseline values at 1 month, proteinuria and other analyses reveal significant injury, even in the MP group. Thus, although MP was able to rescue the injury to an extent, there is scope for optimization to improve kidney preservation and quality with this method.

The present study supports the use of MP in lower than optimum kidney donor transplantation, with improved renal and tubular cell function compared with static CS techniques.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Gerard Mauco and Michel Eugene for their guidance and support in the conduction of this study.

FUNDING SOURCES

Conseil Général de la Vienne, Région Poitou Charentes, the Banque Tarneaud, Poitiers, CHU de Poitiers and Inserm, the Société Francophone de Transplantation, the French Foundation of Transplantation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

REFERENCES

1 **Schaubel D, Desmeules M, Mao Y, Jeffery J, Fenton S.** Survival experience among elderly end-stage renal disease patients. A controlled comparison of transplantation and dialysis. *Transplantation* 1995; **60**: 1389–94
2 **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**: 1725–30
3 UNOS. Annual report of the US Scientific Registry of Transplants Recipients and the Organ Procurement and Transplantation, 2004
4 **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): 28–32
5 **Cecka JM.** Donors without a heartbeat. *N Engl J Med* 2002; **347**: 281–3
6 **Azuma H, Nadeau K, Mackenzie HS, Brenner BM, Tilney NL.** Nephron mass modulates the hemodynamic, cellular, and molecular response of the rat renal allograft. *Transplantation* 1997; **63**: 519–28
7 **Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E *et al*.** Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. *Transplantation* 1995; **59**: 962–8
8 **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**: 1–94
9 **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
10 **Nicholson ML, Hosgood SA, Metcalfe MS, Waller JR, Brook NR.** A comparison of renal preservation by cold storage and machine perfusion using a porcine autotransplant model. *Transplantation* 2004; **78**: 333–7
11 **Yuan X, Theruvath AJ, Ge X *et al*.** Machine perfusion or cold storage in organ transplantation: indication, mechanisms, and future perspectives. *Transpl Int* 2010; **23**: 561–70
12 **Jayle C, Faure JP, Thuillier R, Goujon JM, Richer JP, Hauet T.** Influence of nephron mass and a phosphorylated 38 mitogen-activated protein kinase inhibitor on the development of early and long-term injury after renal warm ischaemia. *Br J Surg* 2009; **96**: 799–808
13 **Cau J, Favreau F, Zhang K *et al*.** FR167653 improves renal recovery and decreases inflammation and fibrosis after renal ischemia reperfusion injury. *J Vasc Surg* 2009; **49**: 728–40
14 **Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS.** Surgical renal ischemia: a contemporary overview. *J Urol* 2008; **180**: 19–30
15 **Wen X, Murugan R, Peng Z, Kellum JA.** Pathophysiology of acute kidney injury: a new perspective. *Contrib Nephrol* 2010; **165**: 39–45
16 **Badet L, Ben Abdennebi H, Petruzzo P *et al*.** Effect of IGL-1, a new preservation solution, on kidney grafts (a pre-clinical study). *Transpl Int* 2005; **17**: 815–21
17 **Badet L, Petruzzo P, Lefrancois N *et al*.** Kidney preservation with IGL-1 solution: a preliminary report. *Transplant Proc* 2005; **37**: 308–11
18 **Hauet T, Baumert H, Amor IB *et al*.** Pharmacological limitation of damage to renal medulla after cold storage and transplantation by trimetazidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **292**: 254–60
19 **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**: 138–48
20 **Goujon JM, Hauet T, Menet E, Levillain P, Babin P, Carretier M.** Histological evaluation of proximal

© 2011 THE AUTHORS

tubule cell injury in isolated perfused pig kidneys exposed to cold ischemia. *J Surg Res* 1999; **82**: 228–33
21 **Akerboom TP, Sies H.** Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981; **77**: 373–82
22 **Mueller PW, MacNeil ML, Steinberg KK.** Stabilization of alanine aminopeptidase, gamma glutamyltranspeptidase, and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in normal urines. *Arch Environ Contam Toxicol* 1986; **15**: 343–7
23 **Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ.** Perspectives in organ preservation. *Transplantation* 2007; **83**: 1289–98
24 **Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G.** Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004; **364**: 1814–27
25 **Ploeg RJ, Goossens D, McAnulty JF, Southard JH, Belzer FO.** Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution. *Transplantation* 1988; **46**: 191–6
26 **Watson CJ, Wells AC, Roberts RJ *et al*.** Cold machine perfusion versus static cold storage of kidneys donated after cardiac death: a UK multicenter randomized controlled trial. *Am J Transplant* 2010; **10**: 1991–9
27 **Wight JP, Chilcott JB, Holmes MW, Brewer N.** Pulsatile machine perfusion vs. cold storage of kidneys for transplantation: a rapid and systematic review. *Clin Transplant* 2003; **17**: 293–307
28 **Faure JP, Petit I, Zhang K *et al*.** Protective roles of polyethylene glycol and trimetazidine against cold ischemia and reperfusion injuries of pig kidney graft. *Am J Transplant* 2004; **4**: 495–504
29 **Codas R, Petruzzo P, Morelon E *et al*.** IGL-1 solution in kidney transplantation: first multi-center study. *Clin Transplant* 2009; **23**: 337–42
30 **Morariu AM, Vd Plaats A, Oeveren WV *et al*.** Hyperaggregating effect of hydroxyethyl starch components and University of Wisconsin solution on human red blood cells: a risk of impaired graft perfusion in organ procurement? *Transplantation* 2003; **76**: 37–43
31 **Mosbah IB, Franco-Gou R, Abdennebi HB *et al*.** Effects of polyethylene glycol and hydroxyethyl starch in University of Wisconsin preservation solution on human red blood cell aggregation and viscosity. *Transplant Proc* 2006; **38**: 1229–35
32 **van der Plaats A, 't Hart NA, Morariu AM *et al*.** Effect of University of Wisconsin organ-preservation solution on haemorheology. *Transpl Int* 2004; **17**: 227–33
33 **Matsuno N, Kozaki K, Degawa H *et al*.** A useful predictor in machine perfusion preservation for kidney transplantation from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 2000; **32**: 173–4
34 **Tesi RJ, Elkhammas EA, Davies EA, Henry ML, Ferguson RM.** Pulsatile kidney perfusion for evaluation of high-risk kidney donors safely expands the donor pool. *Clin Transplant* 1994; **8**: 134–8
35 **Codas R, Badet L, Eugene M, Giraud S, Thuiller R, Hauet T.** Evaluation of pulsatile perfusion machine RM3 for kidney preservation in a swine model of renal autotransplantation. *Transplant Proc* 2009; **41**: 3296–8

Correspondence: Thierry Hauet, Inserm U927, CHU de Poitiers, Rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France.
e-mail: t.hauet@chu-poitiers.fr

Abbreviations: **MP**, machine perfusion; **CS**, cold storage; **WI**, warm ischaemia; **DCA**, deceased after cardiac arrest donor; **MPS**, Belzer MP solution; **IGL-1**, Institut Georges Lopez preservation solution; **GSSG**, oxidized gluthatione; **GSH**, glutathione; **AAP**, alanine aminopeptidase; **NAG**, *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase; **RR**, renal resistance.

© 2011 THE AUTHORS
BJU INTERNATIONAL © 2011 BJU INTERNATIONAL

6.2.3 Synthèse

La solution de conservation de Belzer MPS, de type extra cellulaire et contenant comme colloïde le HES a été conçue pour la perfusion. Son utilisation sur la machine de perfusion a été comparée à l'utilisation de la solution d'IGL-1® de type extra cellulaire et contenant du PEG 35 kDa à 1 gramme par litre (solution conçue pour l'incubation statique).

4 groupes expérimentaux ont été comparés : Belzer MPS en incubation statique et en perfusion et IGL-1® en incubation statique et en perfusion.

Nous avons évalué dans notre modèle expérimental la survie des animaux, la fonction rénale, le stress oxydatif et l'histologie à 1 mois.

Nos résultats montrent comme dans le premier article un effet bénéfique de la PRH puisque nous constatons une meilleure survie des animaux dans le groupe perfusé avec du Belzer MPS. Il n'est pas retrouvé de différence significative de survie entre les animaux transplantés avec des reins perfusés ou mis en incubation statique dans l'IGL-1®. Seul le groupe d'animaux greffés avec des reins conservés dans du Belzer MPS en incubation statique montre une survie significativement inférieure à tous les autres groupes. L'évaluation de la reprise de fonction par analyse des valeurs de la créatinine plasmatique a montré une meilleure reprise de fonction pour les groupes perfusés et pour le groupe conservé en statique par l'IGL-1® à J7 et J15. Cette différence entre les reins perfusés en machine et ceux placés en incubation statique n'est plus retrouvée à 1 mois. De plus, il n'existait pas de différence significative à un mois entre les animaux ayant subi une ischémie rénale comparé au groupe Sham (néphrectomie unilatérale). La fraction d'excrétion du sodium montre une différence significative au détriment du groupe conservé en statique par du Belzer MPS par rapport aux autres groupes à J7 et J11. Cette différence n'est pas retrouvée entre les groupes conservés en perfusion ou en statique par de l'IGL-1®. Le stress oxydant est significativement supérieur dans le groupe conservé en incubation statique avec du Belzer MPS pendant tout le suivi. Lorsque les marqueurs urinaires de lésions tubulaires sont étudiés à 1 mois il existe un bénéfice significatif à l'utilisation de la machine indépendamment du liquide utilisé. Ceci se confirme d'une part avec l'étude de la protéinurie à 1 mois (corrélée aux

lésions glomérulaires) qui montrent une différence significative aux dépens des groupes conservés en incubation statique par rapport aux groupes perfusés, et d'autre part avec l'étude histologique à 1 mois qui met également en évidence une restitution de l'architecture tubulaire quasi-totale lorsque les reins ont été perfusés.

Nous avons donc pu montrer dans ce travail que l'effet machine peut être indépendant de la solution de conservation utilisée (pour peu que la solution soit compatible avec la perfusion) et confirmer que la PRH est en mesure d'améliorer les fonctions tubulaires et glomérulaires des greffons soumis à une ischémie contrôlée ainsi que leur récupération histologique.

6.3. ARTICLE 3

Thuillier R, Codas R, Marchand E, Lathelize H, Page O, Valagier A, Badet L, Hauet T. Chronic renoprotective effect of pulsatile perfusion machine RM3 and IGL-1 solution in a preclinical kidney transplantation model. Journal of translational medicine. 2012;10:233.

6.3.1 Rappel des objectifs et hypothèses

L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'effet (à 3 mois) de la machine de perfusion sur la fonction rénale et d'évaluer s'il existe un effet additionnel à l'utilisation pendant la perfusion d'une solution contenant du PEG 35 kDa à 1 gramme par litre (Solution IGL-1®). Le rationnel de l'utilisation de la solution IGL-1® comme solution de perfusion s'appuie sur les bons résultats de reprise fonctionnelle des reins conservés en incubation statique avec cette solution et sur le fait que la faible concentration de PEG peut être compatible avec la perfusion.

Nous avons utilisé pour réaliser notre travail expérimental le même modèle d'autotransplantation rénale que celui utilisé dans nos précédentes publications.

6.3.2 Publication

Thuillier et al. Journal of Translational Medicine 2012, 10:233
http://www.translational-medicine.com/content/10/1/233

JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE

RESEARCH Open Access

Chronic renoprotective effect of pulsatile perfusion machine RM3 and IGL-1 solution in a preclinical kidney transplantation model

Raphael Thuillier[1,2,3,4†], Ricardo Codas[3,4†], Etienne Marchand[5], Hubert Lathelize[6], Olivier Page[6], Alexandre Valagier[7], Lionel Badet[1,3,7,8,9] and Thierry Hauet[1,2,3,10,11*]

Abstract

Background: Machine perfusion (MP) of kidney graft provides benefits against preservation injury, however decreased graft quality requires optimization of the method. We examined the chronic benefits of MP on kidney grafts and the potential improvements provided by IGL-1 solution.

Method: We used an established autotransplantation pig kidney model to study the effects of MP against the deleterious effects of warm ischemia (WI: 60 minutes) followed by 22 hours of cold ischemia in MP or static cold storage (CS) followed by autotransplantation. MPS and IGL-1 solutions were compared.

Results: Animal survival was higher in MPS-MP and both IGL groups. Creatinine measurement did not discriminate between the groups, however MPS-MP and both IGL groups showed decreased proteinuria. Chronic fibrosis level was equivalent between the groups. RTqPCR and immunohistofluorescent evaluation showed that MP and IGL-1 provided some protection against epithelial to mesenchymal transition and chronic lesions. IGL-1 was protective with both MP and CS, particularly against chronic inflammation, with only small differences between the groups.

Conclusion: IGL-1 used in either machine or static preservation offers similar levels of protection than standard MP. The compatibility of IGL-1 with both machine perfusion and static storage could represent an advantage for clinical teams when choosing the correct solution to use for multi-organ collection. The path towards improving machine perfusion, and organ quality, may involve the optimization of the solution and the correct use of colloids.

Background

Nowadays, kidney transplantation is the best treatment for patients with end-stage renal disease, with long-term benefits on patient survival and quality of life [1]. However, this therapy is now a victim of its success, with an increasing shortage of organs: in 2010 in the USA, 15,429 kidney transplants were performed for 87,903 patients on the waiting list (OPTN, 2010). This leads to donor demographic changes as transplantation centers now accept more extended criteria donors (ECD). These donors are defined as presenting co-morbidity factors such as age, death from cardiovascular causes, cardiovascular risk factors or a reduction in glomerular filtration [2]. These conditions increase the sensitivity of the organ to preservation conditions [3]. Furthermore, there is renewed interest in deceased after cardiac death donors (DCD) [4], also displaying an increased rate of delayed graft function (DGF) and a higher incidence of primary non function [5]. The increased proportion of these types of donors has lead to re-thinking of proper organ preservation methods as in order to fully use these sources an important effort must be made to improve organ quality through better preservation.

Machine perfusion (MP) is based on a controlled circulation of a solution within the organ for the duration of the preservation. MP improves the quality of kidneys in the clinic [6] and is particularly efficient in decreasing both primary non function 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

* Correspondence: t.hauet@chu-poitiers.fr
†Equal contributors
[1]Inserm U1082, Université de Poitiers, Faculté de Médecine et Pharmacie, Poitiers 86021, France
[2]Service de Biochimie, CHU de Poitiers, Poitiers F-86021, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2012 Thuillier et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

method and the subgroups of patients on which to use it [9]. However, despite its significant efficiency in reducing DGF and increasing three year survival [10], a high incidence of failure remains, highlighting the need for improvements to be made on this method in order to bring it to its full potential.

In a previous study, we measured the benefits of MP versus static cold storage (CS) using the Waters RM3 system in a preclinical model of DCD kidney transplantation in pigs [11,12]. In the same study, we analyzed the possible benefits of using the IGL1 (Institute George Lopez 1) solution in the system instead of the recommended MPS (Machine Perfusion Solution). Indeed IGL-1 is a fourth generation preservation solution containing polyethylene glycols (PEG), which offer several advantages in preservation solutions: they are non toxic, neutral, water soluble, and their high affinity for water molecules along their chain creates layers of 'structured water' when they are adsorbed to the cell surface, offering an 'exclusion volume' preventing cells and proteins fixations, as in the case of the immunological synapse [13], offering the possibility of 'immunocamouflage' [14]. Protection from the immune system is also provided by the effect of PEG binding on cell surface potential gradient, affecting charge-charge and non-covalent binding/adhesion involved in antigen–antibody recognition. We determined in this short term study that there was a clear protection from MP when compared to CS, independently of the solution, and that there was a slight advantage from using MPS over IGL1 in MP, as kidneys preserved with the later showed some increase in the level of tissue injury recorded on an anatomopathological scale.

Herein we propose the results of the aforementioned study with a longer follow up (3 months), with the aim to provide more discriminating data between the groups. Indeed, 3 months after transplant is the time of choice for protocol biopsies in patients, allowing for estimation of the development of chronic lesions such as interstitial fibrosis and tubular atrophy. In our pig model, we previously showed that 3 months was also a valuable time to evaluate the chronic consequences of preservation, particularly regarding chronic injuries.

We performed these experiments in a pig model of kidney transplantation, reproducing conditions of DCD, which present the advantage of using the same machines as the clinic [11]. In this setting, we subject the kidney to 60 min of warm ischemia prior to 22 hours of hypothermic pulsatile perfusion in RM3, a model reflective of the uncontrolled DCD (Maastricht classes I and II). It provides pre clinically relevant information comparing the effects of MP with the commonly used static cold storage solutions. The model allows the direct assessment of IRI and renal and tubular cell function without the complication of immunogenic factors or recipient characteristic. In addition, porcine kidneys are of similar size and weight than adult human kidney and are one of the two biomedical animals (with large primates) presenting a multilobular and multipapillary kidney and an elaborate system of interlobular and segmental arteries to supply the numerous kidney lobes, it is therefore well adapted for the modeling of kidney transplantation [15]. The present study uses an isograft model, devoid of the influence of both brain death and immunosuppressants. This route was chosen because we felt that immunosuppressors, with their own set of deleterious side effects, would bias our results. Furthermore, machine perfusion has been developed to optimize graft preservation, hence address ischemia reperfusion injury, leading us to run this first series of tests on a non-brain dead animal. It is also important to note that our model is designed to follow the setting of classes I and II of the Maastricht criteria, but does not fit it exactly. Indeed, this criteria includes no more than 30 min arrest before starting the CPR procedure, which is then continued during the transport to the hospital (generally with a machine); then as failure to resuscitate is pronounced there is a 5 min no touch period. All these steps should not exceed 150 min before femoral vessels canulation. The donor is then either cold perfused or an extracorporeal circuit is put in place, giving enough time to secure consent from the family and collect the organs, which are then machine perfused. Our current model does not include all these steps, however we trust that 60 min WI reproduces as closely as possible the conditions of DCD. Lastly, although our model does not include brain death and thus cannot be used to draw direct conclusions in regards to ECD organ transplantation, the high degree of injury encountered by the organ suggest that any intervention proven beneficial in this model is likely to improve ECD organ quality and thus would warrant a dedicated investigation with an appropriate model.

Methods

Animal model and surgical procedure

Left kidneys from 28 large white pigs aged 4 weeks and weighting 40 ± 4 kg were collected after vascular clamping of the renal vessels for 60 min (warm ischemia, WI) preceded by administration of 150 U/kg heparin 10 min before clamping the left/or right renal artery. Then the organ was removed and immediately cold-flushed with 500-600 mL of preservation solution at a constant pressure of 75 mmHg (Belzer MPS or IGL-1 placed at 1 m of height). There was no difference in time or volume of flush out between the groups. Kidneys were preserved during 22 hours at 4°C. Four groups were studied: **MPS-CS:** static incubation with Belzer MPS (n = 7); **MPS-MP:** renal perfusion with Belzer MPS using the RM3

Waters Medical Systems pulsatile machine (n = 7); **IGL-CS:** with IGL-1 solution in static conservation (n = 7); **IGL-MP:** renal perfusion with IGL-1 (n = 7). Afterwards, the kidney was re-implanted and the contralateral was removed. Heparin (5000U) was injected prior to clamping pre-anastomosis. The heterotopic autotransplantation of the left kidney using end-to-side aorta and vena cava anastomosis was performed via the mid-line incision, as previously reported [16]. In all cases, re-warming ischemia during implantation until anastomosis was 30 ± 5 min. A control group of 3 animals was performed to assess the normal values of creatinine in pigs with a single nephrectomy. All animal experiments were conducted according to the guidelines of the French Ministry of Agriculture for the use and care of laboratories animals.

Renal function evaluation

Pigs were placed in metabolic cages for 24-h urine collections. Blood and urinary samples were collected. Plasma creatinine and proteinuria were measured with a Modular bioanalyser (Roche Diagnostics, France).

Morphological study

Corticomedullar kidney samples were collected at 3 months. A standard procedure was used to estimate the level of tubulointerstitial fibrosis using Picro-Sirius staining [17] on 5–10 fields (100X). For immunohistofluoresence, anti-Vimentin antibody (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) was used with secondary antibody coupled with Cy3 (Invitrogen). Quantitative evaluation was performed *in silico* on 35 high powered fields (5 per animal, 200X).

Real Time quantitative PCR (RTqPCR)

We used Trizol for RNA extraction (Fisher Scientific, France). Genomic DNA was removed using DNA-free kit (Applied Biosystems, USA) and first-strand reverse transcription (Applied) was performed. Real Time PCR assays were performed on an ABI Prism 7300 (Applied). Porcine primers (Additional file 1: Table S1) were designed using OligoPerfect™ (Invitrogen, USA). Expression level was obtained with the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Method. Controls are age-matched kidneys which have not beet subjected to ischemia reperfusion.

Statistical methods

Results are shown as mean±SEM. For the statistical analysis among groups, we used NCSS software (NCSS LLC, USA) and one-way ANOVA analysis. In case the ANOVA revealed statistical differences, Tukey-Kramer post-hoc test for multiple comparisons in case of normality (Skewness, Kurtosis and Omnibus tests) and equality of variance (Modified-Levene Equal-Variance Test) and Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test) in case these parameters were not met. For the multivariate analysis of variance, the Wilks' Lambda, Hotelling-Lawley Trace, Pillai's Trace and Roy's Largest Root tests were used to evaluate the hypothesis that the solution and/or the machine had no effect on the variable, and in case the hypothesis was rejected the analysis of variance for each factor and for their interaction was conducted. Statistical significance was accepted for $P < .05$.

Results

Early function recovery

Compared to MPS-CS, the decrease in serum creatinine levels post-transplantation was faster in the MPS-MP, IGL-CS and IGL-MP groups (Table 1), particularly evidenced by the levels reached at day 14. There was no statistically significant difference between these three groups.

3month survival and function

At the end of the follow up, only 57% of animals in the MPS-CS group survived while all animals of the other groups were able to reach the end of the follow up (Figure 1A, $P < .05$). Animal loss during follow up was due to renal failure, 3 cases of animal loss due to surgical errors (1 anastomosis failure, 2 bowel misplacement) were excluded from the analysis. No sign of vascular thrombosis was observed. Renal function of surviving animals showed no differences between the groups in terms of serum creatinine (Figure 1, B). There was a higher level of proteinuria in the MPS-CS group compared to the other three groups (Figure 1, C, $P < .05$).

Chronic fibrosis development

Analysis of interstitial fibrosis intensity revealed similar levels in all groups (around 15%), typical for fibrosis in its earlier stages (Figure 1 D-H).

Activation of injury mechanisms

We performed RTqPCR on markers of chronic kidney lesion pathways and determined that grafts from all groups demonstrated heightened levels of stress, as

Table 1 Kidney function recovery after reperfusion

Groups	*Serum Creatinine (μmol/L)*			
	D-1	D5	D7	D14
MPS CS	89.3 ± 4.6	1475.1 ± 72.4	1531.6 ± 407.4	1254.4 ± 655.7
MPS MP	92.1 ± 4.8	1225.7 ± 184.7	1225.7 ± 184.7 *	179.4 ± 20.2 *
IGL CS	81.0 ± 4.4	1135.3 ± 161.8	1135.3 ± 161.8 *	168.4 ± 19.5 *
IGL MP	82.0 ± 5.8	1389.3 ± 158.3	1389.3 ± 158.3 *	213.6 ± 19.1 *

Values are mean ± SEM. Statistics: *: $p < 0.05$ versus MPS-CS; ‡: $p < 0.05$ to IGL CS; ¶: $p < 0.05$ to MPS MP.

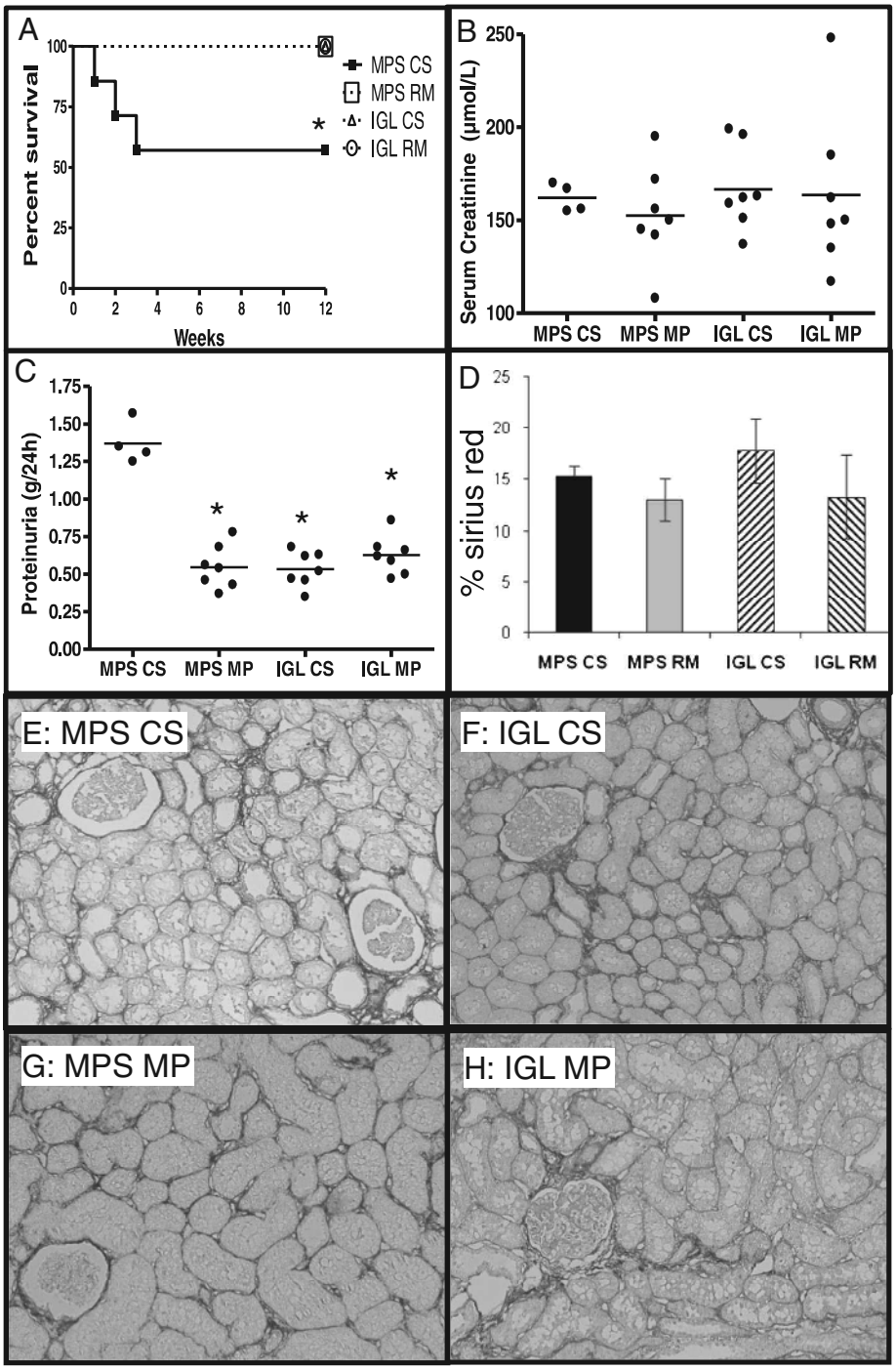


Figure 1 Functional and histological phenotype at 3 months. A-B: Animal Survival and graft function. A: Kaplan-Meier representation of animal survival. **B**: Serum creatinine and **C**: proteinuria. **D-H**: Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy at 3 months. **D**: Quantification of staining in each group **E-H**: Representative red Sirius staining for all 4 conditions. Shown are mean ± SEM. Statistics: *: $P < .05$ versus MPS-CS; ‡: $P < .05$ to IGL CS; ¶: $P < .05$ to MPS MP.

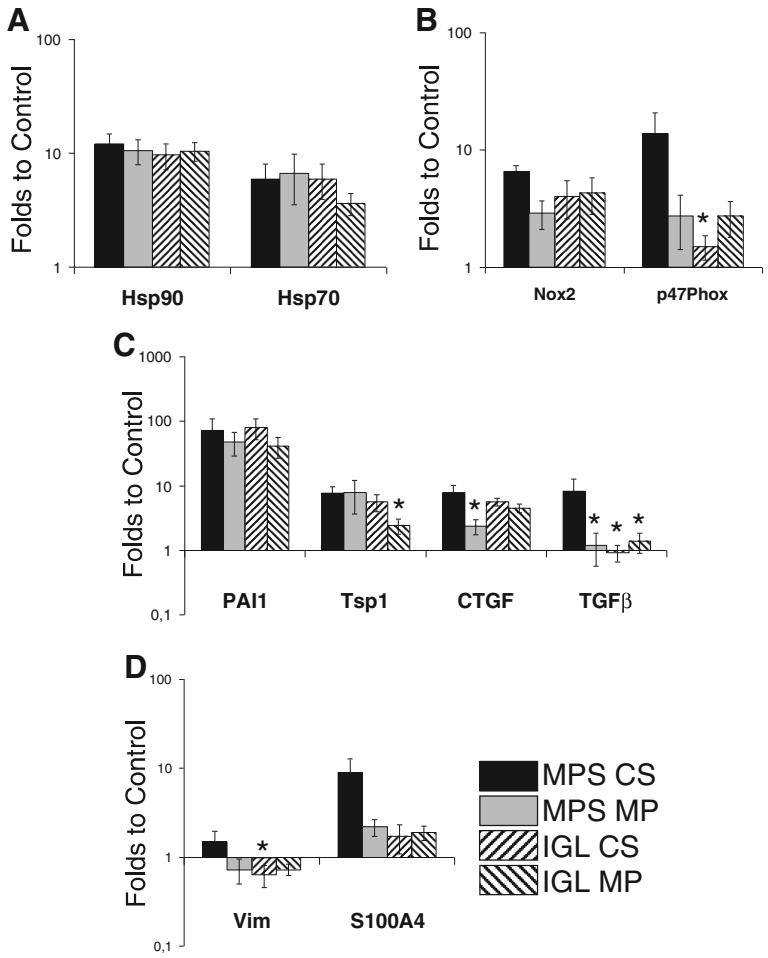


Figure 2 RTqPCR of chronic stress and fibrosis factors at 3 month. Quantification of gene expression was computed as stated in Methods. Shown are mean ± SEM. Statistics: *: P < .05 versus MPS-CS; ‡: P < .05 to IGL CS; ¶: P < .05 to MPS MP.

shown by heat shock proteins (Hsp) 70 and 90 expression (Figure 2, A). Oxidative stress was also present, with equivalent expression of NADPH oxidase subunit Nox 2 in all groups, while p47phox subunit showed higher expression in the MPS-CS group compared to the other three groups (Figure 2, B).

Activation of fibrosis development mechanisms

We measure the expression of pro-fibrosis markers by RTqPCR (Figure 2 C) and determined a similar level of overexpression for PAI1 in all groups. Thrombospondin 1 (Tsp1) was also overexpressed in all groups although slightly reduced in IGL-MP. Connective tissue growth factor (CTFG) overexpression was detected in all group, with some reduction in MPS-MP kidneys. Interestingly, expression of transforming growth factor β (TGFβ) was only detected in MPS-CS grafts.

Investigating mediators of epithelial to mesenchymal transition (Figure 2, D), we measured a trend towards overexpression of Vimentin in MPS-CS kidneys compared to the other groups, seemingly confirmed by S100A4 measurements.

Epithelial to mesenchymal transition (EMT)

We performed immunohistofluorescent staining for Vimentin and determined that in concordance with RTqPCR data, staining intensity was high in the MPS-CS Group (Figure 3) while it remained low in all three other groups (P < .05).

Chronic inflammation markers

We further defined the inflammatory situation by RTqPCR. Expression of TNFα was high in MPS-CS group while it appeared lowered in both MPS-MP and IGL-CS groups. IGL-MP group showed highly decreased expression for this marker, suggesting a likely negative regulation of inflammation at the time of analysis (Figure 4, A). This trend was also observed in other innate immunity markers, as MCP1 appears overexpressed in the MPS-CS group compared to the other two (Figure 4, B). TLR4 and TLR2 expression analysis

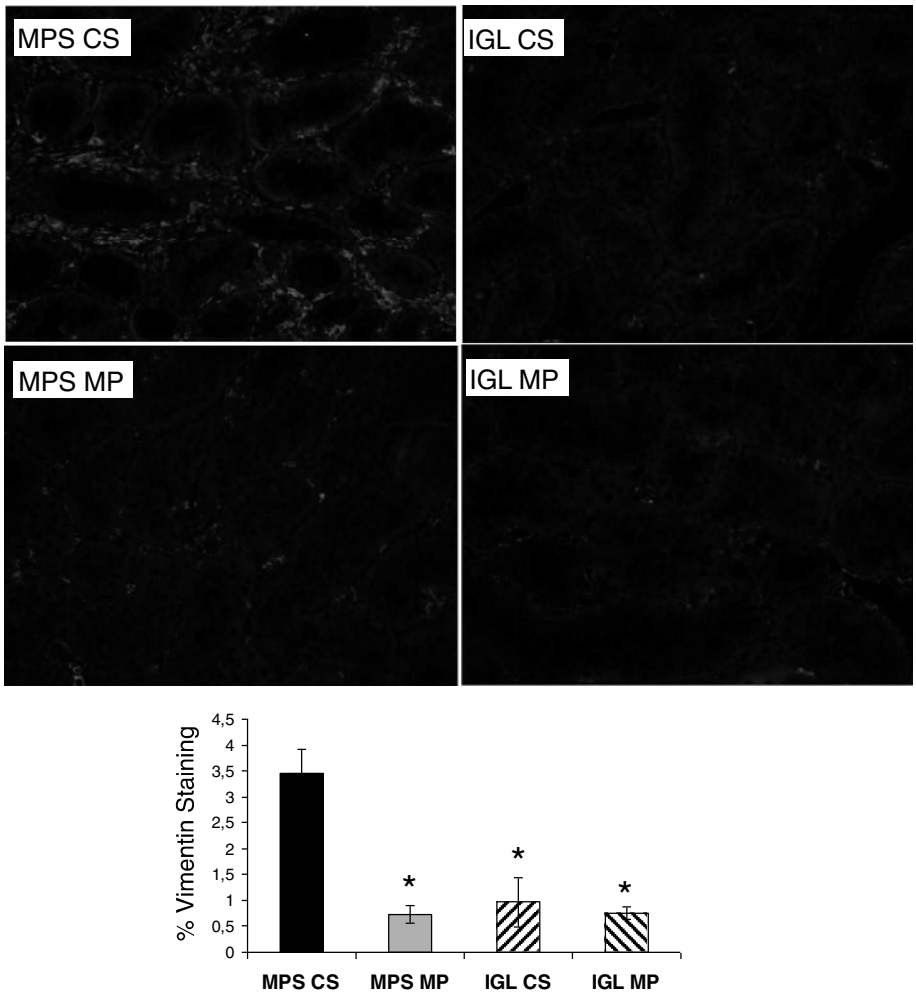


Figure 3 Epithelial to Mesenchymal transition at 3 months. Top: Representative Vimentin staining for all 4 conditions. Bottom: Quantification of staining in each group. Shown are mean ± SEM. Statistics: *: P < .05 versus MPS-CS; ‡: P < .05 to IGL CS; ¶: P < .05 to MPS MP.

revealed a similar trend, with significantly lower expression in IGL-MP compared to MPS-CS (Figure 4, B). IGL groups also showed significantly lowered expression of adaptative markers IL10 and IL1Rn compared to MPS-CS (Figure 4, C), and diminished expression of endothelial activation marker P selectin (Figure 4, D).

Multivariate analysis of variance

In order to measure the influence of the preservation solution (MPS or IGL1) and the mode of preservation (MP or CS) on organ quality, both their individual contribution and their interaction, we performed a multivariate analysis of variance on proteinuria and vimentin staining at 3 months (Table 2).

The results show that each factor plays an important individual role for these parameters, as demonstrated by the high F ratio and low p value. Interestingly, the influence of the interaction between solution and mode of preservation was also high, indicating that the improvement brought by the combination of factors is more than the simple addition of their individual contribution.

Discussion

In the present study, we confirmed previous findings demonstrating the benefits of MP on chronic kidney graft outcome [11]. Considering the importance of the solution bias when measuring the impact of machine preservation [18] and the fact that we previously demonstrated the superiority of MP over CS, all other parameters being equal [12,19], we did not include in the present study a CS group using standard static preservation solution (for instance University of Wisconsin) as we felt a repetition of these experiments would represent an unethical use of animals, in addition, an non-randomized prospective multi-center study showed that in clinical practice IGL-1 solution has the same effectiveness as UW solution in cold storage [20]. However, in previous

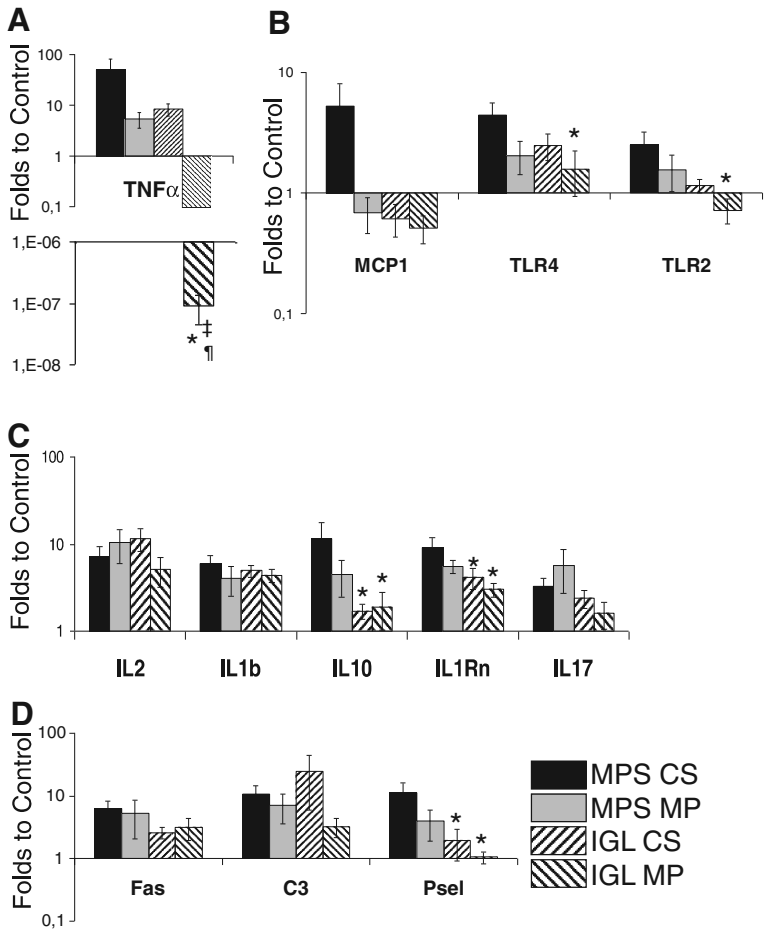


Figure 4 RTqPCR of inflammation factors at 3 month. Quantification of gene expression was computed as stated in Methods. Shown are mean ± SEM. Statistics: *: P < .05 versus MPS-CS; ‡: P < .05 to IGL CS; ¶: P < .05 to MPS MP.

studies using the same DCD model with static University of Wisconsin preservation, we found serum creatinine levels of approximately 400 μmol/L at 3 months [21], which when compared to the data of the present suggests superiority of MP versus CS when these modes are used in clinic-like conditions. Nevertheless, use of MPS for both CS and MP permitted the measurement of the benefits of the RM3 without interference from solution components, and indeed when using MPS, recommended solution for the RM3 machine, we show

Table 2 Multivariate analysis of variance results

Factor	*Vimentin Staining at 3 months*				
	Sum of Squares	*Mean Square*	*F-Ratio*	*Probability level*	*Power*
A: Solution	6,801158	6,801158	10,39	0,006132	0,849834
B: Mode of Preservation	9,683869	9,683869	14,79	0,001782	0,946426
AB: Interaction	7,065302	7,065302	10,79	0,005421	0,862812
S: Residual variance	9,16562	0,6546872			
	Protéinuria at 3 months				
Factor	*Sum of Squares*	*Mean Square*	*F-Ratio*	*Probability level*	*Power*
A: Solution	0,844812	0,844812	48,59	0,000001	0,999998
B: Mode of Preservation	0,788403	0,788403	45,35	0,000001	0,999996
AB: Interaction	1,239591	1,239591	71,30	0,000000	1,000000
S: Residual variance	0,3650857	1,738503E-02			

that MP increases graft survival and preserves chronic function parameters such as proteinuria compared to static storage. However, other typical parameters such as serum creatinine and fibrosis were not changed by the machine. In depth analysis of the phenotypes within the kidney graft by RTqPCR showed decreased levels in the expression of markers typical of chronic lesion such as Notch 4, which has been shown to inhibit angiogenesis [22], thus likely impeding the proper reparation mechanisms within the graft. We also detected lower p47phox expression in MPS-MP group, a subunit of NADPH oxidase. NADPH oxidase is a protein complex located in the plasma membrane as well as in the membrane of phagosome, which variation in expression have been linked to the level of oxidative stress in the tissue and to chronic injury [23]. Thus, MP appears beneficial in regards to chronic stress on the parenchyma.

Another important mechanism of chronic kidney graft lesion is epithelial to mesenchymal transition, during which epithelial cells differentiate and alter their phenotype towards that of a mesenchymal cell, thus going from a polarized, anchored and non dividing cell to an unpolarized, mobile and fast proliferating cell. This regenerative process is believed to be deregulated and promote fibrosis in the context of chronic graft rejection [24]. We investigated this phenomenon by first using RTqPCR to observe expression of Vimentin, typical marker of EMT, and CTGF, an important downstream effector of TGF-β involved in fibrosis [25] and EMT [26]. In our study, MPS-MP grafts had decreased expression of these markers compared to MPS-CS graft, a result which was then confirmed by immunohistofluorescence for Vimentin.

Hence, although interstitial fibrosis measurement using standard method (Sirius Red Staining) did not reveal a difference between these groups, mechanistic analysis showed that this process was slowed down in the MP group compared to the CS group. These results suggest that uncovering MP benefits may be difficult using standard methods of evaluation. We previously came to a similar conclusion during the evaluation of the Lifeport machine [19], when the use of KPS, of identical composition than MPS, made comparison between MP and CS more difficult as there was only slight differences in survival and typical biochemical evaluation. There also, proteinuria was one of the most discriminating markers.

In this previous study as well as the present one, the bias of the perfusion solution was very apparent. In both studies, multivariate analyses revealed both an individual effect of the machine and the solution on outcome markers, but more importantly showed a significant effect of the combination of factors. Our results herein show that the evidence for MP benefits is difficult to find when using IGL1 in CS and MP.

We previously reported little differences between IGL1 and MPS in MP when follow up was limited to 30 days, with a slight advantage for the use of MPS in terms of histological injury. Herein, longer follow up highlighted differences between both IGL groups and MPS-CS as evidenced by several parameters such as survival and proteinuria, as well as lesional markers detected by RTqPCR. Both IGL groups displayed reduced expression of TGFβ and Vimentin, which was confirmed by immunostaining, suggesting a better level of protection obtained through the use of the PEG-containing solution.

The use of PEG involves the concept of immunocamouflage [14], we thus investigated the immune response within the grafts. Interestingly, classical evaluation of immune cell invasion did not reveal differences between the groups (data not shown), however RTqPCR evaluation of immune markers determine some effects of IGL compared to MPS. IGL preserved grafts presented reduced levels of IL-10 and IL-1Rn, typical of Th2 phenotype. As Th2 immunity is linked to the development of fibrosis [27], the protection provided by IGL appears to be directed against fibrotic pathways.

Further investigation of innate immunity by RTqPCR analysis revealed that expression of TNFα, TLRs and Pselectin was the lowest in IGL grafts. TNF-α is one of the earliest cytokine produced in response to stresses, particularly by resident dendritic cells [28]. TLRs are well described effectors of ischemia reperfusion injury [29] and TLR4 as recently been shown to have a central role in kidney graft injury, both on the short and long term [30]. Pselectin is a marker of endothelial activation. Hence, the use of IGL appears to lower the immunogenicity of the graft, confirming our previous findings in an allotransplantation model [31].

The benefits from combining IGL and MP were more difficult to determine. Indeed, the only statistical difference between the IGL-CS and IGL-MP groups was in the recorded level of TNFα expression, which was significantly lower than controls, suggesting a negative regulation taking place within the kidney at the time of analysis. More data points would be necessary to describe in further detail the dynamics of immune regulation in this context. However, the difficulty in assessing the benefits of the combined use of IGL1 and MPS is concordant with retrospective and prospective studies published in the literature which have shown the benefit of MP [32] but did not clearly demonstrate the independent effect of MP with different preservation solutions. However, IGL-MP group results were more consistently reaching statistically significant difference to MPS-CS compared to the other groups. Thus, combining MP and IGL increases the protective potential of each technique to better preserve the graft against chronic adverse outcomes.

The difficulty in discriminating between groups with classical approached such as histology and biochemistry underlines the need for tools providing in depth analysis of the tissue phenotypes. Herein we demonstrate that although two tissues show similar levels of fibrosis, one group is much further along on the path towards fibrosis development according to the transcripts expressed by the cells. These results highlight the need for further research on in depth biomarkers, particularly using highly reproducible models to identify specific reporters of injury linked to variations in a single parameter.

In conclusion, this study demonstrates that the evaluation of machine perfusion is highly dependant on the solution used. Multivariate analysis of variance confirmed that the perfusion solution was significantly associated with the result, and moreover that combination of solution and machine could have additive effects. IGL-1 used in either machine or static preservation offers similar levels of protection than standard MP. Importantly, our data is in contradiction with a previous report from our team with a shorter follow up time. This highlight the needs for proper follow up durations in preclinical studies, particularly in research areas where chronic outcome is of crucial importance. The compatibility of IGL-1 with both machine perfusion and static storage could represent an advantage for clinical teams when choosing the correct solution to use for multi-organ collection. The path towards improving machine perfusion, and organ quality, may thus involve the optimization of the solution and the correct use of colloids.

Additional file

Additional file 1: Table 1. Primer sequences for RT-PCR analysis in Pig Kidneys.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution

RT performed RT-PCR and immunihistochemical experiments, analysed data and wrote the paper. RC performed animal experiments and gathered data. EM performed histophathological experiments and analysed data. HL performed biochemistry measurement. OP performed animal experiments and gathered data. AV performed biochemistry and RT-PCR experiments and analysed data. LB designed the study and managed data gathering/analysis. TH designed the study, managed project and wrote the paper. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to Pr Gerard Mauco and Pr Michel Eugene for their guidance and support in the conduction of this study; Séverine Deretz (INRA, Surgères) and William Hébrard and Catherine Henry (INRA, Surgères) for their expert technical assistance.

Results from the multivariate analysis of variance. For the vimentin staining and the level of proteinuria at 3 months we measured the influence of 2 factors, namely the solution used (MPS or IGL1) and the mode of preservation (MP or CS), as well as the influence of their interaction. We performed the Wilks' Lambda, Hotelling-Lawley Trace, Pillai's Trace and Roy's Largest Root tests were used to evaluate the hypothesis that the factors had no effect on the variable, and in case the hypothesis was rejected the analysis of variance for each factor and for their interaction was conducted.

Funding sources

Conseil Général de la Vienne, Région Poitou Charentes, the Banque Tarneaud, Poitiers, CHU de Poitiers and Inserm, the Société Francophone de Transplantation, the French Foundation of Transplantation.

Author details

[1]Inserm U1082, Université de Poitiers, Faculté de Médecine et Pharmacie, Poitiers 86021, France. [2]Service de Biochimie, CHU de Poitiers, Poitiers F-86021, France. [3]FLIRT: Fédération pour L'étude de l'Ischémie Réperfusion en Transplantation, Poitiers F-86000, France. [4]Service d'Urologie et chirurgie de la transplantation, Pavillon V - Hôpital Edouard Herriot, 5, place d'Arsonval, Lyon F-69437, France. [5]CHU Trousseau, Service de chirurgie vasculaire, Fédération hospitalière Tours-Poitiers, Saint-Avertin F-37550, France. [6]Service de Chirurgie Vasculaire, CHU de Poitiers, Poitiers F-86021, France. [7]Faculté de Médecine Lyon-Sud, Oullins Cedex, Oullins 69921, France. [8]University Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne cedex, Villeurbanne F-69622, France. [9]Réseau CENTAURE, 63, quai Magellan, Nantes, F-44000, France. [10]Plate forme IBiSA, domaine du Magneraud, BP 52, Saint Pierre d'Amilly, Surgères F-17700, France. [11]Inserm U1082, 2 rue de la miletrie BP577, Poitiers 86021, France.

Received: 6 August 2012 Accepted: 30 October 2012
Published: 21 November 2012

References

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK: **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:**1725–1730.
2. UNOS: *Annual report of the US scientific registry of transplants recipients and the organ procurement and transplantation*. 2004. www.unos.org.
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):28–32.
4. Cecka JM: **Donors without a heartbeat.** *N Engl J Med* 2002, **347:**281–283.
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:**1–94.
6. 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, *et al:* **Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation.** *N Engl J Med* 2009, **360:**7–19.
7. Treckmann J, Moers C, Smits JM, Gallinat A, Maathuis MH, van Kasterop-Kutz M, Jochmans I, Homan van der Heide JJ, Squifflet JP, van Heurn E, *et al:* **Machine perfusion versus cold storage for preservation of kidneys from expanded criteria donors after brain death.** *Transpl Int* 2011, **24:**548–554.
8. Jochmans I, Moers C, Smits JM, Leuvenink HG, Treckmann J, Paul A, Rahmel A, Squifflet JP, van Heurn E, Monbaliu D, *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:**756–764.
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–e68.
10. Moers C, Pirenne J, Paul A, Ploeg RJ: **Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation.** *N Engl J Med* 2012, **366:**770–771.
11. 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:**141–147.
12. Codas R, Badet L, Eugene M, Giraud S, Thuiller R: **Hauet T; group FLIRT: Evaluation of pulsatile perfusion machine RM3 for kidney preservation in a swine model of renal autotransplantation.** *Transplant Proc* 2009 Oct, **41**(8):3296–3298.
13. Bradley AJ, Scott MD: **Immune complex binding by immunocamouflaged [poly(ethylene glycol)-grafted] erythrocytes.** *Am J Hematol* 2007, **82:**970–975.

14. Le Y, Scott MD: **Immunocamouflage: the biophysical basis of immunoprotection by grafted methoxypoly(ethylene glycol) (mPEG).** *Acta Biomater* 2010, **6:**2631–2641.
15. 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.
16. Hauet T, Goujon JM, Vandewalle A, Baumert H, Lacoste L, Tillement JP, Eugene M, Carretier M: **Trimetazidine reduces renal dysfunction by limiting the cold ischemia/reperfusion injury in autotransplanted pig kidneys.** *J Am Soc Nephrol* 2000, **11:**138–148.
17. Grimm PC, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Stern E, Jeffery J, Rush DN: **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.
18. Chatauret N, Thuillier R, Barrou B, Hauet T, Eugene M: **Machine perfusion in clinical trials: the preservation solution bias.** *Transpl Int* 2011, **24:**e81–82.
19. Vaziri N, Thuillier R, Favreau FD, Eugene M, Milin S, Chatauret NP, Hauet T, Barrou B: **Analysis of machine perfusion benefits in kidney grafts: a preclinical study.** *J Transl Med* 2011, **9:**15.
20. Codas R, Petruzzo P, Morelon E, Lefrançois N, Danjou F, Berthillot C, Contu P, Espa M, Martin X, Badet L: **IGL-1 solution in kidney transplantation: first multi-center study.** *Clin Transplant* 2009, **23**(3):337–342.
21. Favreau F, Thuillier R, Cau J, Milin S, Manguy E, Mauco G, Zhu X, Lerman LO, Hauet T: **Anti-thrombin therapy during warm ischemia and cold preservation prevents chronic kidney graft fibrosis in a DCD model.** *Am J Transplant* 2009, **10:**30–39.
22. Leong KG, Hu X, Li L, Noseda M, Larrivee B, Hull C, Hood L, Wong F, Karsan A: **Activated Notch4 inhibits angiogenesis: role of beta 1-integrin activation.** *Mol Cell Biol* 2002, **22:**2830–2841.
23. Djamali A: **Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2007, **293:**F445–455.
24. Bedi S, Vidyasagar A, Djamali A: **Epithelial-to-mesenchymal transition and chronic allograft tubulointerstitial fibrosis.** *Transplant Rev (Orlando)* 2008, **22:**1–5.
25. Burns WC, Kantharidis P, Thomas MC: **The role of tubular epithelial-mesenchymal transition in progressive kidney disease.** *Cells Tissues Organs* 2007, **185:**222–231.
26. Cheng O, Thuillier R, Sampson E, Schultz G, Ruiz P, Zhang X, Yuen PS, Mannon RB: **Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis.** *Am J Transplant* 2006, **6:**2292–2306.
27. Shirwan H: **Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role?** *Transplantation* 1999, **68:**715–726.
28. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD: **Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury.** *Kidney Int* 2007, **71:**619–628.
29. Arslan F, Keogh B, McGuirk P, Parker AE: **TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury.** *Mediators Inflamm* 2010, **2010:**704202.
30. Campbell MT, Hile KL, Zhang H, Asanuma H, Vanderbrink BA, Rink RR, Meldrum KK: **Toll-Like Receptor 4: A Novel Signaling Pathway During Renal Fibrogenesis.** *J Surg Res* 2011, **168:**e61–e69.
31. Thuillier R, Giraud S, Favreau F, Goujon JM, Desurmont T, Eugene M, Barrou B, Hauet T: **Improving long-term outcome in allograft transplantation: role of ionic composition and polyethylene glycol.** *Transplantation* 2011, **91:**605–614.
32. Yuan X, Theruvath AJ, Ge X, Floerchinger B, Jurisch A, Garcia-Cardena G, Tullius SG: **Machine perfusion or cold storage in organ transplantation: indication, mechanisms, and future perspectives.** *Transpl Int* 2010, **23:**561–570.

doi:10.1186/1479-5876-10-233
Cite this article as: Thuillier *et al.*: Chronic renoprotective effect of pulsatile perfusion machine RM3 and IGL-1 solution in a preclinical kidney transplantation model. *Journal of Translational Medicine* 2012 **10**:233.

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

BioMed Central

6.3.3 Synthèse

4 groupes expérimentaux ont été comparés : Belzer MPS en incubation statique et en perfusion et IGL-1 en incubation statique et en perfusion.

Nous avons évalué dans notre modèle expérimental la survie des animaux, la fonction rénale, le stress oxydatif, le degré d'inflammation, l'activation de l'immunité innée et adaptative, l'activation des cellules endothéliales et l'histologie à 3 mois.

Nous avons utilisé comme paramètre d'étude : la survie des animaux, différents dosages biologiques, une analyse histologique et une évaluation immunologique par étude de l'expression des certains gènes impliqués dans le mécanisme lésionnel d'IR.

Nos résultats montrent, comme à 1 mois dans l'article 2 que la survie à 3 mois des animaux est supérieure dans les groupes perfusés et dans le groupe conservé en statique avec l'IGL-1® par rapport au groupe conservé en statique dans du Belzer MPS. La créatininémie ne diffère pas entre les groupes à 3 mois mais la protéinurie est significativement plus importante dans le groupe Belzer MPS en incubation statique comparé aux trois autres groupes. Le degré de fibrose est équivalent dans tous les groupes. En RTqPCR, nous avons étudié l'expression des gènes:

- Des protéines du stress oxydant, de l'inflammation (immunité innée).
- Des cytokines médiatrices de l'immunité adaptative.
- Des protéines impliquées dans la transition épithélio mésenchymateuse et dans la fibrose.
- Des protéines impliquées dans l'activation du complément.
- Des protéines impliquées dans la stimulation des cellules endothéliales ou de l'apoptose.

Ceci nous permet d'arriver aux conclusions suivantes :

- Qu'il existe un effet propre de la solution IGL-1® pour diminuer les mécanismes inflammatoires liés aux lésions d'IR, mais également pour moduler l'immunité innée et l'agression de la cellule endothéliale.

- Qu'il existe un effet propre de la machine qui s'additionne à celui de l'IGL-1® pour améliorer les conditions de conservation.

- Que la seule différence en faveur du groupe IGL-1® en perfusion par rapport au groupe IGL-1® en incubation statique, est la présence d'un rétro contrôle de l'expression du TNF-alpha probablement dû à un effet synergique entre la perfusion et le PEG en perfusion.

- Que la solution Belzer MPS utilisée en conservation statique conduit à une stimulation de l'immunité innée et adaptative significativement supérieure aux trois autres groupes.

En immunofluorescence, la vimentine, marqueur de la transition épithélio mésenchymateuse est significativement plus élevée dans le groupe des reins conservés en incubation statique par du Belzer MPS (en accord avec les résultats obtenus en RTqPCR pour la Vimentine et le S100A4) alors que la fibrose à 3 mois est non significativement différente entre tous les groupes, ce résultat laissant supposer que la fibrose aurait probablement continué à évoluer dans le groupe Belzer MPS en incubation statique et que le sacrifice des animaux aurait dû être plus tardif pour le prouver.

Nous avons donc montré dans cette partie du travail que la qualité de la conservation dépend dans une certaine mesure de la solution utilisée et de la méthode de préservation choisie.

L'analyse statistique en multi variée confirme que l'utilisation de la solution IGL-1® est associée à l'obtention de meilleurs résultats et qu'il existe un effet addition quand la machine de perfusion est utilisée.

7. Discussion

Comme nous l'avons bien rappelé les lésions induites par les mécanismes d'ischémie et de reperfusion, vont porter atteinte à l'intégrité tissulaire du greffon et perturber la reprise de fonction. Lorsque ces lésions sont réversibles elles se traduisent cliniquement par une RRF alors que lorsqu'elles sont irréversibles le patient doit faire face à une PNF. Les lésions induites passent par une altération du métabolisme cellulaire, conséquence directe de l'ischémie froide et/ou chaude, et vont conduire à l'épuisement des réserves énergétiques cellulaires, l'acidose, le développement d'un œdème tissulaire, et dans les situations les plus critiques à une apoptose et/ou une nécrose tissulaire.

Comme nous l'avons aussi mentionné l'optimisation de la conservation des organes, et notamment des greffons marginaux, constitue un enjeu de santé publique majeur puisque près de 50% des organes proposés aujourd'hui en France (et dans d'autres pays européens ou aux USA) rentrent dans cette catégorie (34, 49, 84), et que la survie de greffons au long cours va largement dépendre des conditions de conservation et de reprise de fonction (122). Outre la mise en œuvre des mécanismes inflammatoires non spécifiques (immunité innée), l'ischémie et la reperfusion vont conduire comme nous l'avons rappelé à une libération de la réponse immunitaire adaptative essentiellement marquée après transplantation rénale par un risque accru de rejet aigu à médiation cellulaire et de dysfonction chronique au long cours.

La lutte contre le développement des lésions liées à l'ischémie et à la reperfusion passe par des spécificités de prise en charge du donneur (pré conditionnement), la mise au point de nouveaux liquides de préservation, l'adaptation des modalités de conservation et le meilleur contrôle des conditions de reperfusion (post conditionnement).

Le développement de liquides de conservation de quatrième génération caractérisés par une composition biochimique de type extracellulaire et par l'utilisation de nouveaux colloïdes de type PEG a déjà permis d'améliorer la reprise de fonction, sans cependant être capable de mettre en évidence une meilleure survie de greffons au longs cours en clinique (134). Au travers de cette expérience se pose la question plus générale de la valeur à accorder aux études expérimentales réalisées en amont de l'expérience clinique, lorsque des études randomisées ne

permettent pas pour des raisons méthodologiques d'être réalisées en clinique humaine. L'avis de plus en plus partagé sur cette question est que les modèles animaux pertinents et validés sont en mesure de répondre de façon mieux ciblée à des questions auxquelles les études cliniques ne peuvent finalement pas répondre compte tenu de l'hétérogénéité des populations étudiées et de la difficulté à isoler, dans notre problématique, l'IR comme cause spécifique de dysfonction du greffon. C'est dans ce contexte que le modèle pré clinique et validé d'autotransplantation rénale chez le porc (300, 301) apparaît comme particulièrement intéressant et pertinent à utiliser pour l'étude des lésions induites par l'ischémie et la reperfusion; il permet d'évaluer précisément l'impact de lésions d'IR sur les fonctions glomérulaires et tubulaires des greffons rénaux sans avoir les biais classiques dus aux réactions allo-immunitaires et aux caractéristiques des receveurs.

Alors que les machines de perfusion sont utilisées en pratique clinique, en particulier aux Etats Unis depuis d'assez nombreuses années peu de travaux expérimentaux ont été réalisés jusqu'à aujourd'hui afin de démontrer l'effet spécifiquement bénéfique de la machine de perfusion et d'approcher les mécanismes mis en jeu pour l'amélioration des conditions de conservation. Plusieurs travaux réalisés en clinique humaine montrent le bénéfice de la PRH sur la conservation statique (210, 276). Une étude multicentrique randomisée réalisée par Eurotransplant (198, 199) montre de manière claire qu'il existe un bénéfice net de la perfusion pour toutes les catégories de greffons, en termes de reprise de fonction et de survie à 1 an et à 3 ans des greffons. Des études rétrospectives et prospectives montrent aussi un effet bénéfique de la machine de perfusion (302), en revanche il n'a pas été prouvé que ce bénéfice soit indépendant du liquide de conservation utilisé pour la PRH.

Notre travail expérimental s'est donc attaché à comparer la conservation statique à la perfusion sur machine afin d'évaluer le bénéfice apporté par la perfusion et d'approcher les mécanismes mis en jeu qui restent méconnus (210, 276, 303). Nous avons choisi dans notre travail de comparer la machine de perfusion à une solution de conservation de quatrième génération dont la composition répond aujourd'hui aux meilleurs standards de qualité possibles ; l'IGL-1® a fait l'objet de publications qui démontrent son efficacité en incubation statique (134), efficacité attribuée au PEG (colloïde non toxique) et à sa composition extracellulaire. La

solution de conservation UW a été écartée car nous avons pu montrer dans des travaux antérieurs que les animaux dont les reins sont conservés avec de l'UW ont une moins bonne reprise de fonction et une fibrose plus importante que dans des groupes expérimentaux utilisant du Belzer MPS (287) que ces solution soient utilisées en conservation statique ou en perfusion. Ces résultats sont en rapport avec le caractère intra cellulaire de la composition de l'UW et avec la présence de HES responsable d'une néphrotoxicité et d'une agrégation des globules rouges lors de la conservation (150, 304, 305).

Rappelons que la comparaison du résultat obtenu entre la perfusion et l'incubation statique est d'autant plus importante que la mise en jeu de la perfusion implique intrinsèquement plus de difficulté organisationnelle et logistique, et un coût de mise en œuvre plus élevé, alors même que la conservation par incubation statique reste de loin la plus répandue.

Nous avons cherché dans notre travail expérimental à nous rapprocher des conditions d'ischémie et reperfusion supposées les plus critiques dans un modèle d'autotransplantation rénale chez le porc avec ischémie contrôlée, qui mime dans une certaine mesure les conditions des DDAC, et à évaluer le bénéfice de l'utilisation de la machine de perfusion en termes de reprise de fonction et de survie des animaux. Nous avons d'autre part cherché à mettre en évidence les mécanismes protecteurs mis en œuvre en utilisant plusieurs méthodes d'évaluation semi quantitatives de l'expression de molécules ou de gènes spécifiquement impliquées dans l'IR.

L'analyse des données obtenues à 1 mois montre très clairement que la PRH est en mesure de réduire la RRF et PNF sur des greffons exposés à une ischémie prolongée en comparaison avec la conservation statique. Les fonctions glomérulaires et tubulaires ont été étudiées par le dosage de la protéinurie et de la fraction d'excrétion de sodium respectivement, montrant pour la protéinurie une différence significative en faveur des groupes perfusés et une récupération plus rapide de la fonction tubulaire dans les groupes perfusés. A 3 mois il existe toujours une différence significative de protéinurie au détriment du groupe conservé en incubation statique par du Belzer MPS ; en revanche nous ne retrouvons plus de différence entre le groupe perfusé et le groupe conservé en incubation statique par l'IGL-1® ce

qui souligne la qualité et l'efficacité des solutions de quatrième génération utilisées en incubation statique et la difficulté de trouver un bénéfice additionnel de la machine lorsqu'elles sont utilisées.

L'analyse histologique à 1 mois (étudiant l'architecture des cellules tubulaires) est en corrélation avec les résultats biologiques qui montrent une meilleure récupération fonctionnelle puisque les reins perfusés présentaient une architecture tubulaire quasi normale alors que les reins non perfusés présentaient toujours des lésions tubulaires significatives. A 3 mois, l'étude histologique de la fibrose ne retrouve pas de différence entre le groupe Belzer MPS en incubation statique et les trois autres groupes, alors que les troubles de la récupération fonctionnelle du groupe Belzer MPS non perfusé auraient dû se traduire au long cours par une stimulation de la transition épithélio mésenchymateuse et par une fibrose cicatricielle extensive remplaçant le tissu rénal fonctionnel. Néanmoins lorsqu'une étude immunohistochimique (anticorps anti-vimentine) et semi quantitative de l'expression de gènes codant pour la transition épithélio mésenchymateuse (PAI1, Tsp1, CTGF, TGF-beta, Vimentine, S100A4) (306, 307) est effectuée dans les différents groupes expérimentaux sur le tissu rénal prélevé à 3 mois il existe une augmentation significative de ces marqueurs dans le groupe Belzer MPS non perfusé. Ceci suggère qu'il existe à trois mois une stimulation des molécules effectrices de la fibrose dans le groupe Belzer MPS non perfusé, et permet de faire l'hypothèse que la fibrose rénale aurait probablement été plus importante dans ce groupe expérimental si le sacrifice des animaux avait été réalisé à 6 mois par exemple. Insistons cependant sur le fait que les end points de nos travaux doivent rester la survie du greffon et la fonction rénale et que les paramètres biologiques ou histologiques étudiés même s'ils présentent une validité interne doivent s'accompagner d'une corrélation avec la survie et la fonction des greffons pour qu'ils soient retenus utiles et pertinents.

Nous avons par ailleurs démontré que l'effet bénéfique propre de la perfusion rénale peut s'additionner avec celui de la solution de conservation utilisée. Cependant pour cela les solutions de conservation utilisées en perfusion doivent être compatibles avec une conservation dynamique. En pratique les solutions de conservation hyperpotassiques et celles contenant une forte concentration de colloïde (PEG) ne sont pas utilisables en perfusion rénale. En effet les solutions

hyperpotassiques conduisent à une vasoconstriction importante du lit vasculaire due à la forte concentration de potassium et s'opposent à l'ouverture du lit vasculaire du transplant alors que les solutions fortement dosées en PEG de haut poids moléculaire vont conduire à la formation d'amas de PEG dans la microcirculation de l'organe et obstruer la lumière vasculaire, s'opposant ainsi à la perfusion de l'organe (expérience réalisée dans notre unité de recherche avec la perfusion de reins par la solution de conservation SCOT 15® contenant un PEG de 20 kDa à la concentration de 15 grammes par litre). La solution IGL-1® contenant un PEG de 35 kDa mais à la faible concentration de 1 gramme par litre a pu être utilisée avec des résultats fonctionnels intéressants et favorables. Cependant la présence du PEG a considérablement modifié les paramètres de perfusion.

L'IRR, paramètre potentiellement utilisable comme outil complémentaire d'évaluation de la viabilité des greffons (216-222), était significativement plus bas pour la solution de Belzer MPS que pour la solution IGL-1®. Le fait que la solution IGL-1® contienne 1 gramme par litre de PEG 35 kDa alors que la solution Belzer MPS utilise comme colloïde de l'HES de poids moléculaire moins important rend la solution IGL-1® plus visqueuse que la solution de Belzer MPS ce qui pourrait expliquer que l'IRR soit plus élevé dans le groupe IGL-1® perfusé. Ceci doit être l'occasion de rappeler que l'IRR utilisé comme paramètre de perfusion est dépendant du type de liquide utilisé sur la machine mais également du type de machine utilisée (puisque le mode de calcule de l'IRR est différent entre les machines ORS et Waters Medical System) ; ces deux éléments soulignent les limites à utiliser l'IRR comme outil d'évaluation de la qualité du greffon. Ceci suggère par ailleurs que même si l'IRR peut donner certaines informations, il ne peut être utilisé seul pour évaluer la viabilité du greffon, d'autant que sa valeur prédictive paraît assez faible (212, 219, 220). Concernant toujours l'IRR, il est probable que le caractère prédictif de l'IRR dans le choix et la sélection des greffons soit aussi lié au type de greffon et en particulier à la vasculopathie présentée par le transplant : nous avons en effet pu montrer dans un travail clinique que des IRR supérieur à 0.35 pour des reins issus des DDAC Maastricht I et II dépourvus de lésions vasculaires sous-jacentes, étaient corrélés à un débit de filtration glomérulaire au long cours significativement inférieur à celui des reins dont l'IRR était inférieur à 0.35. Il semble évident que ceci ne soit

pas transposable dans la population des reins issus d'ECD pour lesquels la valeur de l'IRR est souvent plus élevée.

Un autre point concernant l'utilisation de PEG utilisé comme colloïde dans les solutions de conservation concerne les propriétés d'immunomasquage de ces solutions. Il paraît important de noter que cette propriété semble effective pour des concentrations importantes en PEG de poids moléculaire supérieur à 20 kDa. Ainsi les solutions à potentiel d'immunomasquage sont probablement toutes incompatibles avec la perfusion du fait de leur forte concentration en PEG. A contrario les solutions à faible concentration de PEG comme l'IGL-1® semblent compatibles avec une utilisation en perfusion mais ne peuvent pas prétendre à une capacité d'immunomasquage.

Concernant la comparaison des liquides de conservations IGL-1® et Belzer MPS utilisés sur la machine, on ne retrouve pas au niveau du modèle expérimental de différence de survie de greffon, de reprise de fonction ou de fibrose au long cours. Seule l'étude moléculaire permet d'identifier un effet potentiellement protecteur d'IGL-1® lorsqu'il est associé à l'utilisation de la machine par rapport à Belzer MPS puisque IGL-1® en perfusion semble en mesure d'assurer un rétro contrôle de la production de TNF-alpha, qui est augmenté dans tous les autres groupes. Par ailleurs l'utilisation d'IGL-1® est associée à un profil d'expression cytokinique d'IL10 et d'IL1Rn (caractéristique du phénotype Th2) diminuée par rapport à celle induite par l'utilisation du Belzer MPS, ce qui tend à montrer que la solution IGL-1® expose potentiellement moins à la fibrose que Belzer MPS. En pratique pour optimiser la conservation et la reprise de fonction il serait possible d'imaginer par exemple que la solution IGL-1® soit utilisée en perfusion sur la machine et qu'au terme de cette perfusion le greffon soit lavé avec une solution de type SCOT 15®, permettant potentiellement une immunoprotection (135).

Nous avons cherché dans ce modèle expérimental à nous rapprocher des conditions de marginalité des greffons qui nous sont proposés, cependant ce modèle qui se rapproche des conditions présentées par les DDAC ne représente finalement que moins de 10% de greffons proposés. En effet la grande majorité des greffons marginaux proposés sont issus des donneurs de type ECD qui présentent un terrain de vasculopathie sous-jacente avéré qui ne peut être reproduit dans le modèle

expérimental que nous avons utilisé. Il faudrait donc en pratique pouvoir disposer de porcs hypertendus et/ou hypercholestérolémiques qui présentent une dégradation de la fonction rénale au moment du prélèvement, puisqu'il n'est pas certain que le potentiel de récupération de ce type de greffon soit le même que celui des greffons sans lésions chroniques vasculaires ou glomérulaires que nous avons utilisés.

8. Conclusion

Ce travail de thèse a permis de montrer dans un modèle d'autrotransplantation rénale chez le porc exposé à une ischémie contrôlée mimant les conditions des DDAC:

- Que la machine de perfusion RM3® (Waters Medical System) diminue le risque de RRF et PNF post greffe.
- La supériorité de la solution IGL-1® sur la solution Belzer MPS.
- Que la reprise de fonction et la PNF dépendent aussi du liquide utilisé et qu'il existe un effet d'addition entre la qualité du liquide de conservation et l'utilisation des machines de perfusion.

9. Perspectives

Notre travail expérimental, a participé à répondre favorablement à l'utilisation des machines de perfusion dans le cadre de la prise en charge des greffons rénaux ; le champ d'IR est cependant bien plus large et notre travail pose finalement plus de questions qu'il n'apporte de réponses.

Si l'utilisation de la machine de perfusion dans des conditions d'hypothermie va incontestablement constituer une étape dans les modalités de prise en charge des greffons (cf. l'utilisation de la machine pour les DDAC et les ECD recommandée par l'Agence de la Biomédecine) il est certain que cela ne constitue réellement qu'une étape et que bien d'autres axes de recherche doivent être explorés en parallèle. On retiendra comme objectifs de recherche particulièrement importants :

- L'optimisation des solutions de perfusion rénale.
- L'utilisation en perfusion des substances pharmacologiques susceptibles d'améliorer la conservation (travaux déjà réalisés sur la trimétazidine auxquels nous avons participé, bloqueurs de canaux calciques) ou d'intrant comme l'hémoglobine de ver marin (transporteur d'oxygène et anti oxydant) également testé dans le laboratoire.
- L'apport de l'utilisation de la perfusion extracorporelle normothermique devra être mieux évalué en particulier chez le DDAC afin d'établir si l'utilisation associée de la machine de perfusion constitue réellement un gain comme modalité de conservation.
- La perfusion normothermique qui permet une évaluation plus précise du métabolisme du greffon, mais également d'apporter des substances directement actives sur le fonctionnement rénal devrait probablement à terme remplacer la perfusion hypothermique et permettre de passer d'une simple modalité de conservation à un vrai procédé d'évaluation du greffon rénal.
- La médecine régénérative et l'ingénierie tissulaire sont également des axes de recherche extrêmement prometteurs et des travaux expérimentaux déjà publiés montrent qu'il est possible d'assurer en partie la réparation de dommages tissulaires en utilisant des cellules souches ou mésenchymateuses directement injectées dans le greffon rénal.

Il est certain que dans ces conditions la recherche translationnelle va permettre le passage de nouveaux outils utilisés au laboratoire jusqu'en clinique humaine ; elle devra s'appuyer sur des laboratoires de conservation d'organes, structures professionnalisées dans l'évaluation et l'optimisation des greffons, et labélisées par les agences nationales pour réaliser des manipulations pharmacologiques ou de thérapie cellulaire.

10. Bibliographie

1. Guild WR, Harrison JH, Merrill JP, Murray J. Successful homotransplantation of the kidney in an identical twin. Trans Am Clin Climatol Assoc. 1955;67:167-73. PubMed PMID: 13360847. Pubmed Central PMCID: 2248870.

2. A definition of irreversible coma. Report of the Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School to Examine the Definition of Brain Death. JAMA : the journal of the American Medical Association. 1968 Aug 5;205(6):337-40. PubMed PMID: 5694976.

3. Abt PL, Fisher CA, Singhal AK. Donation after cardiac death in the US: history and use. Journal of the American College of Surgeons. 2006 Aug;203(2):208-25. PubMed PMID: 16864034.

4. Johnston TD, Thacker LR, Jeon H, Lucas BA, Ranjan D. Sensitivity of expanded-criteria donor kidneys to cold ischaemia time. Clinical transplantation. 2004;18 Suppl 12:28-32. PubMed PMID: 15217404.

5. Cecka JM. Donors without a heartbeat. The New England journal of medicine. 2002 Jul 25;347(4):281-3. PubMed PMID: 12140306.

6. Cofan F, Oppenheimer F, Campistol JM, Flores R, Vilardell J, Ricart MJ, et al. Advanced age donors in the evolution of renal transplantation. Transplant Proc. 1995 Aug;27(4):2248-9. PubMed PMID: 7652793.

7. Delmonico FL, Burdick JF. Maximizing the success of transplantation with kidneys from older donors. The New England journal of medicine. 2006 Jan 26;354(4):411-3. PubMed PMID: 16436774.

8. Chapman J, Bock A, Dussol B, Fritsche L, Kliem V, Lebranchu Y, et al. Follow-up after renal transplantation with organs from donors after cardiac death. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2006 Sep;19(9):715-9. PubMed PMID: 16918531.

9. Bunnapradist S, Gritsch HA, Peng A, Jordan SC, Cho YW. Dual kidneys from marginal adult donors as a source for cadaveric renal transplantation in the United States. J Am Soc Nephrol. 2003 Apr;14(4):1031-6. PubMed PMID: 12660338.

10. Fieux F, Losser MR, Bourgeois E, Bonnet F, Marie O, Gaudez F, et al. Kidney retrieval after sudden out of hospital refractory cardiac arrest: a cohort of uncontrolled non heart beating donors. Crit Care. 2009;13(4):R141. PubMed PMID: 19715564. Pubmed Central PMCID: 2750199.

11. Gerstenkorn C. Non-heart-beating donors: renewed source of organs for renal transplantation during the twenty-first century. World J Surg. 2003 Apr;27(4):489-93. PubMed PMID: 12658499.

12. Gerstenkorn C, Deardon D, Koffman CG, Papalois VE, Andrews PA. Outcome of renal allografts from non-heart-beating donors with delayed graft function. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2002 Dec;15(12):660-3. PubMed PMID: 12478415.

13. Hoogland ER, Snoeijs MG, Winkens B, Christaans MH, van Heurn LW. Kidney transplantation from donors after cardiac death: uncontrolled versus controlled donation. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2011 Jul;11(7):1427-34. PubMed PMID: 21668628.

14. Knight AJ NM. Methods of renal preservation. Transplantation Reviews. 2001 (15):68-81.

15. Spees EK VW, Mendez-Picon G et al. Preservation methods do not affect renal cadaver outcome: The SEOPF prospective study, 1977-1982. Transplantation Proceedings. 1984;16:177.

16. Hoffmann RM, Stratta RJ, D'Alessandro AM, Sollinger HW, Kalayoglu M, Pirsch JD, et al. Combined cold storage-perfusion preservation with a new synthetic perfusate. Transplantation. 1989 Jan;47(1):32-7. PubMed PMID: 2463700.

17. Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. American journal of physiology Renal physiology. 2004 Aug;287(2):F181-7. PubMed PMID: 15271685.

18. Watson CJ, Bradley JA. Cold storage of deceased donor kidneys: does the solution matter or is the solution elsewhere? American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2012 Apr;12(4):806-7. PubMed PMID: 22221597.

19. Opelz G, Dohler B. Multicenter analysis of kidney preservation. Transplantation. 2007 Feb 15;83(3):247-53. PubMed PMID: 17297393.

20. Rauen U, Elling B, Gizewski ER, Korth HG, Sustmann R, de Groot H. Involvement of reactive oxygen species in the preservation injury to cultured liver endothelial cells. Free radical biology & medicine. 1997;22(1-2):17-24. PubMed PMID: 8958126.

21. Rauen U, de Groot H. Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells. Free radical biology & medicine. 1998 May;24(7-8):1316-23. PubMed PMID: 9626589.

22. Salahudeen AK, Huang H, Patel P, Jenkins JK. Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury. Transplantation. 2000 Nov 27;70(10):1424-31. PubMed PMID: 11118084.

23. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. J Pathol. 2000 Feb;190(3):255-66. PubMed PMID: 10685060.

24. Haugen E, Nath KA. The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. Blood Purif. 1999;17(2-3):58-65. PubMed PMID: 10449863.

25. Hourmant M. [Renal ischemia reperfusion syndrome]. Nephrologie. 1999;20(7):371-5. PubMed PMID: 10642985. Le syndrome d'ischemie reperfusion renale.

26. Greenstein A, Aravot D, Braf Z, Lelcuk S. The role of oxygen free radicals and prostaglandins in reperfusion injury to warm ischemic kidneys. Urol Res. 1991;19(6):393-5. PubMed PMID: 1759334.

27. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. Transplantation. 1997 Apr 15;63(7):968-74. PubMed PMID: 9112349.

28. Nyberg SL, Matas AJ, Kremers WK, Thostenson JD, Larson TS, Prieto M, et al. Improved scoring system to assess adult donors for cadaver renal transplantation. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2003 Jun;3(6):715-21. PubMed PMID: 12780563.

29. Hertig A. [Delayed graft function]. Nephrol Ther. 2008 Oct;4 Suppl 3:S184-7. PubMed PMID: 19000884. Reprise retardee de fonction renale.

30. Tilney NL, Guttmann RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. Transplantation. 1997 Oct 15;64(7):945-7. PubMed PMID: 9381538.

31. Hochachka PW. Metabolic arrest. Intensive Care Med. 1986;12(3):127-33. PubMed PMID: 2426320.

32. Allen DG, Xiao XH. Role of the cardiac Na+/H+ exchanger during ischemia and reperfusion. Cardiovascular research. 2003 Mar 15;57(4):934-41. PubMed PMID: 12650871.

33. Bonventre JV, Cheung JY. Effects of metabolic acidosis on viability of cells exposed to anoxia. The American journal of physiology. 1985 Jul;249(1 Pt 1):C149-59. PubMed PMID: 4014448.

34. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. Lancet. 2004 Nov 13-19;364(9447):1814-27. PubMed PMID: 15541456.

35. Neely JR, Grotyohann LW. Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. Circulation research. 1984 Dec;55(6):816-24. PubMed PMID: 6499136.

36. Salahudeen AK, Huang H, Joshi M, Moore NA, Jenkins JK. Involvement of the mitochondrial pathway in cold storage and rewarming-associated apoptosis of human renal proximal tubular cells. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2003 Mar;3(3):273-80. PubMed PMID: 12614281.

37. Riess ML, Camara AK, Novalija E, Chen Q, Rhodes SS, Stowe DF. Anesthetic preconditioning attenuates mitochondrial Ca2+ overload during ischemia in Guinea pig intact hearts: reversal by 5-hydroxydecanoic acid. Anesthesia and analgesia. 2002 Dec;95(6):1540-6, table of contents. PubMed PMID: 12456413.

38. Garlicki M, Kolcz J, Rudzinski P, Kapelak B, Sadowski J, Wojcik S, et al. Myocardial protection for transplantation. Transplant Proc. 1999 Aug;31(5):2079-83. PubMed PMID: 10455976.

39. Macknight AD, Leaf A. Regulation of cellular volume. Physiological reviews. 1977 Jul;57(3):510-73. PubMed PMID: 142257.

40. Burns AT, Davies DR, McLaren AJ, Cerundolo L, Morris PJ, Fuggle SV. Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. Transplantation. 1998 Oct 15;66(7):872-6. PubMed PMID: 9798696.

41. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. Transplantation. 2002 Feb 27;73(4):493-9. PubMed PMID: 11889418.

42. Jassem W, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. Kidney international. 2004 Aug;66(2):514-7. PubMed PMID: 15253700.

43. Nieminen AL. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. International review of cytology. 2003;224:29-55. PubMed PMID: 12722948.

44. Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. Biochemical and biophysical research communications. 2003 May 9;304(3):463-70. PubMed PMID: 12729580.

45. Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. Current molecular medicine. 2003 Sep;3(6):527-35. PubMed PMID: 14527084.

46. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. The Biochemical journal. 1999 Jul 15;341 (Pt 2):233-49. PubMed PMID: 10393078. Pubmed Central PMCID: 1220352.

47. Cruthirds DL, Novak L, Akhi KM, Sanders PW, Thompson JA, MacMillan-Crow LA. Mitochondrial targets of oxidative stress during renal ischemia/reperfusion. Arch Biochem Biophys. 2003 Apr 1;412(1):27-33. PubMed PMID: 12646264.

48. Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. Biochimie. 2002 Feb-Mar;84(2-3):131-41. PubMed PMID: 12022944.

49. Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. Transplantation. 2007 May 27;83(10):1289-98. PubMed PMID: 17519776.

50. Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted organs: some new strategies against an old problem. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2004 Jan;4(1):1. PubMed PMID: 14678026.

51. Sutton TA, Mang HE, Campos SB, Sandoval RM, Yoder MC, Molitoris BA. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. American journal of physiology Renal physiology. 2003 Aug;285(2):F191-8. PubMed PMID: 12684225.

52. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. Nature medicine. 2011;17(11):1391-401. PubMed PMID: 22064429.

53. Gute D KR. Role of leukocyte adherence in reperfusion-induced microvascular dysfunction and tissue injury. Oxford University Press, Granger, DN, Schmid-Schonbein, GW (Eds), Leukocyte Adhesion. 1995.

54. Flores J, DiBona DR, Beck CH, Leaf A. The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. The Journal of clinical investigation. 1972 Jan;51(1):118-26. PubMed PMID: 5007042. Pubmed Central PMCID: 332936.

55. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. Molecular and cellular biochemistry. 1998 Feb;179(1-2):169-87. PubMed PMID: 9543359.

56. Panes J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. British journal of pharmacology. 1999 Feb;126(3):537-50. PubMed PMID: 10188959. Pubmed Central PMCID: 1565837.

57. Chiang ET, Camp SM, Dudek SM, Brown ME, Usatyuk PV, Zaborina O, et al. Protective effects of high-molecular weight polyethylene glycol (PEG) in human lung endothelial cell barrier regulation: role of actin cytoskeletal rearrangement. Microvascular research. 2009 Mar;77(2):174-86. PubMed PMID: 19121327.

58. Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, Feuerstein D, Kaskel FJ, Tellis V, et al. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemiareperfusion injury. Transplantation. 2003 Jul 15;76(1):50-4. PubMed PMID: 12865785.

59. Caroppi P, Sinibaldi F, Fiorucci L, Santucci R. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein. Current medicinal chemistry. 2009;16(31):4058-65. PubMed PMID: 19754424.

60. van der Woude FJ, Schnuelle P, Yard BA. Preconditioning strategies to limit graft immunogenicity and cold ischemic organ injury. Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research. 2004 Jul;52(5):323-9. PubMed PMID: 15551655.

61. Hauet T, Eugene M. A new approach in organ preservation: potential role of new polymers. Kidney international. 2008 Oct;74(8):998-1003. PubMed PMID: 18633345.

62. Rouschop KM, Leemans JC. Ischemia-reperfusion treatment: opportunities point to modulation of the inflammatory response. Kidney international. 2008 Jun;73(12):1333-5. PubMed PMID: 18516056.

63. Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research. 2004 Jul;52(5):299-309. PubMed PMID: 15551652.

64. Dutheil D, Rioja-Pastor I, Tallineau C, Goujon JM, Hauet T, Mauco G, et al. Protective effect of PEG 35,000 Da on renal cells: paradoxical activation of JNK signaling pathway during cold storage. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2006 Jul;6(7):1529-40. PubMed PMID: 16827853.

65. Arslan F, Keogh B, McGuirk P, Parker AE. TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury. Mediators Inflamm. 2010;2010:704202. PubMed PMID: 20628516. Pubmed Central PMCID: 2902053.

66. Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. The Journal of clinical investigation. 2007 Oct;117(10):2847-59. PubMed PMID: 17853945. Pubmed Central PMCID: 1974864.

67. Kim BS, Lim SW, Li C, Kim JS, Sun BK, Ahn KO, et al. Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys. Transplantation. 2005 May 27;79(10):1370-7. PubMed PMID: 15912106.

68. Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJ, Kirschning CJ, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. The Journal of clinical investigation. 2005 Oct;115(10):2894-903. PubMed PMID: 16167081. Pubmed Central PMCID: 1201659.

69. Thurman JM, Ljubanovic D, Edelstein CL, Gilkeson GS, Holers VM. Lack of a functional alternative complement pathway ameliorates ischemic acute renal failure in mice. Journal of immunology. 2003 Feb 1;170(3):1517-23. PubMed PMID: 12538716.

70. de Vries B, Walter SJ, Peutz-Kootstra CJ, Wolfs TG, van Heurn LW, Buurman WA. The mannose-binding lectin-pathway is involved in complement activation in the course of renal ischemia-reperfusion injury. The American journal of pathology. 2004 Nov;165(5):1677-88. PubMed PMID: 15509537. Pubmed Central PMCID: 1618654.

71. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. Curr Opin Immunol. 2001 Feb;13(1):114-9. PubMed PMID: 11154927.

72. Daemen MA, de Vries B, Buurman WA. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. Transplantation. 2002 Jun 15;73(11):1693-700. PubMed PMID: 12084988.

73. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. Clinical immunology. 2009 Jan;130(1):41-50. PubMed PMID: 18922742. Pubmed Central PMCID: 2646108.

74. Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. Nephron Experimental nephrology. 2008;109(4):e102-7. PubMed PMID: 18802372. Pubmed Central PMCID: 2614446.

75. Bryan CF, Luger AM, Martinez J, Muruve N, Nelson PW, Pierce GE, et al. Cold ischemia time: an independent predictor of increased HLA class I antibody production after rejection of a primary cadaveric renal allograft. Transplantation. 2001 Apr 15;71(7):875-9. PubMed PMID: 11349719.

76. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Gomperts BN, Xue YY, Hong K, et al. CXCR2/CXCR2 ligand biology during lung transplant ischemia-reperfusion injury. Journal of immunology. 2005 Nov 15;175(10):6931-9. PubMed PMID: 16272353.

77. Ibrahim S, Jacobs F, Zukin Y, Enriquez D, Holt D, Baldwin W, 3rd, et al. Immunohistochemical manifestations of unilateral kidney ischemia. Clinical transplantation. 1996 Dec;10(6 Pt 2):646-52. PubMed PMID: 8996759.

78. Waddell TK, Gorczynski RM, DeCampos KN, Patterson GA, Slutsky AS. Major histocompatibility complex expression and lung ischemia-reperfusion in rats. The Annals of thoracic surgery. 1996 Sep;62(3):866-72. PubMed PMID: 8784021.

79. Yamane M, Liu M, Kaneda H, Uhlig S, Waddell TK, Keshavjee S. Reperfusion-induced gene expression profiles in rat lung transplantation. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2005 Sep;5(9):2160-9. PubMed PMID: 16095495.

80. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. Kidney international. 2007 Apr;71(7):619-28. PubMed PMID: 17311071.

81. Kouwenhoven EA, de Bruin RW, Bajema IM, Marquet RL, Ijzermans JN. Cold ischemia augments allogeneic-mediated injury in rat kidney allografts. Kidney international. 2001 Mar;59(3):1142-8. PubMed PMID: 11231372.

82. Miranda B, Matesanz R. International issues in transplantation. Setting the scene and flagging the most urgent and controversial issues. Annals of the New York Academy of Sciences. 1998 Dec 30;862:129-43. PubMed PMID: 9928215.

83. UNOS. Annual report of the US Scientific Registry of Transplant Recipients and the Organ Procurement and Transplantation. 2006.

84. ABM. Rapport de l'Agence de la Biomédecine sur l'activité de prélèvement et de Greffe en France. 2012.

85. Lee CM, Scandling JD, Pavlakis M, Markezich AJ, Dafoe DC, Alfrey EJ. A review of the kidneys that nobody wanted: determinants of optimal outcome. Transplantation. 1998 Jan 27;65(2):213-9. PubMed PMID: 9458017.

86. Shapiro R, Vivas C, Scantlebury VP, Jordan ML, Gritsch HA, Neugarten J, et al. "Suboptimal" kidney donors: the experience with tacrolimus-based immunosuppression. Transplantation. 1996 Nov 15;62(9):1242-6. PubMed PMID: 8932264.

87. Alfrey EJ, Lee CM, Scandling JD, Pavlakis M, Markezich AJ, Dafoe DC. When should expanded criteria donor kidneys be used for single versus dual kidney transplants? Transplantation. 1997 Oct 27;64(8):1142-6. PubMed PMID: 9355831.

88. Koffman G, Gambaro G. Renal transplantation from non-heart- beating donors: a review of the European experience. J Nephrol. 2003 May-Jun;16(3):334-41. PubMed PMID: 12832731.

89. Peralta C, Serafin A, Fernandez-Zabalegui L, Wu ZY, Rosello-Catafau J. Liver ischemic preconditioning: a new strategy for the prevention of ischemia-reperfusion injury. Transplant Proc. 2003 Aug;35(5):1800-2. PubMed PMID: 12962800.

90. Berrevoet F, Schafer T, Vollmar B, Menger MD. Ischemic preconditioning: enough evidence to support clinical application in liver surgery and transplantation? Acta chirurgica Belgica. 2003 Oct;103(5):485-9. PubMed PMID: 14653033.

91. Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. Gastroenterology. 2003 Nov;125(5):1480-91. PubMed PMID: 14598265.

92. Ambros JT, Herrero-Fresneda I, Borau OG, Boira JM. Ischemic preconditioning in solid organ transplantation: from experimental to clinics. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2007 Mar;20(3):219-29. PubMed PMID: 17291215.

93. Wever KE, Warle MC, Wagener FA, van der Hoorn JW, Masereeuw R, van der Vliet JA, et al. Remote ischaemic preconditioning by brief hind limb ischaemia protects against renal ischaemia-reperfusion injury: the role of adenosine. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2011 Oct;26(10):3108-17. PubMed PMID: 21427077.

94. Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P, et al. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. Transplantation. 1998 Jul 27;66(2):152-7. PubMed PMID: 9701256.

95. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. Atherosclerosis. 2009 Jun;204(2):334-41. PubMed PMID: 19081095.

96. Chen X, Liu X, Wan X, Wu Y, Chen Y, Cao C. Ischemic preconditioning attenuates renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting activation of IKKbeta and inflammatory response. American journal of nephrology. 2009;30(3):287-94. PubMed PMID: 19546526.

97. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation. 1986 Nov;74(5):1124-36. PubMed PMID: 3769170.

98. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. Circulation. 1993 Mar;87(3):893-9. PubMed PMID: 7680290.

99. Pound P, Ebrahim S, Sandercock P, Bracken MB, Roberts I, Reviewing Animal Trials Systematically G. Where is the evidence that animal research benefits humans? Bmj. 2004 Feb 28;328(7438):514-7. PubMed PMID: 14988196. Pubmed Central PMCID: 351856.

100. van der Worp HB, Macleod MR, Kollmar R, European Stroke Research Network for H. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: ready to start large randomized trials? Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2010 Jun;30(6):1079-93. PubMed PMID: 20354545. Pubmed Central PMCID: 2949207.

101. van der Worp HB, Sena ES, Donnan GA, Howells DW, Macleod MR. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. Brain : a journal of neurology. 2007 Dec;130(Pt 12):3063-74. PubMed PMID: 17478443.

102. Wever KE, Menting TP, Rovers M, van der Vliet JA, Rongen GA, Masereeuw R, et al. Ischemic preconditioning in the animal kidney, a systematic review and meta-analysis. PloS one. 2012;7(2):e32296. PubMed PMID: 22389693. Pubmed Central PMCID: 3289650.

103. Eisner C, Faulhaber-Walter R, Wang Y, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mizel D, et al. Major contribution of tubular secretion to creatinine clearance in mice. Kidney international. 2010 Mar;77(6):519-26. PubMed PMID: 20032962. Pubmed Central PMCID: 3160625.

104. Waring WS, Moonie A. Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury. Clinical toxicology. 2011 Oct;49(8):720-8. PubMed PMID: 21970770.

105. Pitcher JM, Wang M, Tsai BM, Kher A, Turrentine MW, Brown JW, et al. Preconditioning: gender effects. The Journal of surgical research. 2005 Dec;129(2):202-20. PubMed PMID: 15936035.

106. Cochrane J, Williams BT, Banerjee A, Harken AH, Burke TJ, Cairns CB, et al. Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic, and morphologic injury from ischemic acute renal failure in the rat. Renal failure. 1999 Mar;21(2):135-45. PubMed PMID: 10088174.

107. Timsit MO, Gadet R, Ben Abdennebi H, Codas R, Petruzzo P, Badet L. Renal ischemic preconditioning improves recovery of kidney function and decreases alpha-smooth muscle actin expression in a rat model. The Journal of urology. 2008 Jul;180(1):388-91. PubMed PMID: 18499158.

108. Walsh SR, Tang TY, Kullar P, Jenkins DP, Dutka DP, Gaunt ME. Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of perioperative outcomes in randomised clinical trials. European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery. 2008 Nov;34(5):985-94. PubMed PMID: 18783958.

109. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraei SA, Akthar AM, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. Circulation. 2007 Sep 11;116(11 Suppl):I98-105. PubMed PMID: 17846333.

110. Walsh SR, Sadat U, Boyle JR, Tang TY, Lapsley M, Norden AG, et al. Remote ischemic preconditioning for renal protection during elective open infrarenal abdominal aortic aneurysm repair: randomized controlled trial. Vascular and endovascular surgery. 2010 Jul;44(5):334-40. PubMed PMID: 20484066.

111. Choi YS, Shim JK, Kim JC, Kang KS, Seo YH, Ahn KR, et al. Effect of remote ischemic preconditioning on renal dysfunction after complex valvular heart surgery: a randomized controlled trial. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 2011 Jul;142(1):148-54. PubMed PMID: 21272897.

112. Zimmerman RF, Ezeanuna PU, Kane JC, Cleland CD, Kempananjappa TJ, Lucas FL, et al. Ischemic preconditioning at a remote site prevents acute kidney injury in patients following cardiac surgery. Kidney international. 2011 Oct;80(8):861-7. PubMed PMID: 21677633.

113. Hausenloy DJ, Yellon DM. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. Nature reviews Cardiology. 2011 Nov;8(11):619-29. PubMed PMID: 21691310.

114. Safian RD, Textor SC. Renal-artery stenosis. The New England journal of medicine. 2001 Feb 8;344(6):431-42. PubMed PMID: 11172181.

115. Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. The New England journal of medicine. 2004 Jul 8;351(2):159-69. PubMed PMID: 15247356.

116. Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. Lancet. 1969 Dec 6;2(7632):1219-22. PubMed PMID: 4187813.

117. Collins GM, Bravo-Shugarman M, Novom S, Terasaki PI. Kidney preservation for transplantation. I. Twelve-hour storage in rabbits. Transplant Proc. 1969 Sep;1(3):801-7. PubMed PMID: 4939677.

118. Wahlberg JA, Love R, Landegaard L, Southard JH, Belzer FO. 72-hour preservation of the canine pancreas. Transplantation. 1987 Jan;43(1):5-8. PubMed PMID: 3541322.

119. Vreugdenhil PK, Marsh DC, Belzer FO, Southard JH. Urea and protein synthesis in cold-preserved isolated rat hepatocytes. Hepatology. 1992 Jul;16(1):241-6. PubMed PMID: 1618474.

120. Belzer FO. Evaluation of preservation of the intra-abdominal organs. Transplant Proc. 1993 Aug;25(4):2527-30. PubMed PMID: 8356655.

121. Todo S, Nery J, Yanaga K, Podesta L, Gordon RD, Starzl TE. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. JAMA : the journal of the American Medical Association. 1989 Feb 3;261(5):711-4. PubMed PMID: 2642982. Pubmed Central PMCID: 2954660.

122. Ploeg RJ, Goossens D, McAnulty JF, Southard JH, Belzer FO. Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution. Transplantation. 1988 Aug;46(2):191-6. PubMed PMID: 3043775.

123. Roels L, Coosemans W, Donck J, Maes B, Peeters J, Vanwalleghem J, et al. Inferior outcome of cadaveric kidneys preserved for more than 24 hr in histidine-tryptophan-ketoglutarate solution. Leuven Collaborative Group for

Transplantation. Transplantation. 1998 Dec 27;66(12):1660-4. PubMed PMID: 9884255.

124. Moukarzel M, Benoit G, Bensadoun H, Hiesse C, Richard C, Bittard H, et al. Nonrandomized comparative study between University of Wisconsin cold storage and Euro-Collins solution in kidney transplantation. Transplant Proc. 1990 Oct;22(5):2289-90. PubMed PMID: 2219372.

125. Ploeg RJ, van Bockel JH, Langendijk PT, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, et al. Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. The European Multicentre Study Group. Lancet. 1992 Jul 18;340(8812):129-37. PubMed PMID: 1352564.

126. Moen J, Claesson K, Pienaar H, Lindell S, Ploeg RJ, McAnulty JF, et al. Preservation of dog liver, kidney, and pancreas using the Belzer-UW solution with a high-sodium and low-potassium content. Transplantation. 1989 Jun;47(6):940-5. PubMed PMID: 2660354.

127. Lodge JP, Perry SL, Skinner C, Potts DJ, Giles GR. Improved porcine renal preservation with a simple extracellular solution--PBS140. Transplantation. 1991 Mar;51(3):574-9. PubMed PMID: 2006511.

128. Hauet T, Han Z, Doucet C, Ramella-Virieux S, Hadj Aissa A, Carretier M, et al. A modified University of Wisconsin preservation solution with high-NA+ low-K+ content reduces reperfusion injury of the pig kidney graft. Transplantation. 2003 Jul 15;76(1):18-27. PubMed PMID: 12865781.

129. Jamart J, Lambotte L. Efficiency and limitation of Euro-Collins solution in kidney preservation. The Journal of surgical research. 1983 Mar;34(3):195-204. PubMed PMID: 6834806.

130. Kallerhoff M, Blech M, Kehrer G, Kleinert H, Langheinrich M, Siekmann W, et al. Effects of glucose in protected ischemic kidneys. Urol Res. 1987;15(4):215-22. PubMed PMID: 3118545.

131. Legendre C, Thervet E, Page B, Percheron A, Noel LH, Kreis H. Hydroxyethylstarch and osmotic-nephrosis-like lesions in kidney transplantation. Lancet. 1993 Jul 24;342(8865):248-9. PubMed PMID: 7686994.

132. Legendre C, Atinault A. [Hydroxyethylstarch and osmotic nephrosis]. Annales francaises d'anesthesie et de reanimation. 1994;13(5):766-7. PubMed PMID: 7537479. Hydroxyethylamidon et nephrose osmotique.

133. Cittanova ML, Leblanc I, Legendre C, Mouquet C, Riou B, Coriat P. Effect of hydroxyethylstarch in brain-dead kidney donors on renal function in kidney-transplant recipients. Lancet. 1996 Dec 14;348(9042):1620-2. PubMed PMID: 8961992.

134. Codas R, Petruzzo P, Morelon E, Lefrancois N, Danjou F, Berthillot C, et al. IGL-1 solution in kidney transplantation: first multi-center study. Clinical transplantation. 2009 Jun-Jul;23(3):337-42. PubMed PMID: 19210685.

135. Thuillier R, Renard C, Rogel-Gaillard C, Demars J, Milan D, Forestier L, et al. Effect of polyethylene glycol-based preservation solutions on graft injury in experimental kidney transplantation. The British journal of surgery. 2011 Mar;98(3):368-78. PubMed PMID: 21254010.

136. Jamieson RW, Friend PJ. Organ reperfusion and preservation. Front Biosci. 2008;13:221-35. PubMed PMID: 17981540.

137. Salahudeen AK. Consequences of cold ischemic injury of kidneys in clinical transplantation. Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research. 2004 Jul;52(5):296-8. PubMed PMID: 15551651.

138. Auger S, Vallerand D, Haddad PS. Cold preservation-warm reperfusion perturbs cytosolic calcium ion homeostasis in rat liver sinusoidal endothelial cells. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2003 Feb;9(2):150-9. PubMed PMID: 12548509.

139. Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. Annu Rev Med. 1995;46:235-47. PubMed PMID: 7598460.

140. Southard JH. Advances in organ preservation. Transplant Proc. 1989 Feb;21(1 Pt 2):1195-6. PubMed PMID: 2652394.

141. Southard JH, Belzer FO. New concepts in organ preservation. Clinical transplantation. 1993 Feb;7(1 part 2):134-7. PubMed PMID: 10148369.

142. Badet L, Eugene M, Hauet T, Barrou B. [The use of preservation solutions in renal transplantation]. Prog Urol. 2006 Feb;16(1):25-31. PubMed PMID: 16526535. L'utilisation des liquides de conservation en transplantation renale.

143. Robinson JR. Control of water content of non-metabolizing kidney slices by sodium chloride and polyethylene glycol (PEG 6000). The Journal of physiology. 1971 Feb;213(1):227-34. PubMed PMID: 5575341. Pubmed Central PMCID: 1331733.

144. Robinson JR. Colloid osmotic pressure as a cause of pathological swelling of cells. Pathobiology of cell membranes. 1975;1:173-89.

145. Robinson JR. Control of water content of respiring kidney slices by sodium chloride and polyethylene glycol. The Journal of physiology. 1978 Sep;282:285-94. PubMed PMID: 722531. Pubmed Central PMCID: 1282739.

146. Daniel MR, Wakerley CL. Factors influencing the survival of cell monolayers during storage at 4 degrees. British journal of experimental pathology. 1976 Apr;57(2):137-47. PubMed PMID: 1268045. Pubmed Central PMCID: 2041113.

147. Baatard R, Pradier F, Dantal J, Karam G, Cantarovich D, Hourmant M, et al. Prospective randomized comparison of University of Wisconsin and UW-modified, lacking hydroxyethyl-starch, cold-storage solutions in kidney transplantation. Transplantation. 1993 Jan;55(1):31-5. PubMed PMID: 7678358.

148. Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, et al. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. The New England journal of medicine. 2008 Jan 10;358(2):125-39. PubMed PMID: 18184958.

149. Thomas G, Balk EM, Jaber BL. Effect of intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation on acute kidney injury in severe sepsis. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation. 2008 Jul;52(1):13-7. PubMed PMID: 18514991.

150. van der Plaats A, t Hart NA, Morariu AM, Verkerke GJ, Leuvenink HG, Ploeg RJ, et al. Effect of University of Wisconsin organ-preservation solution on haemorheology. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2004 Jun;17(5):227-33. PubMed PMID: 15146313.

151. Panzera P, Rotelli MT, Salerno AM, Cicco G, Catalano G, D'Elia G, et al. Solutions for organ perfusion and storage: haemorheologic aspects. Transplant Proc. 2005 Jul-Aug;37(6):2456-8. PubMed PMID: 16182707.

152. Ganote CE, Worstell J, Iannotti JP, Kaltenbach JP. Cellular swelling and irreversible myocardial injury. Effects of polyethylene glycol and mannitol in perfused rat hearts. The American journal of pathology. 1977 Jul;88(1):95-118. PubMed PMID: 879272. Pubmed Central PMCID: 2032164.

153. Giraud S, Claire B, Eugene M, Debre P, Richard F, Barrou B. A new preservation solution increases islet yield and reduces graft immunogenicity in pancreatic islet transplantation. Transplantation. 2007 May 27;83(10):1397-400. PubMed PMID: 17519794.

154. Eugene M. Polyethyleneglycols and immunocamouflage of the cells tissues and organs for transplantation. Cellular and molecular biology. 2004 May;50(3):209-15. PubMed PMID: 15209341.

155. Collins GM, Wicomb WN, Levin BS, Verma S, Avery J, Hill JD. Heart preservation solution containing polyethyleneglycol: an immunosuppressive effect? Lancet. 1991 Oct 5;338(8771):890-1. PubMed PMID: 1681247.

156. Wicomb WN, Hill JD, Avery J, Collins GM. Optimal cardioplegia and 24-hour heart storage with simplified UW solution containing polyethylene glycol. Transplantation. 1990 Feb;49(2):261-4. PubMed PMID: 2305454.

157. Wicomb WN, Wood J, Hill JD, Bry WI, Collins GM. Value of polyethylene glycol (PEG) and horseradish peroxidase (HRP) for hypothermic rabbit heart perfusion. Transplant Proc. 1989 Feb;21(1 Pt 2):1366-8. PubMed PMID: 2711437.

158. Tokunaga Y, Wicomb WN, Garcia-Kennedy R, Esquivel CO, Collins GM. The immunosuppressive effect of polyethylene glycol in a flush solution for rat

liver transplantation. Transplantation. 1992 Oct;54(4):756-8. PubMed PMID: 1412776.

159. Itasaka H, Burns W, Wicomb WN, Egawa H, Collins G, Esquivel CO. Modification of rejection by polyethylene glycol in small bowel transplantation. Transplantation. 1994 Mar 15;57(5):645-8. PubMed PMID: 8140625.

160. Zheng TL, Lanza RP, Soon-Shiong P. Prolonged pancreas preservation using a simplified UW solution containing polyethylene glycol. Transplantation. 1991 Jan;51(1):63-6. PubMed PMID: 1987707.

161. Lee DY, Nam JH, Byun Y. Effect of polyethylene glycol grafted onto islet capsules on prevention of splenocyte and cytokine attacks. Journal of biomaterials science Polymer edition. 2004;15(6):753-66. PubMed PMID: 15255524.

162. Scott MD, Chen AM. Beyond the red cell: pegylation of other blood cells and tissues. Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine. 2004 Feb;11(1):40-6. PubMed PMID: 14980548.

163. Hauet T, Goujon JM, Baumert H, Petit I, Carretier M, Eugene M, et al. Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotransplanted pig kidneys. Kidney international. 2002 Aug;62(2):654-67. PubMed PMID: 12110031.

164. Jayle C, Corbi P, Eugene M, Carretier M, Hebrard W, Menet E, et al. Beneficial effect of polyethylene glycol in lung preservation: early evaluation by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. The Annals of thoracic surgery. 2003 Sep;76(3):896-902. PubMed PMID: 12963225.

165. Jayle C, Hauet T, Menet E, Hebrard W, Hameury F, Eugene M, et al. Beneficial effects of polyethylene glycol combined with low-potassium solution against lung ischemia/reperfusion injury in an isolated, perfused, functional pig lung. Transplant Proc. 2002 May;34(3):834-5. PubMed PMID: 12034200.

166. Scott MD, Murad KL. Cellular camouflage: fooling the immune system with polymers. Current pharmaceutical design. 1998 Dec;4(6):423-38. PubMed PMID: 10197054.

167. Scott MD, Murad KL, Koumpouras F, Talbot M, Eaton JW. Chemical camouflage of antigenic determinants: stealth erythrocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997 Jul 8;94(14):7566-71. PubMed PMID: 9207132. Pubmed Central PMCID: 23862.

168. Scott MD, Bradley AJ, Murad KL. Camouflaged blood cells: low-technology bioengineering for transfusion medicine? Transfusion medicine reviews. 2000 Jan;14(1):53-63. PubMed PMID: 10669940.

169. Murad KL, Gosselin EJ, Eaton JW, Scott MD. Stealth cells: prevention of major histocompatibility complex class II-mediated T-cell activation by cell surface modification. Blood. 1999 Sep 15;94(6):2135-41. PubMed PMID: 10477744.

170. Murad KL, Mahany KL, Brugnara C, Kuypers FA, Eaton JW, Scott MD. Structural and functional consequences of antigenic modulation of red blood cells with methoxypoly(ethylene glycol). Blood. 1999 Mar 15;93(6):2121-7. PubMed PMID: 10068687.

171. Bradley AJ, Murad KL, Regan KL, Scott MD. Biophysical consequences of linker chemistry and polymer size on stealth erythrocytes: size does matter. Biochimica et biophysica acta. 2002 Apr 12;1561(2):147-58. PubMed PMID: 11997115.

172. de Boer J, De Meester J, Smits JM, Groenewoud AF, Bok A, van der Velde O, et al. Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 1999;12(6):447-53. PubMed PMID: 10654357.

173. Hrabalova M, Bachleda P, Lubuska L, Kojecky Z, Zadrazil J, Krejci K, et al. Effect of various protective solutions on function after kidney transplantation. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia. 2003 Dec;147(2):197-202. PubMed PMID: 15037904.

174. Marsh DC, Lindell SL, Fox LE, Belzer FO, Southard JH. Hypothermic preservation of hepatocytes. I. Role of cell swelling. Cryobiology. 1989 Dec;26(6):524-34. PubMed PMID: 2480865.

175. Stefanovich P, Ezzell RM, Sheehan SJ, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. Effects of hypothermia on the function, membrane integrity, and cytoskeletal structure of hepatocytes. Cryobiology. 1995 Aug;32(4):389-403. PubMed PMID: 7656572.

176. Dondero F, Paugam-Burtz C, Danjou F, Stocco J, Durand F, Belghiti J. A randomized study comparing IGL-1 to the University of Wisconsin preservation solution in liver transplantation. Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society. 2010 Oct-Dec;15(4):7-14. PubMed PMID: 21183870.

177. Badet L, Ben Abdennebi H, Petruzzo P, McGregor B, Espa M, Hadj-Aissa A, et al. Effect of IGL-1, a new preservation solution, on kidney grafts (a pre-clinical study). Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2005 May;17(12):815-21. PubMed PMID: 15856175.

178. Badet L, Abdennebi HB, Petruzzo P, McGregor B, Espa M, Hadj-Aissa A, et al. [Evaluation of IGL-1, a new organ preservation solution: preclinical results in renal transplantation]. Prog Urol. 2005 Jun;15(3):481-8; discussion 7. PubMed PMID: 16097154. Evaluation de IGL-1, une nouvelle solution de conservation d'organes: resultats pre-cliniques en transplantation renale.

179. Dragun D, Hoff U, Park JK, Qun Y, Schneider W, Luft FC, et al. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background. Kidney international. 2000 Nov;58(5):2166-77. PubMed PMID: 11044238.

180. Gibelin H, Hauet T, Eugene M, Essique D, Levillain P, Carretier M. Beneficial effects of addition of polyethylene glycol to extracellular type solutions to minimize ischemia/reperfusion injuries in an isolated-perfused rat liver model. Transplant Proc. 2002 May;34(3):768. PubMed PMID: 12034176.

181. van der Hoeven JA, de Jong LJ, Wolf RF, Kamman RL, Ploeg RJ. Tissue hydration in kidneys during preservation: a relaxometric analysis of time-dependent differences between cortex and medulla. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 1996;9 Suppl 1:S452-4. PubMed PMID: 8959884.

182. Ben Abdennebi H, Steghens JP, Margonari J, Ramella-Virieux S, Barbieux A, Boillot O. High-Na+ low-K+ UW cold storage solution reduces reperfusion injuries of the rat liver graft. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 1998;11(3):223-30. PubMed PMID: 9638853.

183. Ben Mosbah I, Rosello-Catafau J, Franco-Gou R, Abdennebi HB, Saidane D, Ramella-Virieux S, et al. Preservation of steatotic livers in IGL-1 solution. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2006 Aug;12(8):1215-23. PubMed PMID: 16724331.

184. Devauchelle B, Badet L, Lengele B, Morelon E, Testelin S, Michallet M, et al. First human face allograft: early report. Lancet. 2006 Jul 15;368(9531):203-9. PubMed PMID: 16844489.

185. Niclauss N, Wojtusciszyn A, Morel P, Demuylder-Mischler S, Brault C, Parnaud G, et al. Comparative impact on islet isolation and transplant outcome of the preservation solutions Institut Georges Lopez-1, University of Wisconsin, and Celsior. Transplantation. 2012 Apr 15;93(7):703-8. PubMed PMID: 22343333.

186. Perrin H, Thaunat O, Malcus C, Badet L, Hennino A, Codas R, et al. Immunoprotection by polyethylene glycol in organ preservation solutions is not due to an immunomasking effect. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2009 May;24(5):1682-5. PubMed PMID: 19225010.

187. Thuillier R, Giraud S, Favreau F, Goujon JM, Desurmont T, Eugene M, et al. Improving long-term outcome in allograft transplantation: role of ionic composition and polyethylene glycol. Transplantation. 2011 Mar 27;91(6):605-14. PubMed PMID: 21317838.

188. Billault C, Vaessen C, Van Glabeke E, Rolland E, Ourahma S, Dimitru L, et al. Use of the SCOT solution in kidney transplantation: preliminary report. Transplant Proc. 2006 Sep;38(7):2281-2. PubMed PMID: 16980064.

189. Belzer FO, Southard JH. The future of kidney preservation. Transplantation. 1980 Sep;30(3):161-5. PubMed PMID: 14582169.

190. Opelz G, Terasaki PI. Advantage of cold storage over machine perfusion for preservation of cadaver kidneys. Transplantation. 1982 Jan;33(1):64-8. PubMed PMID: 7039024.

191. Stratta RJ, Moore PS, Farney AC, Rogers J, Hartmann EL, Reeves-Daniel A, et al. Influence of pulsatile perfusion preservation on outcomes in kidney transplantation from expanded criteria donors. Journal of the American College of Surgeons. 2007 May;204(5):873-82; discussion 82-4. PubMed PMID: 17481502.

192. Schold JD, Kaplan B, Howard RJ, Reed AI, Foley DP, Meier-Kriesche HU. Are we frozen in time? Analysis of the utilization and efficacy of pulsatile perfusion in renal transplantation. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2005 Jul;5(7):1681-8. PubMed PMID: 15943626.

193. Matsuoka L, Shah T, Aswad S, Bunnapradist S, Cho Y, Mendez RG, et al. Pulsatile perfusion reduces the incidence of delayed graft function in expanded criteria donor kidney transplantation. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2006 Jun;6(6):1473-8. PubMed PMID: 16686773.

194. Polyak MM, Arrington BO, Stubenbord WT, Boykin J, Brown T, Jean-Jacques MA, et al. The influence of pulsatile preservation on renal transplantation in the 1990s. Transplantation. 2000 Jan 27;69(2):249-58. PubMed PMID: 10670635.

195. Halloran P, Aprile M. A randomized prospective trial of cold storage versus pulsatile perfusion for cadaver kidney preservation. Transplantation. 1987 Jun;43(6):827-32. PubMed PMID: 3590300.

196. Sellers MT, Gallichio MH, Hudson SL, Young CJ, Bynon JS, Eckhoff DE, et al. Improved outcomes in cadaveric renal allografts with pulsatile preservation. Clinical transplantation. 2000 Dec;14(6):543-9. PubMed PMID: 11127306.

197. Kwiatkowski A, Wszola M, Kosieradzki M, Danielewicz R, Ostrowski K, Domagala P, et al. Machine perfusion preservation improves renal allograft survival.

American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2007 Aug;7(8):1942-7. PubMed PMID: 17617857.

198. Moers C, Smits JM, Maathuis MH, Treckmann J, van Gelder F, Napieralski BP, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. The New England journal of medicine. 2009 Jan 1;360(1):7-19. PubMed PMID: 19118301.

199. Moers C, Pirenne J, Paul A, Ploeg RJ, Machine Preservation Trial Study G. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. The New England journal of medicine. 2012 Feb 23;366(8):770-1. PubMed PMID: 22356343.

200. Gallinat A, Moers C, Smits JM, Strelniece A, Pirenne J, Ploeg RJ, et al. Machine perfusion versus static cold storage in expanded criteria donor kidney transplantation: 3-year follow-up data. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2013 Jun;26(6):E52-3. PubMed PMID: 23551232.

201. 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 Jan;109(1):141-7. PubMed PMID: 21851541.

202. Jochmans I, Moers C, Smits JM, Leuvenink HG, Treckmann J, Paul A, et al. Machine perfusion versus cold storage for the preservation of kidneys donated after cardiac death: a multicenter, randomized, controlled trial. Ann Surg. 2010 Nov;252(5):756-64. PubMed PMID: 21037431.

203. Hetzel GR, Klein B, Brause M, Westhoff A, Willers R, Sandmann W, et al. Risk factors for delayed graft function after renal transplantation and their significance for long-term clinical outcome. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2002 Jan;15(1):10-6. PubMed PMID: 11875607.

204. Halloran PF, Hunsicker LG. Delayed graft function: state of the art, November 10-11, 2000. Summit meeting, Scottsdale, Arizona, USA. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2001 Jul;1(2):115-20. PubMed PMID: 12099358.

205. Mikhalski D, Wissing KM, Ghisdal L, Broeders N, Touly M, Hoang AD, et al. Cold ischemia is a major determinant of acute rejection and renal graft survival in the modern era of immunosuppression. Transplantation. 2008 Apr 15;85(7 Suppl):S3-9. PubMed PMID: 18401260.

206. Boom H, Mallat MJ, de Fijter JW, Zwinderman AH, Paul LC. Delayed graft function influences renal function, but not survival. Kidney international. 2000 Aug;58(2):859-66. PubMed PMID: 10916111.

207. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Jr., Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2009 Mar;24(3):1039-47. PubMed PMID: 19103734.

208. Ciancio G, Gaynor JJ, Sageshima J, Roth D, Kupin W, Guerra G, et al. Machine perfusion following static cold storage preservation in kidney transplantation: donor-matched pair analysis of the prognostic impact of longer pump time. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2012 Jan;25(1):34-40. PubMed PMID: 21981661.

209. Lauschke H, Olschewski P, Tolba R, Schulz S, Minor T. Oxygenated machine perfusion mitigates surface antigen expression and improves preservation of predamaged donor livers. Cryobiology. 2003 Feb;46(1):53-60. PubMed PMID: 12623028.

210. Watson CJ, Wells AC, Roberts RJ, Akoh JA, Friend PJ, Akyol M, et al. Cold machine perfusion versus static cold storage of kidneys donated after cardiac death: a UK multicenter randomized controlled trial. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the

American Society of Transplant Surgeons. 2010 Sep;10(9):1991-9. PubMed PMID: 20883534.

211. Danielewicz R, Kwiatkowski A, Polak W, Kosieradzki M, Michalak G, Wegrowicz I, et al. An assessment of ischemic injury of the kidney for transplantation during machine pulsatile preservation. Transplant Proc. 1997 Dec;29(8):3580-1. PubMed PMID: 9414845.

212. Jochmans I, Moers C, Smits JM, Leuvenink HG, Treckmann J, Paul A, et al. The prognostic value of renal resistance during hypothermic machine perfusion of deceased donor kidneys. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2011 Oct;11(10):2214-20. PubMed PMID: 21834917.

213. Minor T, Manekeller S, Sioutis M, Dombrowski F. Endoplasmic and vascular surface activation during organ preservation: refining upon the benefits of machine perfusion. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2006 Jun;6(6):1355-66. PubMed PMID: 16686759.

214. t Hart NA, van der Plaats A, Leuvenink HG, van Goor H, Wiersema-Buist J, Verkerke GJ, et al. Hypothermic machine perfusion of the liver and the critical balance between perfusion pressures and endothelial injury. Transplant Proc. 2005 Jan-Feb;37(1):332-4. PubMed PMID: 15808634.

215. Maathuis MH, Manekeller S, van der Plaats A, Leuvenink HG, t Hart NA, Lier AB, et al. Improved kidney graft function after preservation using a novel hypothermic machine perfusion device. Ann Surg. 2007 Dec;246(6):982-8; discussion 9-91. PubMed PMID: 18043100.

216. Kosieradzki M, Danielewicz R, Kwiatkowski A, Polak WP, Wszola M, Fesolowicz S, et al. Early function of kidneys stored by continuous hypothermic pulsatile perfusion can be predicted using a new "viability index". Transplant Proc. 2002 Mar;34(2):541-3. PubMed PMID: 12009616.

217. Light J. Viability testing in the non-heart-beating donor. Transplant Proc. 2000 Feb;32(1):179-81. PubMed PMID: 10701014.

218. Matsuno N, Sakurai E, Uchiyama M, Kozaki K, Miyamoto K, Kozaki M, et al. Role of machine perfusion preservation in kidney transplantation from non-heartbeating donors. Clinical transplantation. 1998 Feb;12(1):1-4. PubMed PMID: 9541415.

219. Matsuno N, Kozaki K, Degawa H, Narumi Y, Suzuki N, Kikuchi K, et al. A useful predictor in machine perfusion preservation for kidney transplantation from non-heart-beating donors. Transplant Proc. 2000 Feb;32(1):173-4. PubMed PMID: 10701011.

220. Tesi RJ, Elkhammas EA, Davies EA, Henry ML, Ferguson RM. Pulsatile kidney perfusion for evaluation of high-risk kidney donors safely expands the donor pool. Clinical transplantation. 1994 Apr;8(2 Pt 1):134-8. PubMed PMID: 8019023.

221. Matsuno N, Konno O, Mejit A, Jyojima Y, Akashi I, Nakamura Y, et al. Application of machine perfusion preservation as a viability test for marginal kidney graft. Transplantation. 2006 Dec 15;82(11):1425-8. PubMed PMID: 17164712.

222. Hanf W, Petruzzo P, Meas-Yedid V, Berthiller J, Martin X, Morelon E, et al. Dual kidney transplantation from uncontrolled deceased donors after cardiac arrest: A possible option. International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association. 2013 Aug 15. PubMed PMID: 23944687.

223. 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(25):1-94. PubMed PMID: 14499050.

224. Talbot D, Shenton BK, Buckley PE, Gok MA. Experiences learned in the successful establishment of a nonheart beating donor program for renal transplantation. The Journal of urology. 2003 Oct;170(4 Pt 1):1088-92. PubMed PMID: 14501698.

225. Navarro AP, Sohrabi S, Wyrley-Birch H, Vijayanand D, Wilson C, Sanni A, et al. Dual renal transplantation for kidneys from marginal non-heart-beating donors. Transplant Proc. 2006 Oct;38(8):2633-4. PubMed PMID: 17098022.

226. Asher J, Wilson C, Gok M, Shenton BK, Stamp S, Wong YT, et al. Transplantation from non heart beating donors in Newcastle upon Tyne. Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society. 2004;9(1):59-61. PubMed PMID: 15478894.

227. Moers C, Varnav OC, van Heurn E, Jochmans I, Kirste GR, Rahmel A, et al. The value of machine perfusion perfusate biomarkers for predicting kidney transplant outcome. Transplantation. 2010 Nov 15;90(9):966-73. PubMed PMID: 20861807.

228. Brook NR, Waller JR, Nicholson ML. Nonheart-beating kidney donation: current practice and future developments. Kidney international. 2003 Apr;63(4):1516-29. PubMed PMID: 12631369.

229. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Jiang R, Zatta AJ. Myocardial protection in reperfusion with postconditioning. Expert review of cardiovascular therapy. 2005 Nov;3(6):1035-45. PubMed PMID: 16292995.

230. Szwarc I, Soullier S, Gayrard N, Mejean C, Mourad G, Argiles A. Ischemic postconditioning prevents ischemic acute renal failure. Transplant Proc. 2007 Oct;39(8):2554-6. PubMed PMID: 17954171.

231. Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after renal ischemia/reperfusion injury in rat. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2008 Apr;21(4):364-71. PubMed PMID: 18069925.

232. Eldaif SM, Deneve JA, Wang NP, Jiang R, Mosunjac M, Mutrie CJ, et al. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury by postconditioning involves adenosine receptor and protein kinase C activation. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2010 Feb;23(2):217-26. PubMed PMID: 19725910.

233. Liu X, Chen H, Zhan B, Xing B, Zhou J, Zhu H, et al. Attenuation of reperfusion injury by renal ischemic postconditioning: the role of NO. Biochemical and biophysical research communications. 2007 Aug 3;359(3):628-34. PubMed PMID: 17548062.

234. Serviddio G, Romano AD, Gesualdo L, Tamborra R, Di Palma AM, Rollo T, et al. Postconditioning is an effective strategy to reduce renal ischaemia/reperfusion injury. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2008 May;23(5):1504-12. PubMed PMID: 18285396.

235. Yun Y, Duan WG, Chen P, Wu HX, Shen ZQ, Qian ZY, et al. Ischemic postconditioning modified renal oxidative stress and lipid peroxidation caused by ischemic reperfusion injury in rats. Transplant Proc. 2009 Nov;41(9):3597-602. PubMed PMID: 19917351.

236. Yun Y, Duan WG, Chen P, Wu HX, Shen ZQ, Qian ZY, et al. Down-regulation of cyclooxygenase-2 is involved in ischemic postconditioning protection against renal ischemia reperfusion injury in rats. Transplant Proc. 2009 Nov;41(9):3585-9. PubMed PMID: 19917349.

237. Wang W, Tang T, Zhang P, Bu H. Postconditioning attenuates renal ischemia-reperfusion injury by preventing DAF down-regulation. The Journal of urology. 2010 Jun;183(6):2424-31. PubMed PMID: 20403613.

238. Zhang WL, Zhao YL, Liu XM, Chen J, Zhang D. Protective role of mitochondrial K-ATP channel and mitochondrial membrane transport pore in rat kidney ischemic postconditioning. Chinese medical journal. 2011 Jul;124(14):2191-5. PubMed PMID: 21933625.

239. Miklos Z, Kurthy M, Degrell P, Ranczinger E, Vida M, Lantos J, et al. Ischaemic postconditioning reduces serum and tubular TNF-alpha expression in ischaemic-reperfused kidney in healthy rats. Clinical hemorheology and microcirculation. 2012;50(3):167-78. PubMed PMID: 22240351.

240. Weng X, Shen H, Kuang Y, Liu X, Chen Z, Zhu H, et al. Ischemic postconditioning inhibits the renal fibrosis induced by ischemia-reperfusion injury in rats. Urology. 2012 Aug;80(2):484 e1-7. PubMed PMID: 22578919.

241. Jiang B, Liu X, Chen H, Liu D, Kuang Y, Xing B, et al. Ischemic postconditioning attenuates renal ischemic/reperfusion injury in mongrel dogs. Urology. 2010 Dec;76(6):1519 e1-7. PubMed PMID: 20970171.

242. Jiang B, Chen Q, Liu X, Kong D, Kuang Y, Weng X, et al. Ischemic postconditioning protects renal function after 24 hours of cold preservation in a canine autotransplantation model. Transplant Proc. 2012 Jul-Aug;44(6):1776-81. PubMed PMID: 22841271.

243. Kennedy SE, Erlich JH. Murine renal ischaemia-reperfusion injury. Nephrology. 2008 Oct;13(5):390-6. PubMed PMID: 18844833.

244. Kaur S, Jaggi AS, Singh N. Molecular aspects of ischaemic postconditioning. Fundamental & clinical pharmacology. 2009 Oct;23(5):521-36. PubMed PMID: 19674116.

245. Penna C, Mancardi D, Raimondo S, Geuna S, Pagliaro P. The paradigm of postconditioning to protect the heart. Journal of cellular and molecular medicine. 2008 Apr;12(2):435-58. PubMed PMID: 18182064.

246. Dal Ponte C, Alchera E, Follenzi A, Imarisio C, Prat M, Albano E, et al. Pharmacological postconditioning protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2011 Apr;17(4):474-82. PubMed PMID: 21445931.

247. Sindhu RK, Ehdaie A, Farmand F, Dhaliwal KK, Nguyen T, Zhan CD, et al. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. Biochimica et biophysica acta. 2005 Mar 22;1743(1-2):86-92. PubMed PMID: 15777843.

248. Kim J, Kil IS, Seok YM, Yang ES, Kim DK, Lim DG, et al. Orchiectomy attenuates post-ischemic oxidative stress and ischemia/reperfusion injury in mice. A role for manganese superoxide dismutase. The Journal of biological chemistry. 2006 Jul 21;281(29):20349-56. PubMed PMID: 16682413.

249. Gauthaman KK, Saleem MT, Thanislas PT, Prabhu VV, Krishnamoorthy KK, Devaraj NS, et al. Cardioprotective effect of the Hibiscus rosa sinensis flowers in an oxidative stress model of myocardial ischemic reperfusion injury in rat. BMC complementary and alternative medicine. 2006;6:32. PubMed PMID: 16987414. Pubmed Central PMCID: 1592511.

250. Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. Current opinion in nephrology and hypertension. 2002 May;11(3):301-8. PubMed PMID: 11981260.

251. Daemen MA, van 't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs TG, Clauss M, et al. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. The Journal of clinical investigation. 1999 Sep;104(5):541-9. PubMed PMID: 10487768. Pubmed Central PMCID: 408540.

252. Hausenloy DJ, Ong SB, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. Basic research in cardiology. 2009 Mar;104(2):189-202. PubMed PMID: 19242644.

253. Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ. Mitochondrial ATP-sensitive K+ channels prevent oxidative stress, permeability transition and cell death. Journal of bioenergetics and biomembranes. 2005 Apr;37(2):75-82. PubMed PMID: 15906152.

254. Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. Circulation research. 1992 Feb;70(2):223-33. PubMed PMID: 1310443.

255. Auchampach JA, Grover GJ, Gross GJ. Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. Cardiovascular research. 1992 Nov;26(11):1054-62. PubMed PMID: 1291082.

256. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. The Journal of biological chemistry. 1998 Jul 17;273(29):18092-8. PubMed PMID: 9660766.

257. Collino M, Benetti E, Miglio G, Castiglia S, Rosa AC, Aragno M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonism protects the kidney against ischemia/reperfusion injury in diabetic rats. Free radical biology & medicine. 2011 Jan 15;50(2):345-53. PubMed PMID: 21047550.

258. Greene EL, Paller MS. Calcium and free radicals in hypoxia/reoxygenation injury of renal epithelial cells. The American journal of physiology. 1994 Jan;266(1 Pt 2):F13-20. PubMed PMID: 8304479.

259. Matsuyama M, Yoshimura R, Hase T, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. Study of cyclooxygenase-2 in renal ischemia-reperfusion injury. Transplant Proc. 2005 Jan-Feb;37(1):370-2. PubMed PMID: 15808647.

260. Feitoza CQ, Camara NO, Pinheiro HS, Goncalves GM, Cenedeze MA, Pacheco-Silva A, et al. Cyclooxygenase 1 and/or 2 blockade ameliorates the renal tissue damage triggered by ischemia and reperfusion injury. International immunopharmacology. 2005 Jan;5(1):79-84. PubMed PMID: 15589463.

261. Bonventre JV. Complement and renal ischemia-reperfusion injury. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation. 2001 Aug;38(2):430-6. PubMed PMID: 11479175.

262. van den Akker EK, Manintveld OC, Hesselink DA, de Bruin RW, Ijzermans JN, Dor FJ. Protection Against Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Ischemic Postconditioning. Transplantation. 2013 Jun 15;95(11):1299-305. PubMed PMID: 23519023.

263. Manintveld OC, Te Lintel Hekkert M, van den Bos EJ, Suurenbroek GM, Dekkers DH, Verdouw PD, et al. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2007 Mar;292(3):H1551-60. PubMed PMID: 17122197.

264. Dixsant G, Kervasdoue J. Evaluation économique de la transplantation rénale en France. In: Herve, Rifle, eds. Recherche en Transplantation et Greffes de Tissus. 1994.

265. Schaubel D, Desmeules M, Mao Y, Jeffery J, Fenton S. Survival experience among elderly end-stage renal disease patients. A controlled comparison of transplantation and dialysis. Transplantation. 1995 Dec 27;60(12):1389-94. PubMed PMID: 8545862.

266. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting

transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. The New England journal of medicine. 1999 Dec 2;341(23):1725-30. PubMed PMID: 10580071.

267. Rosengard BR, Feng S, Alfrey EJ, Zaroff JG, Emond JC, Henry ML, et al. Report of the Crystal City meeting to maximize the use of organs recovered from the cadaver donor. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2002 Sep;2(8):701-11. PubMed PMID: 12243491.

268. Gonzalez-Segura C, Castelao AM, Torras J, Moreso F, Riera L, Lopez-Costea MA, et al. A good alternative to reduce the kidney shortage: kidneys from nonheartbeating donors. Transplantation. 1998 Jun 15;65(11):1465-70. PubMed PMID: 9645804.

269. Wijnen RM, Booster MH, Stubenitsky BM, de Boer J, Heineman E, Kootstra G. Outcome of transplantation of non-heart-beating donor kidneys. Lancet. 1995 Apr 29;345(8957):1067-70. PubMed PMID: 7715337.

270. Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP. Categories of non-heart-beating donors. Transplant Proc. 1995 Oct;27(5):2893-4. PubMed PMID: 7482956.

271. Suntharalingam C, Sharples L, Dudley C, Bradley JA, Watson CJ. Time to cardiac death after withdrawal of life-sustaining treatment in potential organ donors. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2009 Sep;9(9):2157-65. PubMed PMID: 19681825.

272. Hanf W, Codas R, Meas-Yedid V, Berthiller J, Buron F, Chauvet C, et al. Kidney graft outcome and quality (after transplantation) from uncontrolled deceased donors after cardiac arrest. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2012 Jun;12(6):1541-50. PubMed PMID: 22390302.

273. Balupuri S, Buckley P, Mohamad M, Chidambaram V, Gerstenkorn C, Sen B, et al. Early results of a non-heartbeating donor (NHBD) programme with machine perfusion. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2000;13 Suppl 1:S255-8. PubMed PMID: 11112007.

274. Balupuri S, Buckley P, Snowden C, Mustafa M, Sen B, Griffiths P, et al. The trouble with kidneys derived from the non heart-beating donor: a single center 10-year experience. Transplantation. 2000 Mar 15;69(5):842-6. PubMed PMID: 10755537.

275. Sanchez-Fructuoso AI, Marques M, Prats D, Conesa J, Calvo N, Perez-Contin MJ, et al. Victims of cardiac arrest occurring outside the hospital: a source of transplantable kidneys. Ann Intern Med. 2006 Aug 1;145(3):157-64. PubMed PMID: 16880457.

276. Wight JP, Chilcott JB, Holmes MW, Brewer N. Pulsatile machine perfusion vs. cold storage of kidneys for transplantation: a rapid and systematic review. Clinical transplantation. 2003 Aug;17(4):293-307. PubMed PMID: 12868986.

277. Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2003;3 Suppl 4:114-25. PubMed PMID: 12694055.

278. UNOS, Policy, 3.5.1. Expended criteria definition and point system. Richmond,VA: United Network for Organ Sharing. 2002.

279. Fuller BJ, Lee CY. Hypothermic perfusion preservation: the future of organ preservation revisited? Cryobiology. 2007 Apr;54(2):129-45. PubMed PMID: 17362905.

280. Mitchell T, Saba H, Laakman J, Parajuli N, MacMillan-Crow LA. Role of mitochondrial-derived oxidants in renal tubular cell cold-storage injury. Free radical biology & medicine. 2010 Nov 1;49(8):1273-82. PubMed PMID: 20659553. Pubmed Central PMCID: 3688469.

281. Fondevila C, Hessheimer AJ, Maathuis MH, Munoz J, Taura P, Calatayud D, et al. Hypothermic oxygenated machine perfusion in porcine donation after circulatory determination of death liver transplant. Transplantation. 2012 Jul 15;94(1):22-9. PubMed PMID: 22691959.

282. t Hart NA, van der Plaats A, Faber A, Leuvenink HG, Olinga P, Wiersema-Buist J, et al. Oxygenation during hypothermic rat liver preservation: an in vitro slice study to demonstrate beneficial or toxic oxygenation effects. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2005 Nov;11(11):1403-11. PubMed PMID: 16237692.

283. Hosgood SA, Nicholson HF, Nicholson ML. Oxygenated kidney preservation techniques. Transplantation. 2012 Mar 15;93(5):455-9. PubMed PMID: 22217529.

284. Thuillier R, Allain G, Celhay O, Hebrard W, Barrou B, Badet L, et al. Benefits of active oxygenation during hypothermic machine perfusion of kidneys in a preclinical model of deceased after cardiac death donors. The Journal of surgical research. 2013 May 21. PubMed PMID: 23731682.

285. Gallinat A, Paul A, Efferz P, Luer B, Swoboda S, Hoyer D, et al. Role of oxygenation in hypothermic machine perfusion of kidneys from heart beating donors. Transplantation. 2012 Oct 27;94(8):809-13. PubMed PMID: 22992766.

286. Thuillier R, Dutheil D, Trieu MT, Mallet V, Allain G, Rousselot M, et al. Supplementation with a new therapeutic oxygen carrier reduces chronic fibrosis and organ dysfunction in kidney static preservation. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2011 Sep;11(9):1845-60. PubMed PMID: 21875432.

287. Vaziri N, Thuillier R, Favreau FD, Eugene M, Milin S, Chatauret NP, et al. Analysis of machine perfusion benefits in kidney grafts: a preclinical study. Journal of translational medicine. 2011;9:15. PubMed PMID: 21266040. Pubmed Central PMCID: 3038164.

288. Thuillier R, Codas R, Marchand E, Lathelize H, Page O, Valagier A, et al. Chronic renoprotective effect of pulsatile perfusion machine RM3 and IGL-1 solution in a preclinical kidney transplantation model. Journal of translational medicine. 2012;10:233. PubMed PMID: 23171422. Pubmed Central PMCID: 3543357.

289. Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 1998 May;18(5):677-85. PubMed PMID: 9598824.

290. Gattone VH, 2nd, Filo RS, Evan AP, Leapman SB, Smith EJ, Luft FC. Time course of glomerular endothelial injury related to pulsatile perfusion preservation. Transplantation. 1985 Apr;39(4):396-9. PubMed PMID: 3885490.

291. Kamm RD. Cellular fluid mechanics. Annual review of fluid mechanics. 2002;34:211-32. PubMed PMID: 12741392.

292. Ross RS, Borg TK. Integrins and the myocardium. Circulation research. 2001 Jun 8;88(11):1112-9. PubMed PMID: 11397776.

293. 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. PubMed PMID: 21403881. Pubmed Central PMCID: 3051176.

294. Nicholson ML, Hosgood SA, Metcalfe MS, Waller JR, Brook NR. A comparison of renal preservation by cold storage and machine perfusion using a porcine autotransplant model. Transplantation. 2004 Aug 15;78(3):333-7. PubMed PMID: 15316359.

295. Dalmose AL, Hvistendahl JJ, Olsen LH, Eskild-Jensen A, Djurhuus JC, Swindle MM. Surgically induced urologic models in swine. Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research. 2000 May-Jun;13(3):133-45. PubMed PMID: 10933109.

296. Douglas WR. Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, sus scrofa, in human medical research. Space life sciences. 1972 Jun;3(3):226-34. PubMed PMID: 4556756.

297. Goujon JM, Hauet T, Menet E, Levillain P, Babin P, Carretier M. Histological evaluation of proximal tubule cell injury in isolated perfused pig kidneys exposed to cold ischemia. The Journal of surgical research. 1999 Apr;82(2):228-33. PubMed PMID: 10090834.

298. Grimm PC, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Stern E, Jeffery J, et al. Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. J Am Soc Nephrol. 2003 Jun;14(6):1662-8. PubMed PMID: 12761269.

299. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609.

300. Hauet T, Goujon JM, Vandewalle A, Baumert H, Lacoste L, Tillement JP, et al. Trimetazidine reduces renal dysfunction by limiting the cold ischemia/reperfusion injury in autotransplanted pig kidneys. J Am Soc Nephrol. 2000 Jan;11(1):138-48. PubMed PMID: 10616850.

301. Hauet T, Baumert H, Amor IB, Gibelin H, Tallineau C, Eugene M, et al. Pharmacological limitation of damage to renal medulla after cold storage and transplantation by trimetazidine. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2000 Jan;292(1):254-60. PubMed PMID: 10604955.

302. Yuan X, Theruvath AJ, Ge X, Floerchinger B, Jurisch A, Garcia-Cardena G, et al. Machine perfusion or cold storage in organ transplantation: indication, mechanisms, and future perspectives. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2010 Jun;23(6):561-70. PubMed PMID: 20074082.

303. Faure JP, Petit I, Zhang K, Dutheil D, Doucet C, Favreau F, et al. Protective roles of polyethylene glycol and trimetazidine against cold ischemia and reperfusion injuries of pig kidney graft. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2004 Apr;4(4):495-504. PubMed PMID: 15023141.

304. Morariu AM, Vd Plaats A, W VO, NA TH, Leuvenink HG, Graaff R, et al. Hyperaggregating effect of hydroxyethyl starch components and University of Wisconsin solution on human red blood cells: a risk of impaired graft perfusion in organ procurement? Transplantation. 2003 Jul 15;76(1):37-43. PubMed PMID: 12865783.

305. Mosbah IB, Franco-Gou R, Abdennebi HB, Hernandez R, Escolar G, Saidane D, et al. Effects of polyethylene glycol and hydroxyethyl starch in University of Wisconsin preservation solution on human red blood cell aggregation and viscosity. Transplant Proc. 2006 Jun;38(5):1229-35. PubMed PMID: 16797270.

306. Burns WC, Kantharidis P, Thomas MC. The role of tubular epithelial-mesenchymal transition in progressive kidney disease. Cells Tissues Organs. 2007;185(1-3):222-31. PubMed PMID: 17587828.

307. Cheng O, Thuillier R, Sampson E, Schultz G, Ruiz P, Zhang X, et al. Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2006 Oct;6(10):2292-306. PubMed PMID: 16889607.

11. Annexes

Composition des solutions utilisées:

IGL-1

Lactobionic acid	100 mmol/L	35,8 g/L
Adenosine	5 mmol/L	1,336 g/L
Allopurinol	1 mmol/L	0,136 g/L
Total Glutathione	3 mmol/L	0,922 g/L
PEG 35000	0,03 mmol/L	1 g/L
Potassium Phosphate monobasic	25 mmol/L	3,402 g/L
Raffinose pentahydrate	30 mmol/L	17,84 g/L
Magnesium Sulfate heptahydrate	5 mmol/L	1,232 g/L
Sodium Hyroxide 2 N	Adjust to pH 7,4	
Water for injection	QSP 1 Litre	

Belzer-MPS

Sodium Gluconate	79,994 mmol/L	17,45 g/L
Adenine	5,032 mmol/L	0,68 g/L
Potassium Phosphate	24,983 mmol/L	3,4 g/L
Hydroxyethyl Starch	0,222 mmol/L	50 g/L
Magnesium Gluconate	5,451 mmol/L	1,13 g/L
HEPES	9,987 mmol/L	2,38 g/L
Glucose	9,989 mmol/L	1,80 g/L
Glutathione (reduced form)	2,994 mmol/L	0,92 g/L
Ribose	4,997 mmol/L	0,75 g/L
Calcium Chloride	0,463 mmol/L	0,068 g/L
Mannitol	29,643 mmol/L	5,4 g/L
Sodium Hyroxide 5 N	Adjust to pH 7,4	
Water for injection	QSP 1 Litre	