THÈSE

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

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

Présentée par :
Thomas Kerforne

Le donneur de rein décédé, principes physiopathologiques et innovations thérapeutiques

Directeur(s) de Thèse :
Thierry Hauet, Olivier Mimoz

Soutenue le 19 décembre 2018 devant le jury

Jury :

Président	**Antoine Thierry**	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers
Rapporteur	**Jacques Duranteau**	Professeur et praticien hospitalier, Université Diderot, Paris
Rapporteur	**Paul-Michel Mertes**	Professeur, Université de Paris Sud
Membre	**Thierry Hauet**	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers
Membre	**Claire Dahyot-Fizelier**	Praticien hospitalier, Université de Poitiers
Membre	**Carole Ichai**	Professeur et praticien hospitalier, Université de Nice

Pour citer cette thèse :
Thomas Kerforne. *Le donneur de rein décédé, principes physiopathologiques et innovations thérapeutiques* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2018. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine et Pharmacie)

(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale : BioSanté N°524

Champ disciplinaire : Biologie, Médecine, Santé

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie.

Présentée par :

Thomas KERFORNE

****

Le donneur de rein décédé, principes physiopathologiques et innovations thérapeutiques

****

Directeurs de Thèse : Professeur Thierry HAUET et Professeur Olivier MIMOZ

****

Soutenue le 19 décembre 2018

devant la Commission d'Examen

****

JURY

Pr. Carole ICHAI	Rapporteur
Pr. Paul-Michel MERTES	Rapporteur
Pr. Jacques DURANTEAU	Examinateur
Pr. Claire DAHYOT-FIZELIER	Examinateur
Pr. Antoine THIERRY	Examinateur
Pr. Thierry HAUET	Directeur de Thèse
Pr. Olivier MIMOZ	Directeur de Thèse

RESUME

LE DONNEUR DE REIN DECEDE, PRINCIPES PHYSIOPATHOLOGIQUES ET INNOVATIONS THERAPEUTIQUES.

La pénurie de greffons rénaux a conduit à élargir les prélèvements aux donneurs décédés après mort encéphalique (DME) à critères élargis et aux donneurs décédés après arrêt circulatoire (DDAC). Ces organes sont à risque d'être non greffés ou de présenter des non reprises de fonction primaire et une durée de vie plus limitée. Ces greffons souffrent des mécanismes d'ischémie-reperfusion inhérents au processus de prélèvement-conservation-greffe. Ces donneurs sont soumis à des phénomènes physiopathologiques qui leur sont propres et dont la compréhension pourrait ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques. Un modèle porcin de DME a permis d'établir que la cinétique de passage en mort encéphalique impacte sur la reprise de fonction primaire (RFP) par le biais de la réponse au stress oxydant (voie de SIRT1, PGC1-α, NRF2). La balance NRF2-mTOR pourrait également influencer la genèse de lésions. Le préconditionnement par un analogue de la spermidine améliore les RFP par diminution du stress oxydant, stimulation de PGC1-α et stimulation de l'autophagie par mTOR. Un modèle porcin de DDAC a permis d'établir que le reconditionnement par circulation régionale normothermique passe par la stimulation de l'érythropoïèse et de l'angiogenèse via HIF1-α, de eNOS et de la thrombomoduline avec un temps optimal de 4h. Au-delà une activation de la coagulation par la libération de TF induit une inflammation par stimulation des protease activating receptors. L'utilisation d'une molécule anti-IIa et anti-Xa durant la conservation permet d'améliorer les suites de greffe. La compréhension des principes physiopathologiques propres aux donneurs permet de mettre en place des reconditionnements innovants.

Mots-clés : donneur décédé-stress oxydatif- coagulation-greffe rénale-reconditionnement

ABSTRACT

The deceased kidney donor, physiopathological principles and therapeutic innovation.

The shortage of kidney transplants has led to the expansion of organ procurement to include donors who died after brain death (DBD) with expanded criteria and donors who died after circulatory arrest (DCD). These organs are at risk of not being transplanted or of delayed primary function and a more limited lifespan. These grafts suffer from the ischemia-reperfusion mechanisms inherent in the harvesting, preservation and transplantation process. These donors are subjected to physiopathological phenomena specific to them, the understanding of which could open up new therapeutic pathways. A porcine model of DBD has established that the speed of brain-death occurrence impacts primary graft function (PGR) through oxidative stress response (SIRT1 pathway, PGC1-α, NRF2). The NRF2-mTOR balance could also influence the genesis of graft injury. Preconditioning with a spermidine analogue improves PGR by reducing oxidative stress, stimulating PGC1-α and stimulating autophagy with mTOR. A porcine model of DCD has established that normothermic regional perfusion reconditioning involves stimulating erythropoiesis and angiogenesis via HIF1-α, eNOS and thrombomodulin with an optimal time of 4 hours. Beyond this, an activation of coagulation by the release of TF induces inflammation by stimulating protease activating receptors. The use of an anti-IIa and anti-Xa molecule during storage improves transplant outcomes. Understanding the pathophysiological principles specific to donors allows implementing innovative reconditioning.

Key-words: deceased donor- oxydative stress- coagulation- kidney transplant- reconditionning

UNITES DE RECHERCHE

- **Unité INSERM U1082 IRTOMIT « ISCHEMIE REPERFUSION en TRANSPLANTATION d'ORGANES, MECANISMES et INNOVATIONS THERAPEUTIQUES »**

  <u>Adresse du laboratoire :</u>

  CHU de la Milétrie

  Unité U1082 Equipe du Professeur Thierry Hauet

  2 rue de la Milétrie

  86000 Poitiers

- **Unité INRA 967- Plateforme IBiSA (Infrastructure en Biologie Santé et Agronomie) MOPICT- MOdélisation Préclinique-Innovation Chirurgicale et Technologique**

  <u>Adresse du laboratoire :</u>

  Unité INRA 967 Direction opérationnelle Monsieur Yvon Billon et Professeur Christophe Jayle

  INRA site du Magneraud

  17700 Surgères

Remerciements

Ce travail a débuté sous l'impulsion du Docteur Michel Pinsard qui m'a d'une part amené à m'intéresser à la problématique de la réanimation du donneur décédé d'organes et d'autre part m'a fait rencontrer l'équipe du Laboratoire Inserm U1082 (ancien U927) Ischémie Reperfusion en Transplantation d'Organes, dirigé successivement par les Professeurs Gérard Mauco puis Thierry Hauet.

Je remercie ainsi très sincèrement messieurs les Professeurs Gérard Mauco et Thierry Hauet qui m'ont accueilli au sein de leur laboratoire comme étudiant en Master I, Master II puis enfin en thèse.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur Paul-Michel Mertes et Madame le Professeur Carole Ichai d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également très sincèrement Madame le Professeur Claire Dahyot-Fizelier et Messieurs les Professeurs Antoine Thierry et Jacques Duranteau d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier le Professeur Olivier Mimoz pour m'avoir encouragé dans mes projets scientifiques, pour m'avoir formé comme interne et comme CCA. Vous arrivez à motiver les gens et à leur donner envie d'être meilleurs, vous êtes pour moi un modèle et ça a été un honneur de travailler sous votre encadrement.

Je remercie très sincèrement le Professeur Thierry Hauet, pour ses conseils avisés, son expertise et sa capacité à me remettre dans le droit chemin quand mon enthousiasme m'égarait un peu.

Un grand merci au Docteur Michel Pinsard qui a été l'étincelle et mon mentor.

Je remercie également les Professeurs Christophe Jayle et Benoît Barrou qui ont permis le développement du modèle de DDAC.

A mes compagnons de Master II ; Tackwa, Rémi, Sylvain, Solenne, POD, Jérome et Gégé.

A Sébastien qui a été d'une aide inestimable et qui est dorénavant mon binôme incontournable à l'U1082.

J'exprime toute mon amitié à tous ceux qui ont rendu possible l'aboutissement de ces travaux : Virginie, Nicolas, Delphine, Raphaël, Nathalie, Christelle, Maité, Sonia, Patrick, Sandrine, Fréderic, Sylvain, Catherine, William, Pierre (désolé pour les oublis…).

Et je remercie *sus scrofa domesticus* pour des raisons évidentes.

Avant-propos

Cette thèse de science a été réalisée dans le cadre du programme MD-PhD de l'Université et du Centre Hospitalo-Universitaire de Poitiers.

Elle s'inscrit dans le cadre d'une formation médicale initiale en anesthésie-réanimation avec une implication clinique dans la coordination des prélèvements d'organes et de tissus. Le but de ce travail était d'acquérir une démarche scientifique et une connaissance approfondie des différents types de donneur décédés et permettre d'apporter des concepts, des outils d'évaluation des organes prélevés, leur réhabilitation et ceci dès la réanimation du donneur.

Durant cette thèse en biologie cellulaire, plusieurs travaux de recherche préclinique ont été menés sur la thématique du donneur décédé après mort encéphalique et du donneur décédé après arrêt circulatoire. Il a été nécessaire de mettre au point des modèles précliniques porcins complexes avec 2 objectifs : permettre une description physiopathologique permettant d'ouvrir des pistes d'évaluation précoce des futurs greffons et permettre de mettre en évidence et de moduler les cibles thérapeutiques identifiées. Les publications et communications orales ou affichées qui en résultent sont précisées dans les pages suivantes.

La thèse de Science a eu comme point de départ deux revues de la littérature portant sur la physiopathologie connue et les axes de prise en charge du donneur en mort encéphalique et l'autre sur tous les aspects du prélèvement et de la greffe permettant une amélioration des greffons et leur bonne prise en charge.

La première partie a consisté à mettre au point 2 types de modèles porcins de donneurs de greffons rénaux différents sur leur cinétique de passage en mort encéphalique et un modèle porcin de donneur décédé après arrêt circulatoire reconditionné par circulation régionale normothermique.

La deuxième partie a consisté à évaluer 2 traitements innovants en post-conditionnement d'une part dans le modèle de mort encéphalique et d'autre part le modèle d'ischémie chaude mimant une condition de donneur décédé après arrêt circulatoire.

Ces travaux ont été réalisés grâce au soutien financier de la Fondation pour l'Avenir, de l'ancienne région Poitou-Charentes et de l'INSERM, de l'Université de Poitiers et grâce à Monsieur Sébastien Giraud, au Pr Olivier Mimoz et au Pr Thierry Hauet.

Valorisation du travail

Articles publiés

1. **Kerforne T**, Allain G, Giraud S, Bon D, Ameteau V, Couturier P, et al. Defining the optimal duration for normothermic regional perfusion in the kidney donor: a porcine preclinical study. Am J Transplant. 9 août 2018;
2. **Kerforne T**, Favreau F, Thuillier R, Hauet T, Pinsard M. [Toward a customized preservation for each kidney graft?]. Nephrol Ther. nov 2016;12(6):437-42.
3. Tillet S, Giraud S, **Kerforne T**, Saint-Yves T, Joffrion S, Goujon J-M, et al. Inhibition of coagulation proteases Xa and IIa decreases ischemia-reperfusion injuries in a preclinical renal transplantation model. Transl Res. 2016;178:95-106.e1.

Article soumis ou en cours de préparation.

1. **Kerforne T**, Giraud S, Thuillier R, Danion J, Couturier P, Hebrard W, Mimoz O, Hauet T. Rapid or slow time to brain death declaration: Impact on kidney graft injuries in an allotransplantation porcine model. Article soumis à Disease models & mechanisms.
2. Giraud S, **Kerforne T**, Zely J, Couturier P, Tauc M, Hauet T. Preventive GC7 reduces brain death-induced renal injuries in a preclinical kidney transplantation porcine model. Soumis à JASPN.
3. **Kerforne T**, Favreau F, Khalifeh T, Maiga S, Allain G, Thierry A, Dierick M, Baulier E, Steichen C, Hauet T. Hypercholesterolemia-induced increase in plasma oxidized LDL abrogated pro angiogenic response in kidney grafts. Soumis à Journal of Translational Medecine.

Communications orales ou affichées

1. Pinsard M, **Kerforne T**, Mimoz O. « Conséquences de la mort encéphalique et réanimation du donneur d'organes ». 55e Congrès de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation, 2013, Paris, France (conférence d'actualisation) https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/Consequences_de_la_mort_encephalique_et_reanimation_du_donneur_d_organes.pdf
2. Zely J, Giraud S, Pinsard M, Hebrard W, Couturier P, Debaene B, Tauc M, Hauet T, **Kerforne T**. « Préconditionnement rénal par un inhibiteur de la déoxyhypusine synthase (DHS) chez un modèle porcin de donneur en mort encéphalique (ME) ». Congrès SFT 2016.
3. Zely J, Giraud S, Pinsard M, Hebrard W, Couturier P, Debaene B, Tauc M, Hauet T, **Kerforne T**. « Préconditionnement rénal par un inhibiteur de la déoxyhypusine synthase (DHS) chez un modèle porcin de donneur en mort encéphalique (ME) ». Congrès SFAR 2016. Concours des résidents 2016.
4. **Kerforne T**, Giraud S, Pinsard M, Hebrard W, Couturier P, Debaene B, Hauet T. « Impact sur les greffons rénaux de la cinétique de passage en mort encéphalique (ME) chez un modèle porcin ». Congrès SFAR 2016. Nomination prix du meilleur abstract 2016.
5. **Kerforne T**, Giraud S, Allain G, Hebrard W, Ameteau V, Pinsard M, Hauet T, Debaene B, Jayle C. « Modalités d'activation de l'hémostase et de l'inflammation dans un modèle porcin de donneur décédé après arrêt cardiaque (DDAC) pris en charge par circulation régionale normothermique ». Congrès SFAR 2015.
6. Pontier B, **Kerforne T**, Pinsard M, Hebrard W, Debaene B, Mimoz O, Hauet T. « Evaluation du traitement par bêta 2 mimétique dans la réduction de l'œdème pulmonaire

neurogénique secondaire au passage en mort encéphalique chez un modèle porcin ». Congrès SFAR Septembre 2015. Concours des résidents 2015.

7. **Kerforne T**, Pinsard M, Hebrard W, Debaene B, Mimoz O, Hauet T. « Impact sur l'hémodynamique systémique de la cinétique de passage en mort encéphalique (ME) chez un modèle porcin ». Congrès SFAR Septembre 2014.
8. **Kerforne T**, Giraud S, Allain G, Jayle C, Hebrard W, Pinsard M, Debaene B, Mimoz O, Hauet T. « Reconditionnement des greffons rénaux (G R) chez un modèle porcin de donneurs décédés par arrêt cardiaque (DDAC) pris en charge par circulation régionale normothermique (CRN) ». Congrès SFAR Septembre 2014.
9. **Kerforne T**, Pinsard M, Allain G, Jayle C, Favreau F, Mimoz O, Hauet T « Donneur décédé après arrêt cardiaque (DDAC) pris en charge par circulation régionale normothermique (CRN) : Existe-t-il une reperfusion du territoire supra diaphragmatique (TSD) ? ». Congrès SFAR Septembre 2013.
10. **Kerforne T**, Giraud S, Allain G, Jayle C, Hebrard W, Pinsard M, Hauet T. « Etude de l'hémodynamique, la coagulation et de l'inflammation lors de l'utilisation d'une circulation régionale normothermique (CRN) chez un modèle porcin de donneur d'organes décédé après arrêt cardiaque (DDAC) ». Congrès SFT Décembre 2012.

Abréviations :

AngioTDM : angio tomodensitométrie

ATP : acide désoxyribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

CRN : circulation régionale normothermique

DAMPS : damage-associated molecular patterns

DHS : désoxyhypusine synthase

DDAC : donneur décédé après arrêt circulatoire

DME : donneur décédé après mort encéphalique

DV : donneur vivant

eIF5A ; eukaryotic translation initiation factor 5A

ERO : espèce réactive de l'oxygène

eNOS : endothelial NO synthase

EEG : électro-encéphalograme

FII : facteur II

FV : facteur V

FVII : facteur VII

FX : facteur X

GC7 : N-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7)5

HIF1α : hypoxia inducible factor

HLA : human leukocyte antigen

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène

ICAM-1 : inter cellular adhesion molecule 1

IFN-ϒ : interferon ϒ

IL-1 : interleukine 1

IL-6 : interleukine 6

IL-8 : interleukine 8

IMC : indice de masse corporelle

iNOS : inductible nitric oxid synthase

I/R : ischémie/reperfusion

LDH : lactate déshydrogénase

LDL : low density lipoprotein

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1

ME : mort encéphalique

MIP2a : macrophage inflammatory protein 2 α

MRC : maladie rénale chronique

mTOR : mechanistic target of rapamycin

NAD+ : nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NF-κB : nuclear factor-kappa B

NO_3- : péroxynitrite

NO : nitric oxyde

NRF2 : nuclear factor erythroid-2-related factor 2

O_2-- : anion superoxyde

OH- : radical hydroxyle

PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1

PAR : protein activated receptor

PI3K : phosphoinositide 3 kinase

PGC-1α : proliferator activator receptor ϒ coactivator-1α

TF : tissu factor

TGF-β : transforming growth factor

TLR : toll like receptor

TNF-α : tumor necrosis factor α

TU.N.E.L. : terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling

UW : University of Wisconsin solution

VCAM-1 : vascular cell adhesion protein 1

VEGF : vascular endothelial growth factor

4 HNE : 4-hydroxy-2-nonenal

Figures

Figure 1. Evolution des types de donneurs en France de 2001à 2017 (ABM, 2017).

Figure 2. AngioTDM chez volontaire sain. d'après (Dupas et al., 1998).

Figure 3. AngioTDM chez patient en mort encéphalique. d'après (Dupas et al., 1998).

Figure 4. Schéma de la cascade de coagulation (Hématologie Biologique, Pr M. Zandecki).

Figure 5. Evénements protéolytiques menant à l'activation des récepteurs PAR-1 et 2, orchestrés par les facteurs VIIa et Xa ancrés au TF (Riewald and Ruf, 2002).

Figure 6 : Proposition de la cascade de transduction du signal de PAR1 et PAR2 dans la régulation de la phosphorylation d'eNOS dans les cellules endothéliales (Suzuki et al., 2009).

Figure 7. Schéma de mise en place de la sonde de Foley générant la mort encéphalique et l'électroencéphalogramme dans le modèle porcin de DME.

Figure 8. Schéma du modèle porcin de circulation régionale normothermique (Allain et al., 2014).

Figure 9. Cinétique des concentrations plasmatiques de facteur tissulaire (TF) et complexes thrombine-antithrombine (TAT) pendant les procédures d'induction de ME et de réanimation pré-prélèvements rénaux.

Figure 10. Expression en protéine du facteur tissulaire rénale représenté par le ratio de sa forme activée par phosphorylation sur le facteur tissulaire total et de la thrombomoduline.

Figure 11. Résultats principaux justifiant l'étude (Melis et al., 2017).

Figure 12. Schéma de synthèse de notre hypothèse sur le stress oxydatif et la réponse à ce stress en fonction de la cinétique d'induction de la mort encéphalique et sa modulation par GC7.

Figure 13. Schéma de synthèse de l'activation des voies de reconditionnement et de l'intensité des mécanismes lésionnels pendant la perfusion des reins par la CRN en fonction du temps.

Tableaux

Tableau 1. Classification des stades de la MRC d'après (Levey et al., 2005).

Tableau 2. Répartition des causes de passage en mort encéphalique (ABM, 2016).

Tableau 3. Classification de Maastricht d'après (Kootstra et al., 1995).

Tableau 4. Réglages et objectifs hémodynamiques de la circulation régionale normothermique.

Tableau 5. Tableau récapitulatif des études humaines sur l'inflammation générée dans les reins issus de donneurs en ME par rapport à des reins contrôles.

Tableau 6. Tableau récapitulatif des études sur modèles murins de DBD sur l'inflammation générée dans les reins issus de donneurs en ME par rapport à des reins contrôles.

Tableau 7. Tableau récapitulatif des études sur modèles de gros animal de DBD sur l'inflammation générée dans les reins issus de donneurs en ME par rapport à des reins contrôles.

Tableau 8. Etudes sur modèle murin de DME évaluant l'impact de la mort encéphalique sur l'inflammation (↑ augmentation, NS : non significatif).

Tableau 9. Etudes sur modèle de gros animal de DME évaluant l'impact de la mort encéphalique sur l'inflammation (↑ augmentation, NS : non significatif).

Tableau 10. Etudes cliniques évaluant l'impact de la mort encéphalique sur l'inflammation (↑ augmentation, NS : non significatif).

Table des matières

Introduction ___ ***1***

I. La greffe rénale : principes thérapeutiques ___ **1**

1. La maladie rénale chronique. ___ 1
2. Principes généraux de la prise en charge de la maladie rénale chronique ___ 2
3. Les techniques d'épuration extra-rénale ___ 3
   1) L'hémodialyse ___ 4
   2) La dialyse péritonéale ___ 4
4. La greffe rénale ___ 4
   1) La greffe rénale diminue la mortalité. ___ 5
   2) La greffe rénale améliore la qualité de vie. ___ 6
   3) La greffe rénale est moins onéreuse que la dialyse. ___ 6

II. La greffe rénale : du donneur à la conservation des greffons. ___ **7**

1. Les différents types de donneurs et principes de prise en charge ___ 9
   1) Le donneur décédé en mort encéphalique (DME). ___ 9
   Diagnostic de la mort encéphalique ___ 11
   Les aspects physiopathologiques connus et les axes de prise en charge du donneur en ME. ___ 14
   M. Pinsard, T. Kerforne, O. Mimoz. Conséquences de la mort encéphalique et réanimation du donneur d'organe.
   https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/Consequences_de_la_mort_encephalique_et_reanimation _du_donneur_d_organes.pdf ___ 15
   2) Le donneur décédé après arrêt circulatoire (DDAC). ___ 30
   3) Le donneur vivant ___ 33
2. Le processus de prélèvement ___ 35
3. Conservation des greffons rénaux ___ 36
   Kerforne T, Favreau F, Thuillier R, Hauet T, Pinsard M. Toward a customized preservation for each kidney graft?. Nephrol Ther. nov 2016;12(6):437-42.) ___ 38

III. La greffe rénale : problématique actuelle ___ **45**

1. La pénurie de greffons ___ 45
2. La greffe rénale : fragilité des greffons et facteurs impactant la fonction post-transplantation ___ 46
   1) Fragilité liée au processus de greffe : lésions d'ischémie/reperfusion ___ 46
   La phase d'ischémie ___ 46
   La reperfusion ___ 48
   I/R et Coagulation ___ 50
   Le stress oxydant et sa régulation ___ 56
   mTOR et la pathologie rénale ___ 60
   2) Fragilité des greffons liée au type de donneur ___ 63
   Les donneurs décédés après mort encéphalique : les donneurs à critères élargis ___ 63
   Les donneurs décédés après mort encéphalique : le stress oxydant ___ 65
   Les donneurs décédés après arrêt circulatoire : l'ischémie chaude ___ 66

Objectifs et méthode ___ ***67***

I. Objectifs du travail ___ **67**

II. Méthode ___ **69**

1. Modèles porcins de donneurs ___ 69
   1) Modèle de donneur décédé après mort encéphalique : ___ 69
   2) Modèle de donneur décédé après arrêt circulatoire ___ 71
   3) Modèle d'allo-transplantation rénale ___ 74
2. Analyses des échantillons ___ 74

Partie I : Modélisation et description physiopathologique 75

1) Article 1 : Kerforne T., Giraud S, Thuillier R, Danion J, Couturier P, Hebrard W, Mimoz, Thierry Hauet. Rapid or slow time to brain death declaration: Impact on kidney graft injuries in an allotransplantation porcine model. Article soumis à Disease models & mechanisms. 76

Rappel des objectifs et hypothèses : 77

Données non publiées: 77

Publication 80

Synthèse : 116

2) Article 2 : Thomas Kerforne, Geraldine Allain, Sébastien Giraud, Delphine Bon, Virginie Ameteau, Pierre Couturier, William Hébrard, Jérôme Danion, Jean-Michel Goujon, Raphael Thuillier, Thierry Hauet, Benoit Barrou, Christophe Jayle. Defining the optimal duration for normothermic regional perfusion in the kidney donor: a porcine preclinical study. Am J Transplant. 9 août 2018; 121

Rappel des objectifs et hypothèses : 122

Publication 122

Synthèse 123

Partie II : innovation thérapeutique 126

1) Article 3: Giraud S, Kerforne T, Zely J, Couturier P, Tauc M, Hauet T. Preventive GC7 reduces brain death-induced renal injuries in a preclinical kidney transplantation porcine model. Soumis à JASPN. 127

Rappel des objectifs et hypothèses : 128

Publication 130

Synthèse : 145

2) Article 4: Tillet S, Giraud S, Kerforne T, Saint-Yves T, Joffrion S, Goujon J-M, et al. Inhibition of coagulation proteases Xa and IIa decreases ischemia-reperfusion injuries in a preclinical renal transplantation model. Transl Res. 2016 Dec;178:95-106. 147

Rappel des objectifs et hypothèses: 148

Publication 148

Synthèse 161

Discussion 163

III. Le donneur décédé après mort encéphalique : modélisation, physiopathologie et préconditionnement innovant. 165

1. Modélisation et description physiopathologique 165
2. Innovation thérapeutique 173

IV. Le donneur décédé après arrêt cardiaque : la CRN, durée optimale et mécanismes de reconditionnement, molécule anticoagulante innovante. 177

1. La CRN, durée optimale et mécanismes de reconditionnement 177
2. Inhibition de la coagulation 181

Conclusion et perspectives 184

Bibliographie 186

Introduction

I. La greffe rénale : principes thérapeutiques

1. La maladie rénale chronique.

L'insuffisance rénale chronique est une maladie peu symptomatique qui évolue lentement et après un certain délai pour son propre compte indépendamment du ou des mécanismes lésionnels initiaux. Cette évolution propre constitue la maladie rénale chronique (MRC).

Ce concept s'appuie sur la théorie de diminution de la réserve néphronique, le néphron constituant la plus petite unité fonctionnelle du rein, énoncée par Brenner et son équipe il y a déjà quelques années (Hostetter et al., 1981).

La classification de l'organisation Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) (Levey et al., 2005) est la plus utilisée pour définir le stade de la MRC. Elle s'appuie sur le débit de filtration glomérulaire (DFG) estimé par diverses formules dont les 3 les plus utilisées par ordre de performance (Levey et al., 2014) sont la CKD-EPI (Levey et al., 2009), MDRD (Froissart et al., 2005; Levey et al., 1999) et celle de Cockroft-Gault (Cockcroft and Gault, 1976) et la présence de différents marqueurs de l'atteinte rénale : présence d'une albuminurie/protéinurie, d'une hématurie, d'une leucocyturie, des anomalies morphologiques ou histologiques persistant plus de 3 mois après la réalisation de deux ou trois examens consécutifs. Les différents stades sont résumés dans le tableau 1.

		Classification par sévérité		
Stade	Description	DFG ml/min/1.73 m^2	Marqueurs associés	Classification par traitement
1	Lésion rénale avec DFG normale ou augmentée	≥90	Albuminurie, protéinurie, hématurie	
2	Lésion rénale avec DFG modérément diminuée	60-89	Albuminurie, protéinurie, hématurie	
3	DFG modérément diminuée	30-59	Insuffisance rénale chronique: stade précose	T si transplanté
4	DFG sévèrement diminuée	15-29	Insuffisance rénale chronique: stade tardif ➔ Stade préterminal	
5	Défaillance rénale	<15 (ou dialyse)	Défaillance rénale, urémie, ➔Stade terminal	
				D si dialysé

Tableau 1. Classification des stades de la MRC d'après (Levey et al., 2005).

La MRC et son traitement sont des enjeux majeurs de santé publique. En effet selon le rapport R.E.I.N. 2016, 84683 patients étaient traités en 2016 pour une MRC, 11029 entraient dans la maladie, 7920 patients (10,4%) décédaient. La dialyse est le premier traitement des stades terminaux avec 46872 patients dialysés et 37810 patients porteurs d'un greffon (Rapport R.E.I.N. 2016).

2. Principes généraux de la prise en charge de la maladie rénale chronique

La prise en charge de la MRC va consister à traiter la cause de l'agression rénale, car la maladie causale peut continuer à évoluer, et à surveiller et traiter les différents phénomènes physiopathologiques constituant la MRC.

Les premières mesures thérapeutiques vont consister à instaurer des traitements néphroprotecteurs. Cette néphroprotection repose sur le contrôle de la pression artérielle avec comme molécules de choix les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine 2 (Hou et al., 2006) associés éventuellement à des diurétiques. Le contrôle de la protéinurie est basé sur les même agents thérapeutiques associés à un régime protidique adapté (Fouque and Laville, 2009). D'autres mesures vont consister à

contrôler le taux de LDL cholestérol, à accompagner un sevrage d'une consommation tabagique et en alcool et une perte de poids (si l'IMC est supérieur à 25 kg/m^2). Enfin il faut éviter un maximum l'exposition du patient à des traitements néphrotoxiques. Il est à noter que le niveau de preuve de ces prises en charge n'est pas très important pour les patients aux stades 4 ou 5.

Le deuxième volet thérapeutique va consister à traiter les complications de la MRC, *i.e.*, la dénutrition, l'anémie, l'ostéodystrophie rénale, l'acidose et l'hyperkaliémie.

L'éducation thérapeutique et la surveillance étroite font partie intégrante du traitement avec notamment une préparation du patient à l'instauration d'une épuration extra-rénale ou d'une greffe.

3. Les techniques d'épuration extra-rénale

Le principe d'épuration extra-rénale repose sur des échanges entre le sang et un liquide appelé « dialysat », au travers d'une membrane semi-perméable disposant de multiples pores permettant le passage des molécules d'eau et de solutés de petit poids moléculaire.

Les deux techniques utilisées sont :

- l'hémodialyse
- la dialyse péritonéale.

Chacune de ces techniques offrant plusieurs modalités thérapeutiques.

1) L'hémodialyse

L'hémodialyse est la technique la plus utilisée (93,7% des patients en 2016) (Rapport R.E.I.N. 2016). Elle est réalisée par séances itératives régulières et se base sur l'épuration sanguine par le rétablissement de l'équilibre du milieu intérieur grâce à un traitement discontinu de trois à six heures par séances, en deux à trois séances par semaine. Elle est réalisée grâce un générateur de dialyse à travers un circuit extracorporel mettant en contact le sang et le dialysat.

2) La dialyse péritonéale

La dialyse péritonéale quant à elle reste très peu utilisée en France et concerne en 2016 6,3% des patients (Rapport R.E.I.N. 2016). Elle permet l'épuration extra-rénale par l'injection du dialysat dans la cavité abdominale grâce à un cathéter implanté chirurgicalement. Les échanges de solutés s'effectuent à travers la membrane péritonéale. Le dialysat, une fois saturé en urée, créatinine et autres molécules est éliminé. Ces manipulations sont renouvelées manuellement en moyenne quatre fois par jour : c'est la dialyse péritonéale continue ambulatoire (DPCA). Elles peuvent également se faire de façon automatisée lors de la dialyse péritonéale automatisée (DPA). La dialyse péritonéale peut être réalisée à domicile par le patient lui-même, ou par un membre de son entourage ou par des infirmiers libéraux après une période d'apprentissage.

4. La greffe rénale

L'autre thérapeutique en cas de stade 5 est la greffe rénale. Les processus de prélèvement et de greffe seront détaillés plus tard dans ce travail. De nombreuse études ont comparé l'épuration extra-rénale et la transplantation avec notamment 3 critères de jugement clés : la mortalité, la qualité de vie et le coût engendré.

1) La greffe rénale diminue la mortalité.

L'analyse des études comparant dans leur critère de jugement principal la mortalité de patients en MRC stade 5 traités par hémodialyse par rapport à ceux traités par greffe rénale retrouve pour 76% d'entre elles une baisse de mortalité dans la cohorte de malade greffés (163 cohortes, 1800119 patients). De manière plus fine 6 études regroupant 19945 patients retrouvent le même résultat après ajustement sur les autres causes de décès (Tonelli et al., 2011). 38 cohortes de malades faisant l'objet de 23 études (904610 patients) ont montré après ajustement sur les autres causes de mortalité et sur un suivi allant de 6 à 19 ans une réduction de la mortalité chez les patients transplantés par rapport aux patients dialysés pour 79% d'entre-elles (Hazard ratio allant de 0,16 à 0,76).

Il est à noter cependant que la plupart des études retrouvent une surmortalité en péri-opératoire dans les cohortes de patients transplantés sur une période allant de 1 à 3 mois Hazard Ratio à 2.0 (1.5-2.7). A un an, la mortalité des patients transplantés devient inférieure à celle de la cohorte de patients dyalisés Hazard Ratio 0,19-0,49 (McDonald and Russ, 2002).

Il y a tout de même quelques éléments qui pondèrent ces résultats. Tout d'abord la période de temps importante que couvrent les études dont sont issues ces données (1980-2010). Ensuite les techniques chirurgicales ont beaucoup évolué avec des techniques de greffe de moins en moins invasives (cœlioscopie/chirurgie robot-assistée) et des protocoles d'anesthésie permettant une sécurité péri-opératoire plus optimale (Territo et al., 2017). Dans les cohortes de patients dialysés il y a un mélange des techniques employées (dialyse péritonéale, hémodialyse). Enfin les patients les plus âgés dans les cohortes analysées n'avaient pas plus de 60 ans. Néanmoins les données comparatives pour les patients les plus âgés (70 ans et plus) semblent être aussi en faveur de la greffe (Huang et al., 2010; Rao et al., 2007).

La synthèse de ces données est plutôt en faveur de la greffe rénale dans le traitement de la MRC à un stade évolué.

2) La greffe rénale améliore la qualité de vie.

Sur la base de l'évaluation de la qualité de vie des patients par le questionnaire SF-36, les données issues de la littérature sont en faveur de la transplantation sur des résultats ajustés ou non ajustés (Tonelli et al., 2011). La comparaison de 2 cohortes françaises portant sur la qualité de vie de patients greffés par rapport aux patients dialysés retrouve des résultats identiques avec un meilleur score de qualité de vie sur tous les items du SF-36 (Beauger et al., 2015) . Néanmoins cette différence est moins évidente sur les cohortes internationales lorsque la technique employée est la dialyse péritonéale (Tonelli et al., 2011).

3) La greffe rénale est moins onéreuse que la dialyse.

L'Assurance maladie a estimé le coût global de la prise en charge de l'insuffisance rénale chronique à 4 milliards d'euros par an. Les techniques de dialyse représentent 83% de ce budget (78% pour l'hémodialyse et 5% pour la dialyse péritonéale) et la greffe 17%. Ces proportions s'explique par les coûts respectifs de chacun de ces traitements avec l'hémodialyse en tête (88608 euros par an et par patient) suivie par la dialyse péritonéale (64450 euros par an et par patient) et la greffe (86471 euros la première année puis 20 147 euros par an et par patient) (Blotière et al., 2010). Cette différence de coût est globalement retrouvée dans la littérature internationale (Jensen et al., 2014; Kaló et al., 2001; Loubeau et al., 2001), toujours en faveur de la greffe, et ce même après l'investissement secondaire à l'évolution technologique et médicale liée aux machines de perfusion rénale (Bond et al., 2009; Gómez et al., 2012).

La greffe rénale demeure par conséquent la stratégie thérapeutique la moins coûteuse.

II. La greffe rénale : du donneur à la conservation des greffons.

En France, les prélèvements d'organes et de tissus sont régis par les lois de bioéthique de 1994, révisées en 2004 et 2011, et leurs différents décrets d'application. Ils ne peuvent être pratiqués que dans des établissements autorisés par les Agences Régionales de Santé, sur avis de l'Agence de la Biomédecine (ABM). L'autorisation, renouvelable, est valable cinq ans.

L'organisation des prélèvements d'organes au sein d'un établissement autorisé est assurée par la coordination hospitalière de prélèvements d'organes et de tissus. Ce service est en lien avec les différentes structures participant au don d'organes et de tissus provenant de donneurs décédés, *i.e.*, le ou les services de réanimations et soins intensifs, le service d'accueil des urgences, la chambre mortuaire et les équipes chirurgicales.

Il existe en France 3 modalités de prélèvement d'organe en vue de greffe :

• à partir d'un donneur décédé de mort encéphalique (DME), dit à cœur battant : 182 établissements hospitaliers autorisés, 3539 morts encéphaliques (ME) recensées et 1796 donneurs prélevés en France en 2017.

• à partir d'un donneur décédé après arrêt circulatoire (DDAC) dit non contrôlé : 15 établissements hospitaliers autorisés mais 10 actifs et 38 donneurs prélevés en France en 2017.

• à partir d'un DDAC dit contrôlé : 22 établissements hospitaliers autorisés et 99 donneurs prélevés en France en 2017.

• à partir d'un donneur vivant : 637 donneurs prélevés en France en 2017 qui ont permis 611 greffes de rein (16% de la totalité des greffes rénales) (ABM, 2017).

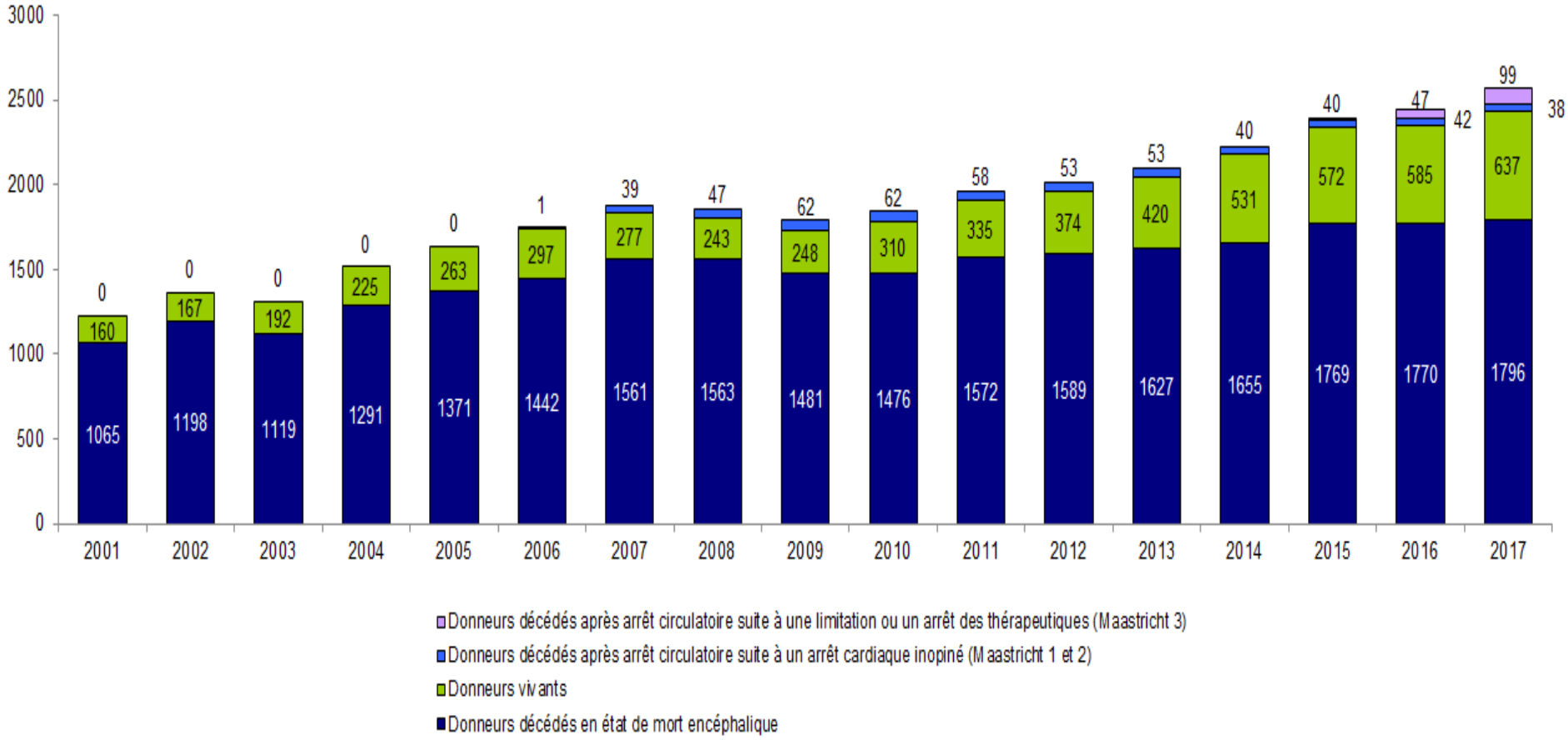

Figure 1. Evolution des types de donneurs en France de 2001 à 2017 (ABM, 2017)

1. Les différents types de donneurs et principes de prise en charge

1) Le donneur décédé en mort encéphalique (DME).

En 2017, 77,6% des greffons rénaux proviennent de DME.

On appelle mort encéphalique la destruction totale et irréversible de l'ensemble des centres nerveux intracrâniens (hémisphères cérébraux, cervelet et tronc cérébral) chez un sujet à cœur battant.

Elle a été décrite pour la première fois sous le terme de « coma dépassé » par Mollaret et Goulon en 1959 (Mollaret and Goulon, 1959), puis sa définition a été progressivement précisée, notamment par les critères d'Harvard en 1968 (Ad Hoc Committee of the Harvard Medical Schoo, 1968). En 1968, la circulaire Jeanneney a autorisé les prélèvements d'organes sur les sujets en état de mort encéphalique. Depuis la circulaire de la Direction Générale de la Santé n° 96-733 du 4 décembre 1996, la mort encéphalique est synonyme de décès du patient (Circulaire D.G.S. n° 96-733 du 04 décembre 1996, 1996).

La mort encéphalique est la conséquence d'un arrêt prolongé du débit sanguin cérébral. Elle entraine une destruction irréversible de l'encéphale et de ses interactions avec les organes périphériques, ne permettant plus les commandes centrales régulant la respiration, l'homéostasie circulatoire, thermique et endocrinienne. Grâce à une réanimation adaptée, les organes peuvent toutefois rester fonctionnels un certain temps et être prélevés.

De nombreuses agressions cérébrales peuvent être à l'origine du décès du patient par ME.

Les causes de décès des donneurs sont principalement les causes vasculaires (essentiellement AVC) (56,7%), puis les causes traumatiques (21,2%) en baisse régulière depuis le début des années 2000, les anoxies (17,7%) et les intoxications (0,3%). Les tendances observées depuis 2005, à savoir un maintien des causes vasculaires et une diminution des causes traumatiques,

qu'ils s'agissent d'accidents de la voie publique (AVP) ou d'autres non AVP, et une augmentation de la part des décès par anoxie sont confirmées. Ces tendances sont stables depuis 2012.

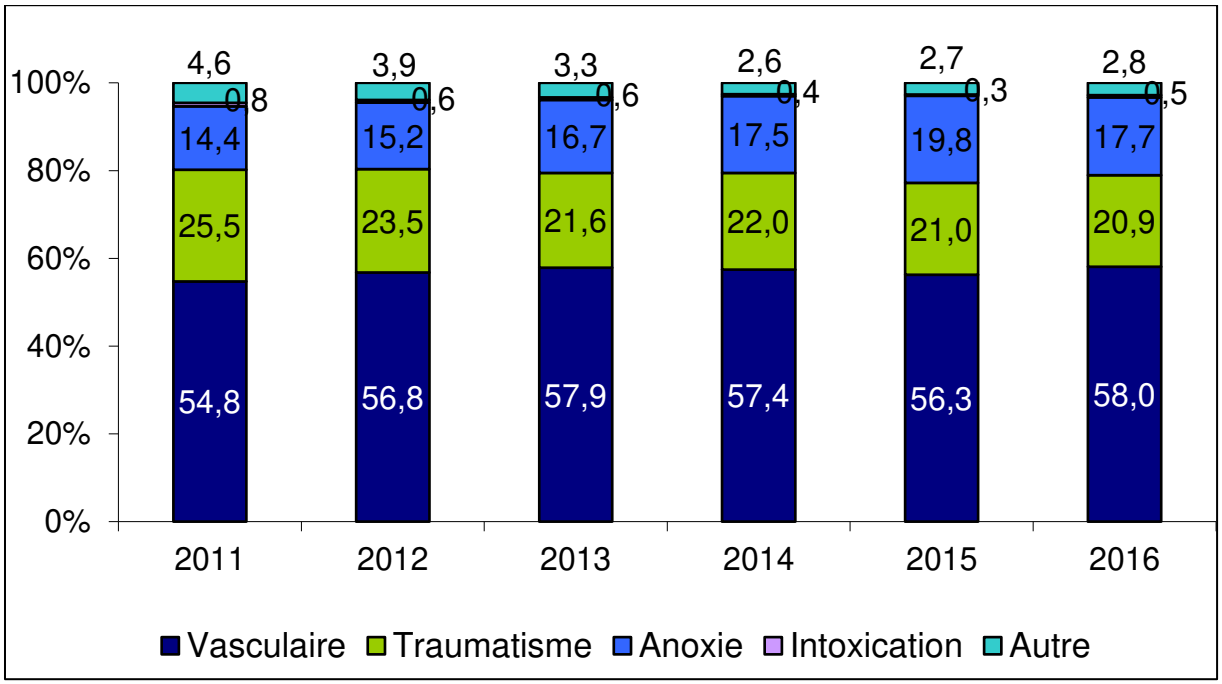

Tableau 2. Répartition des causes de passage en mort encéphalique (ABM, 2016).

Diagnostic de la mort encéphalique

L'état particulier qu'est la mort encéphalique bien que reconnu depuis des décennies sur le plan scientifique ne fait pas l'objet d'un consensus européen sur son diagnostic.

En effet dans certains pays il s'agit uniquement d'un diagnostic clinique qui ne nécessite pas de confirmation au moyen d'examens complémentaires. Pour d'autres, dont la France, le diagnostic de mort encéphalique doit associer une constatation clinique associée obligatoirement à des examens paracliniques. Il s'agit en France d'un des rares diagnostics faisant l'objet d'une législation (décret n° 96-1041 du 2 décembre 1996).

En France, le diagnostic de ME nécessite à la fois :

- Un diagnostic clinique chez un patient dont on connaît la cause du décès. L'examen du patient doit être répété et réalisé en l'absence de facteurs confondants (hypothermie, médicaments circulants pouvant modifier les signes cliniques recherchés). Cet examen doit montrer :
  - Une absence totale de conscience,
  - Une absence totale de reflexe du tronc cérébral,
  - Une absence de ventilation spontanée (épreuve d'hypercapnie).
- Une confirmation paraclinique :
  - Soit deux électro-encéphalogrammes plats et aréactifs à au moins 4 heures d'intervalle, réalisés dans des conditions d'enregistrement très codifiées, *i.e.*, en l'absence d'hypothermie ou de médicaments circulants pouvant perturber l'activité cérébrale, une amplification maximale, une durée minimale de 30 minutes.
  - Soit une angiographie cérébrale (Dupas et al., 1998 ; Leclerc and Groupe de relecture, 2007) pouvant être réalisée par voie veineuse ou artérielle, sélective ou non sélective,

mettant en évidence un arrêt circulatoire sur des images réalisées au moins 60 secondes après l'injection de produit de contraste et toujours réalisée par un radiologue expérimenté. L'examen doit être réalisé au moins 6h après le diagnostic clinique car l'opacification des artères intracérébrales peut persister quelques heures après les signes cliniques de la mort encéphalique. Un rehaussement de densité de certains éléments vasculaires peut être observé à 60 secondes après injection de produit de contraste chez les sujets en état de mort encéphalique. Il s'agit des artères vertébrales, de l'artère basilaire, des artères cérébrales postérieures, des artères péricalleuses, des sinus caverneux, des veines ophtalmiques, de la grande veine cérébrale et des sinus veineux superficiels (sagittaux et transverses). Ces éléments ne doivent pas être pris en compte pour le diagnostic de mort encéphalique.

Le diagnostic de ME nécessite sur une acquisition réalisée à 60 secondes après injection :

- l'absence d'opacification des deux veines cérébrales internes ;
- l'absence d'opacification bilatérale des branches corticales des artères cérébrales moyennes sur une coupe passant par le toit des ventricules latéraux (figure 3).

Une opacification des segments M2 (branches insulaires) et M3 (branches operculaires) des artères cérébrales moyennes est fréquente et ne doit pas faire récuser le diagnostic de ME.

En cas d'opacification unilatérale d'une ou deux branches corticales de l'artère cérébrale moyenne (M4), le diagnostic de mort encéphalique peut être affirmé à condition de s'être assuré de l'absence d'opacification des veines cérébrales internes.

Quel que soit l'examen employé pour valider le diagnostic de mort encéphalique, les résultats doivent être immédiatement consignés par écrit (Arrêté du 2 décembre 1996, 1996. Circulaire D.G.S. n° 96-733 du 04 décembre 1996, 1996 Décret n° 96-1041 du 2 décembre 1996, 1996).

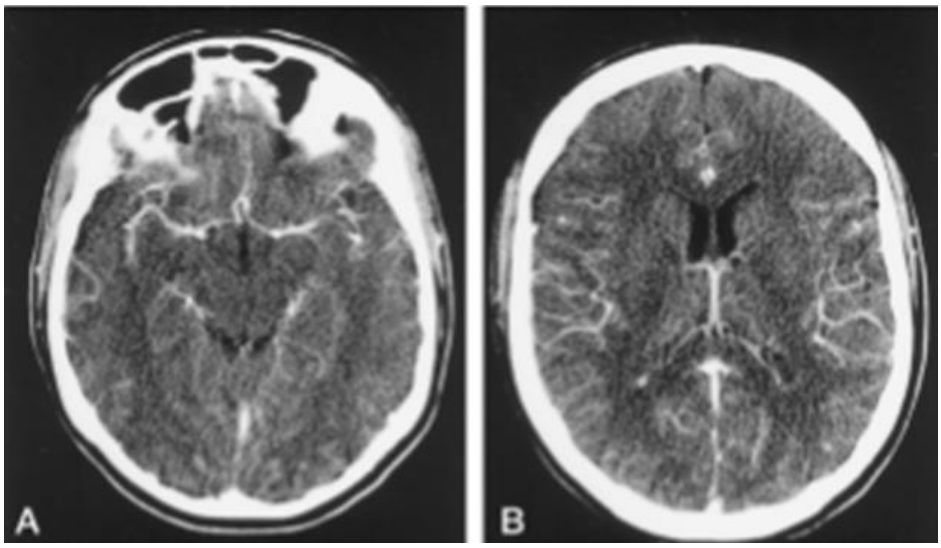

Figure 2. AngioTDM chez volontaire sain. A. 26 secondes après l'injection de produit de contraste toutes les artères sont opacifiées. B. 2 secondes plus tard les artères cérébrales terminales sont opacifiées ainsi que le système veineux (veines intracérébrales et sinus veineux) d'après (Dupas et al., 1998).

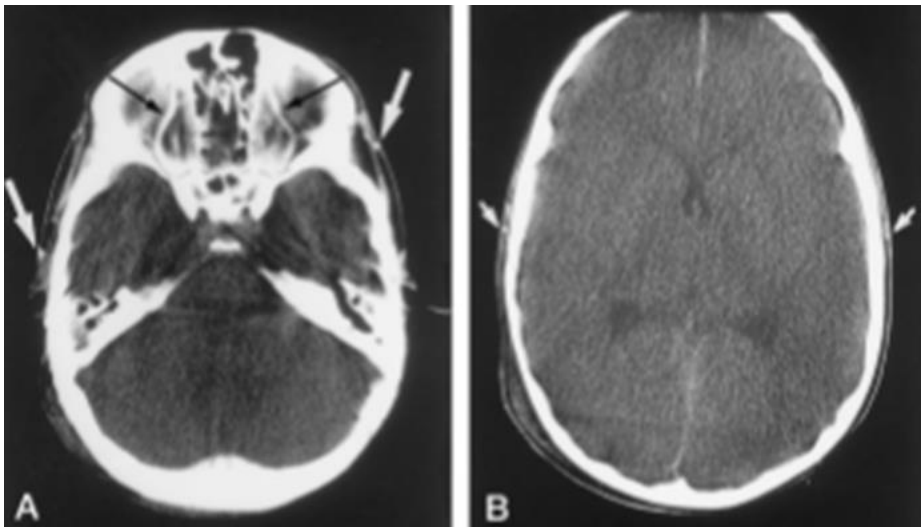

Figure 3. AngioTDM chez patient en mort encéphalique. A. 26 secondes après l'injection de produit de contraste les artères intracérébrales et basilaires ne sont pas opacifiées alors que les artères temporales superficielles (flèches blanches) et les artères ophtalmiques supérieures (flèches noires) le sont. B. 2 secondes plus tard les artères cérébrales terminales ainsi que le système veineux (veines intracérébrales et sinus veineux) ne sont pas opacifiées alors que des artères extra-cérébrales (flèches blanches) le sont, d'après (Dupas et al., 1998).

Les aspects physiopathologiques connus et les axes de prise en charge du donneur en ME.

Le processus de mort encéphalique met en jeu de nombreux phénomènes physiopathologiques. Ceux-ci sont la conséquence directe de la mise en œuvre d'ultimes mécanismes compensatoires visant à contrecarrer l'ischémie cérébrale irréversible et de la cessation complète de la régulation des différents systèmes de l'organisme par le cerveau.

Nous avons rédigé une mise au point sur ces différents phénomènes et les différents axes de prise en charge qui en découlent.

Il est à noter un concept thérapeutique intéressant ayant été récemment évalué dans la prise en charge du donneur décédé après mort encéphalique.

352 donneurs décédés après mort encéphalique avaient été enrôlés et avaient permis d'utiliser 566 reins, 280 issus de donneurs ayant présenté une hypothermie modérée (34°C à 35°C) et 286 provenant de donneurs en normothermie (36,5°C à 37,5°C). L'hypothermie apparaissait comme protectrice contre la survenue d'une reprise différée de fonction primaire avec un Odd Ratio à 0.62 (IC95% 0.43–0.92). Il est à noter que la proportion de donneurs à critères élargis était de 25% dans les 2 groupes de donneurs et qu'il serait intéressant de réaliser une étude similaire chez cette population spécifique de donneurs (Niemann et al., 2015).

M. Pinsard, T. Kerforne, O. Mimoz. Conséquences de la mort encéphalique et réanimation du donneur d'organe.

https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/Consequences_de_la_mort_encephalique_et_reanimation _du_donneur_d_organes.pdf

2) Le donneur décédé après arrêt circulatoire (DDAC).

En 1968, les premières descriptions de critères cliniques définissant la mort encéphalique ont permis de procéder à des prélèvements d'organes sur des patients devenus donneurs d'organes cadavériques à cœur battant, *i.e.*, les donneurs décédés après mort encéphalique. (Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School, 1968) Avant 1968, les organes de donneurs décédés après un arrêt circulatoire étaient la seule source de greffons. Depuis quelques années, on utilise de nouveau ces donneurs comme source de greffons avec aux Etats-Unis d'Amérique 118 greffes en 2000 et 1883 en 2017 (OPTN, 2018). Au cours de la dernière décennie (2008-2017), plus de 15% de tous les reins de donneurs décédés aux États-Unis provenaient de donneurs décédés après un arrêt circulatoire. L'utilisation d'organes de DDAC a doublé pour les reins et le foie au cours de la dernière décennie et a été multipliée par 7 pour les poumons (OPTN, 2018). Des cœurs obtenus de DDAC ont également été transplantés avec succès.

Les limites d'âge pour les organes de DDAC diffèrent de celles des organes de donneurs en état de mort cérébrale.

De nombreux centres évitent d'utiliser des organes provenant de DDAC âgés de plus de 65 ans. En effet les données scientifiques ont mis en évidence un taux de survie du greffons semblable mais un débit de filtration glomérulaire significativement moindre à 2 ans chez les patients greffés avec des reins issus de DDAC par rapport aux donneurs décédés après mort encéphalique (81% vs 93% et 33ml vs 54ml/min) (Nagaraja et al., 2015) . Néanmoins ces résultats sont à pondérer par les données suggérant qu'avec des temps d'ischémies froide plus courts (<12h) avec une méthode de conservation adaptée, les greffons présenteraient de meilleures survies et reprises de fonction (Locke et al., 2007). De plus, les receveurs de tels reins peuvent avoir de meilleurs résultats de greffe si leur traitement

immunosuppresseur comprend moins d'inhibiteurs de la calcineurine. Les périodes prolongées d'ischémie chaude (période pendant laquelle l'organe n'est pas refroidi et manque de sang oxygéné) sont inévitables avec les organes issus de DDAC et entrainent une plus grande fragilité de ces greffons avec jusqu'à 57% de reprises retardées de fonction primaire (Farney et al., 2008).

Il existe plusieurs types de DDAC. Ces donneurs sont classifiés selon la classification de Maastricht .

Classification dites de Maastricht		
	Catégories	Description
Non contrôlé	I	Arrêt cardiaque survenu en l'absence de secours mais < 30 minutes
	II	Arrêt cardiaque survenue en présence des secours avec une prise en charge ne permettant pas la reprise d'une hémodynamique.
Contrôlé	III	Arrêt cardiaque secondaire à un arrêt des thérapeutiques actives
	IV	Arrêt cardiaque survenant chez un patient en état de mort encéphalique

Tableau 3: Classification de Maastricht d'après (Kootstra et al., 1995).

Un nouveau type de DDAC est en train d'émerger dans les pratiques de certains pays du nord de l'Europe : le DDAC dans les suites d'une euthanasie (Ball et al., 2018). Ce type de don est possible en Belgique et aux Pays-Bas mais les questions éthiques soulevées sont importantes et font débat (Bollen et al., 2016). En effet plusieurs concepts encadrant le don sont remis en question car certains patients dans leur démarche de fin de vie volontaire souhaiteraient donner leurs organes dans des conditions de donneurs vivants . Il y a donc une dualité légale et éthique quant au respect des conditions de fin de vie voulues par le patient et la réalisation de procédure de don entraînant la mort (Bollen et al., 2018).

La circulation régionale normothermique

Il existe deux attitudes pour la prise en charge des donneurs décédés après arrêt circulatoire.

Le refroidissement *in situ* rapide et la mise en place d'une circulation régionale normothermique (CRN). Il n'existe pas de consensus international pour le choix de l'une ou l'autre technique, néanmoins les greffons issus des DDAC ayant eu une CRN sont de meilleure qualité que ceux issus des DDAC sans CRN (Delsuc et al., 2018; Demiselle et al., 2016; Matillon et al., 2017; Valero et al., 2000).

Néanmoins les données cliniques font état d'un bénéfice évident de la CRN avec un taux de reprise retardée de fonction en greffe rénale en France qui est de 9% contre 57% en Espagne et plus de 70 % dans la plupart des séries anglosaxonnes publiées.

La circulation régionale normothermique est un circuit de circulation extracorporelle dit fermé.

Il se compose :

- d'une pompe centrifuge à flux continu, laminaire,
- d'un oxygénateur à membrane alimenté en air et oxygène,

• d'un circuit sanguin composé d'une ligne veineuse de retour vers l'oxygénateur et d'une ligne artérielle en aval de l'oxygénateur et de deux canules ; la canule artérielle est introduite dans l'artère fémorale et la canule veineuse multi perforée est introduite dans la veine fémorale avec son extrémité positionnée dans l'oreillette droite.

La CRN permet de reperfuser les organes abdominaux qui viennent de subir un arrêt circulatoire au cours de procédures de prélèvement sur DDAC.

La procédure chirurgicale de prélèvements des organes abdominaux est fortement simplifiée par la présence de la CRN. Aucune canulation artérielle et veineuse suplémentaire n'est nécessaire pour procéder au lavage des organes par le soluté de préservation des organes, de 4ème génération selon le protocole national. Après l'arrêt de la perfusion par la CRN qui marque le début du temps d'ischémie froide, le soluté de préservation des organes abdominaux est perfusé *via* le circuit artériel de la CRN et le drainage du sang lavé est assuré par la canule veineuse par gravité.

La durée optimale de la CRN n'est quant à elle pas bien définie. Il est admis qu'il faut soumettre les reins à au moins 1 heure de reperfusion mais les procédures internationales loin d'être consensuelles sont très disparates (Ortega-Deballon et al., 2015). Cette durée varie de 2h de CRN en Angleterre (Oniscu et al., 2014), 3h en Suisse , 4h en Espagne et en France (Barrou et al., 2016) jusqu'à 6h en Italie (Geraci and Sepe, 2011).

3) Le donneur vivant

Le recours au don vivant est une source de greffons rénaux qui se développe depuis plusieurs années avec une proportion de 16% des greffes rénales en France (ABM, 2017). Les résultats de la transplantation à partir d'un donneur vivant sont supérieurs à ceux provenant de donneurs décédés (Roodnat et al., 2003). Cette meilleur qualité des greffons n'est pas seulement due à la sélection du couple donneur-receveur ni aux durées d'ischémie

froide plus courtes mais à la nature du donneur lui-même. En effet les reins ne sont pas soumis aux phénomènes physiopathologiques inhérents à la mort encéphalique ni à l'instabilité hémodynamique qui y est associée. Les autres éléments favorisant ces greffons sont le caractère programmé de l'intervention et l'indication de greffe souvent préemptive.

Le don vivant est une procédure qui existe depuis une trentaine d'années. Les progrès ont d'abord été techniques avec des procédures de moins en moins invasives. La première description d'une néphrectomie par coelioscopie pour un don vivant date de 1995 (Ratner et al., 1995). L'acte chirurgical tend depuis à être de moins en moins invasif avec des procédures courantes de prélèvement par chirurgie robot-assistée (Giacomoni et al., 2013; Monn et al., 2014) l'utilisation d'un seul port pour la néphrectomie laparoscopique, voire de la chirurgie par les cavités naturelles avec des procédures de cœlioscopies combinées à une extraction par voie vaginale. Néanmoins même si sur la récupération postopératoire les procédures mini-invasives sont plus performantes que l'approche par laparotomie, il manque des données pour privilégier une technique mini-invasive plutôt qu'une autre (Shockcor et al., 2018).

Dans les avancées permettant de développer les greffes rénales à partir de donneurs vivants, on retrouve le don croisé, permettant l'échange de greffons entre 2 paires de donneur et receveur incompatibles mais mutuellement compatibles (autorisé en France depuis 2011 et débutée en 2013) (ABM, 2016), l'utilisation de greffons HLA et ABO incompatibles moyennant des protocoles de désenbilisation du receveur. Les résultats de ces greffes sont moins bons que ceux des greffes où le transplant est issu d'un membre de la fratrie HLA-identique. Néanmoins les patients issus de ces cohortes ont une meilleure survie que ceux en attente de greffe ou greffés à partir de donneurs décédés (Orandi et al., 2016). La compatibilité HLA joue un rôle mineur mais influence néanmoins le devenir du greffon au même titre que l'âge du donneur, la survenue d'un rejet aigu, la différence de corpulence entre le donneur et le receveur.

2. Le processus de prélèvement

Le processus de prélèvement doit s'attacher à préserver la qualité fonctionnelle et anatomique des futurs greffons (et tissus). L'acte chirurgical doit absolument respecter les techniques élémentaires de chirurgie et permettre une bonne coordination multi équipe. Le respect du défunt doit évidemment être une priorité constante avec une restitution tégumentaire adéquate.

Le premier temps va consister à préparer le prélèvement en procédant à la dissection soigneuse des vaisseaux et des organes en limitant un maximum les facteurs d'instabilité du donneur notamment hémodynamiques*, i.e.*, avec l'absence de canulation et de dissection trop avancée et une coordination entre les spécialités chirurgicales et avec l'équipe d'anesthésie.

Le deuxième temps du prélèvement va comporter les phases de canulation, de clampage et de perfusion. Cette séquence va consister en la canulation de la veine mésentérique inférieure (associée au contrôle de l'artère cœliaque), la canulation hypogastrique ou sous-rénale, la mise en place des trocarts de cardioplégie et de pneumoplégie pour le temps thoracique et la canulation de la veine cave inférieure. Immédiatement après cette séquence, sont réalisés les clampages thoraciques et abdominaux, suivis de l'ouverture des décharges et des perfusions associées au refroidissement local.

La dernière phase va consister en l'explantation des greffons avec un partage entre les différentes équipes des vaisseaux.

Après l'explantation des organes, celle des tissus est réalisée avec les vaisseaux, les cornées, le cœur pour valves, les os/tendons et la peau. Une restitution tégumentaire soigneuse doit finaliser le prélèvement.

3. Conservation des greffons rénaux

La conservation du futur greffon est une étape incontournable du processus de prélèvement et de greffe. Cette conservation se fait classiquement en hypothermie et permet le transport de l'organe du donneur au receveur.

Classiquement les greffons rénaux sont conservés en étant immergés dans une solution de préservation à 4°C.

Le cahier des charge d'une solution de conservation est de permettre à 4°C de réduire les dommages et l'inflammation cellulaires et de préserver la fonctionnalité et l'intégrité du greffon, améliorant ainsi les résultats à court et à long termes (Anaya-Prado and Delgado-Vázquez, 2008; Barrou et al., 2016; Hicks et al., 2006; Jamieson and Friend, 2008).

Il existe 3 approches quant à la composition des solutions de conservation :

- Une composition intracellulaire,
- Une composition intermédiaire,
- Une composition extracellulaire.

Néanmoins ces 3 approches ont un point commun : limiter l'œdème cellulaire. Pour cela toutes contiennent une ou des substances imperméables (lactobionate ou le raffinose) et/ou des colloïdes (hydroxyéthylamidon ou polyéthylèneglycol).

Il manque actuellement des données cliniques pour privilégier une approche plutôt qu'une autre. Les données cliniques qui déterminent efficacement la solution optimale à utiliser pour la préservation des reins favorisant ainsi la survie du greffon font défaut. Toutefois, les données expérimentales obtenues avec le modèle de porc cliniquement pertinent (Giraud et al., 2011) ont montré que les solutions extracellulaires contenant des

colloïdes sont plus efficaces que les solutions intracellulaires, ou au moins équivalentes aux solutions intracellulaires (Hauet and Eugene, 2008).

La vision de cette étape de conservation a beaucoup changé ces dernières années car d'une « stase » incontournable elle est devenue une véritable étape de conditionnement et de qualification de l'organe. L'émergence des DME dit « à critères élargis » et le retour aux prélèvements sur les donneurs décédés après arrêt circulatoire ont conduit à élaborer de nouvelles techniques de conservation avec les machines de perfusion rénale permettant une perfusion continue de solution de conservation.

L'utilisation de la conservation adaptée à la fragilité de l'organe permettrait d'améliorer la reprise de fonction avec les perspectives qui sont exposées dans la revue suivante.

Kerforne T, Favreau F, Thuillier R, Hauet T, Pinsard M. Toward a customized preservation for each kidney graft?. Nephrol Ther. nov 2016;12(6):437-42.)

III. La greffe rénale : problématique actuelle

1. La pénurie de greffons

Le nombre de patient nouvellement inscrit sur liste de greffe est de 5280 nouveaux malades en 2017 soit 78,7 nouveaux inscrit pmh contre 72,8 pmh en 2015. Ces chiffres représentent une augmentation de 21,5% en 5 ans. Cette augmentation est liée à un élargissement des indications de la greffe rénale et notamment à l'extension de l'indication à des patients plus âgés (âge moyen en progression de 51,3 ans en 2012 à 54,2 ans en 2017 et proportion de patients > 70 ans de 7,5% à 14,6%). Parmi les nouveaux inscrits, 15,1% (795) sont candidats à une retransplantation, 39,8% (2100) ne sont pas encore dialysés et 12,9% (681) sont hyperimmunisés. Au total le cumul des patients déjà inscrits restant à greffer et les nouveaux inscrits porte le nombre de patient à 18793 en 2017 (+6%).

Les multiples stratégies permettant d'augmenter le nombre de prélèvements ont permis d'augmenter le nombre de patients greffés de 5% en 1 an pour un total de 3782 greffes rénales (+25% en 5 ans).

Au total la différence observée entre le nombre de patients greffés et le nombre de nouveaux inscrits est de 40% (ABM, 2017).

Ce constat est identique sur le plan international avec aux Etats-Unis d'Amérique 102918 patients en attente de greffe. Le nombre de patients en attente a doublé en 20 ans (OPTN, 2018) .

2. La greffe rénale : fragilité des greffons et facteurs impactant la fonction post-transplantation

1) Fragilité liée au processus de greffe : lésions d'ischémie/reperfusion

Physiopathologiquement les organes (futurs greffons) subissent de manière obligatoire une séquence d'ischémie/reperfusion (I/R).

La phase d'ischémie

Lors du clampage du système vasculaire alimentant le rein en sang, débute la phase d'ischémie. L'ischémie est définie par la cessation de l'apport sanguin à un tissu ou à un organe. Rapidement il y a un arrêt d'apport en nutriments et une chute de la pression partielle en oxygène provoquant une dégradation du métabolisme énergétique.

La mitochondrie élément centrale du métabolisme énergétique ne peut plus dans cette situation assurer la production d'ATP par phosphorylation oxydative. La production d'ATP par la voie anaérobie impliquant la glycolyse devient alors la seule source d'énergie mais rapidement il y a une inadéquation entre les apports et les besoins en ATP.

Cette inadéquation entre les besoins et la production d'ATP secondaire à une hypoxie persistante entraîne un dysfonctionnement des transporteurs, consommateurs d'ATP, entre les différents compartiments cellulaires. Par exemple, les pompes Na^+/ K^+-ATPases sont inhibées par le manque d'ATP avec une augmentation de la concentration en sodium du cytoplasme et une baisse du potassium. Les conséquence sur le fonctionnement cellulaire sont majeures avec la constitution d'un œdème et une désorganisation cellulaire. Une accumulation de protons intracellulaire secondaire à l'inhibition des pompes ATPases-dépendantes et l'hydrolyse de l'ATP entraîne *de facto* une baisse du pH. Cette acidémie entraîne une activation des antiports Na^+/ H^+ ce qui va encore augmenter la concentration intracellulaire en Na^+ (Bonventre and

Weinberg, 2003). L'augmentation de la concentration en Na^+ intracellulaire va entraîner l'activation de pompes échangeuses Na^+/Ca^{2+} avec d'importants mouvements calciques intracellulaires (Eltzschig and Eckle, 2011).

Ceux-ci ont pour conséquence d'activer de nombreux systèmes enzymatiques Ca^{2+} dépendants avec de nombreux effets délétères pour la cellule :

- Déclenchement de processus pro-inflammatoire par le biais de la synthèse de médiateurs lipidiques (prostaglandines)
- Activation de protéases entraînant une désorganisation du cytosquelette et *in fine* la mort par apoptose.

Enfin l'un des dernier phénomène est le stress oxydant. Par définition, il s'agit de la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène. Intuitivement la physiopathologie de la production d'espèces radicalaires survient lors de la réoxygénation. Il a été montré néanmoins que pendant la phase d'ischémie, il pouvait y avoir l'initiation d'un stress oxydatif (Li and Jackson, 2002). L'augmentation des concentrations calciques intra-cytoplasmiques entraîne une activation de la xanthine oxydase qui est une enzyme qui va produire des anions superoxydes en condition d'ischémie.

Plusieurs phénomènes adaptatifs sont initiés durant la phase d'ischémie.

- L'activation de HIF1 (hypoxia inductible factor 1) facteur de transcription hétérodimérique qui est sensible à la diminution de la pression partielle en oxygène tissulaire . Son activation va initier l'érythropoïèse, l'angiogénèse et la modulation du métabolisme (Peyssonnaux, 2008),
- La stabilisation du facteur de transcription NF-κB (Nuclear Factor-κB) qui va initier un processus inflammatoire (Frangogiannis, 2007).

La cellule endothéliale est la première touchée par les phénomènes secondaire à l'ischémie.

Les 2 conséquences majeures de l'ischémie vont être :

- La perte de sa fonction de barrière endothéliale,
- Son activation avec l'expression de cytokines/chimiokines, de récepteurs et de molécules d'adhérence capables de favoriser le recrutement leucocytaire (pourvoyeurs de lésions à la reperfusion).

Enfin, si la durée d'ischémie se prolonge, les lésions cellulaires seront irréversibles (Ogawa et al., 1992).

La reperfusion

La reperfusion est la restauration de l'apport sanguin au tissu. Plusieurs phénomènes vont alors s'associer.

Tout d'abord une dysfonction microvasculaire par un déséquilibre entre les agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs avec comme conséquence une mauvaise reperfusion et donc une prolongation de l'ischémie initiale et une activation de l'hémostase primaire associée par agrégation plaquettaire. Il s'agit du phénomène de no-reflow (Bonventre and Weinberg, 2003).

Ensuite la reperfusion apporte brutalement aux cellules ischémiques du dioxygène. Ceci va avoir pour conséquence d'entraîner une explosion du stress oxydant. Cette augmentation majeure du stress oxydant va saturer les capacités des différents systèmes antioxydants cellulaires. Cette explosion du stress oxydant est secondaire à plusieurs phénomènes mais deux sont prépondérants :

1. L'échappement des électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale au moment de la reperfusion pour former des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ;

2. La production d'ions péroxynitrites suite à la genèse concomitantes d'espèces radicalaires et de monoxyde d'azote. Les péroxynitirites ont des effets cytotoxiques et vont diminuer la quantité de NO libre disponible et son effet vasodilatateur plutôt bénéfique au cours de la reperfusion (Li and Jackson, 2002).

En plus du stress oxydant, l'apport d'oxygène va entraîner l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale. Ceci va avoir 3 conséquences :

- Un œdème mitochondrial,
- Une inhibition complète de toutes les fonctions mitochondriales dont la production d'ATP,
- L'activation de la voie pro-apoptotique par relargage du cytochrome C.

La reperfusion va induire également une réponse immunitaire :

- Innée par la production de molécules immunoréactives lors du stress cellulaire (les DAMPs : damage-associated molecular patterns et les ligands des TLR : Toll-like receptors), la sécrétion de cytokines/chimiokines et l'activation des cellules endothéliales associées à l'expression de molécules d'adhérence (sélectines). Des cellules monocytaires, des polynucléaires neutrophiles et des cellules dendritiques vont être alors recrutées.
- Adaptative par le recrutement de lymphocytes T participant à l'entretien d'une réponse immunitaire chronique (Cassie et al., 2004; Frangogiannis, 2007). Celle-ci s'amplifie selon l'allogénicité du greffon (Huang et al., 2010).

Enfin l'association d'un processus inflammatoire chronique et de l'activation de voies pro-fibrosantes (générant une synthèse de collagène interstitiel) par l'intermédiaire du transforming growth factor-β (TGF-β) (Wang et al., 2005) vont faire se développer une

fibrose interstitielle détruisant capillaires et néphrons, altérant la fonction chronique et la durée de vie du greffon.

I/R et Coagulation

Ce chapitre est issu du rapport de MASTER2 soutenu par Monsieur Thomas Kerforne en Juin 2012.

« Au cours de la séquence d'I/R, deux perturbations sont prépondérantes et inévitables: l'activation de la coagulation et de l'inflammation, particulièrement délétères pour une bonne reprise de fonction du greffon (Boros and Bromberg, 2006; Jang et al., 2009). L'I/R qui perturbe l'hémostase vasculaire a un impact négatif sur la densité capillaire, en réponse à l'ischémie les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhérence qui favorisent l'activation et l'agrégation plaquettaire. L'expression anormale du facteur tissulaire (TF) induite par les lésions du territoire vasculaire au cours de l'ischémie déclenche la cascade de la coagulation, aboutissant à la génération de thrombine active et à l'activation des récepteurs PAR (récepteurs de protéases activées). Ces événements activent la cascade de la coagulation et par conséquent la mise en place de la réponse inflammatoire.

La coagulation est un processus complexe aboutissant à la formation du caillot sanguin. La cascade de la coagulation fait partie des systèmes d'homéostasie de l'organisme et vise en premier lieu à limiter une hémorragie lors d'une lésion vasculaire. La cascade de la coagulation est un système qui fait intervenir des facteurs plasmatiques solubles et une surface biologique pro-coagulante chargée négativement et permettant la fixation de facteurs solubles. Les facteurs de la coagulation (famille des sérines protéases) sont présents dans le sang sous forme inactive (zymogènes). La cascade de la coagulation se caractérise par la protéolyse

successive des zymogènes. Il existe deux voies d'initiation : la voie intrinsèque (endogène) et la voie extrinsèque (exogène) (Figure 3).

La voie extrinsèque est initiée par des lésions de l'endothélium, ceci va conduire à la rencontre entre les constituants du sang et le TF. Ceci permet aux protéases du sang comme le FVII de rentrer en contact avec le TF ce qui va aboutir à la conversion du FVII en FVII activé. Le complexe TF/FVIIa vitamine K dépendant qui en résulte se lie au facteur X pour former le complexe de la tenase (TF/FVIIa/FX) ce qui permet la conversion de FX en FXa. Le complexe TF/FVIIa/FXa est connu pour être transitoire, une petite quantité de FXa se dissocie pour former le complexe de la prothrombinase (FVa/FXa/phospholipides/Ca^{2+}).

Ce dernier transforme la prothrombine (FII) en thrombine active (FIIa), ce qui aboutit à la conversion du fibrinogène en fibrine (principal constituant du caillot sanguin). Une coagulation permanente se réalise lorsque la thrombine initie l'activation de la voie intrinsèque. La voie extrinsèque est essentielle dans l'initiation de la coagulation par l'activation de quantités limitées de thrombine, tandis que la voie intrinsèque maintient la coagulation par l'amplification dramatique du signal initial (Krupiczojc et al., 2008).

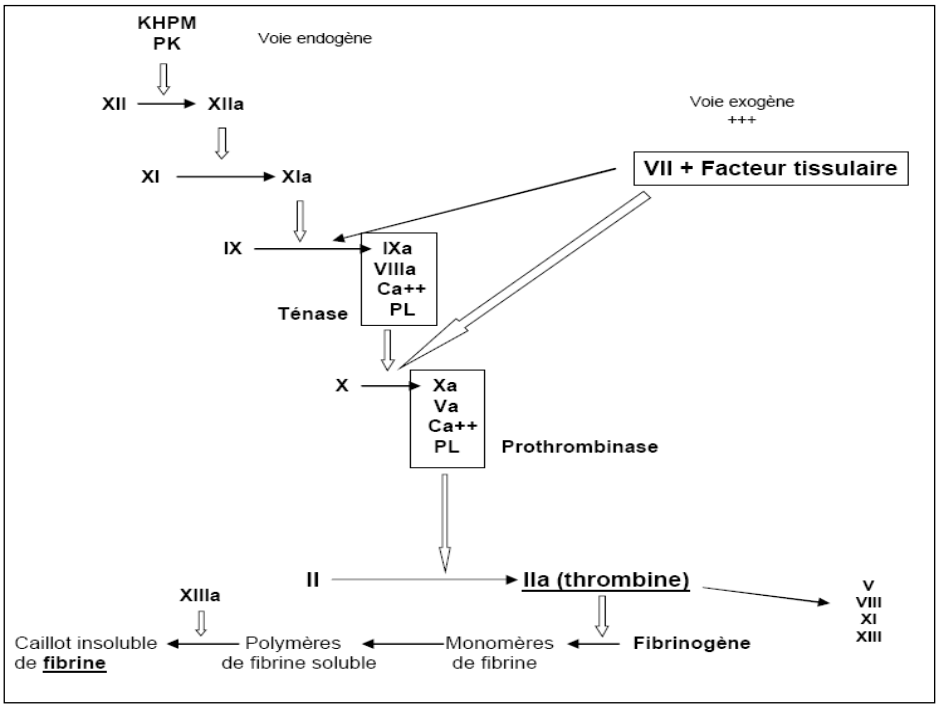

Figure 3. Schéma de la cascade de coagulation (Hématologie Biologique, Pr M. Zandecki)

Lors de la séquence d'I/R, l'activation de la cascade de coagulation et notamment la production de thrombine participe à court et à moyen termes à la dysfonction chronique du greffon rénal. La thrombine et les facteurs Xa et VIIa peuvent se lier à des récepteurs de protéases activées (PAR). Le PAR1 est activé par la thrombine et par le FXa entre autres. Le PAR2 est activé par le FVIIa et le FXa tandis que les PAR3 et 4 sont activés par la thrombine. L'activation des PAR par les protéases de la coagulation va conduire la cellule à exprimer des molécules de l'inflammation (Dugina et al., 2002).

Le TF est une glycoprotéine transmembranaire. C'est le principal initiateur *in vivo* de la cascade de la coagulation, il appartient à la superfamille des récepteurs à l'interféron γ (IFNγ). Dans les conditions physiologiques normales, le TF est absent du territoire vasculaire, il n'est pas présent dans le sang mais il est retrouvé dans l'adventice des vaisseaux et dans les cellules péri-vasculaires, les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales et les fibroblastes. Son expression est inductible dans les monocytes sanguins et à la surface des cellules endothéliales, en réponse à un stimulus inflammatoire.

Lors de l'initiation de la coagulation (système extrinsèque), le TF lié au facteur VIIa peut activer le récepteur PAR2. Il orchestre aussi l'assemblage du complexe catalytique TF-VIIa ayant comme substrat le facteur X. Ceci aboutit à l'activation du facteur X en facteur Xa, ce complexe ainsi formé permet d'activer les PAR1 et 2 présents à la surface des cellules endothéliales. (Figure 4).

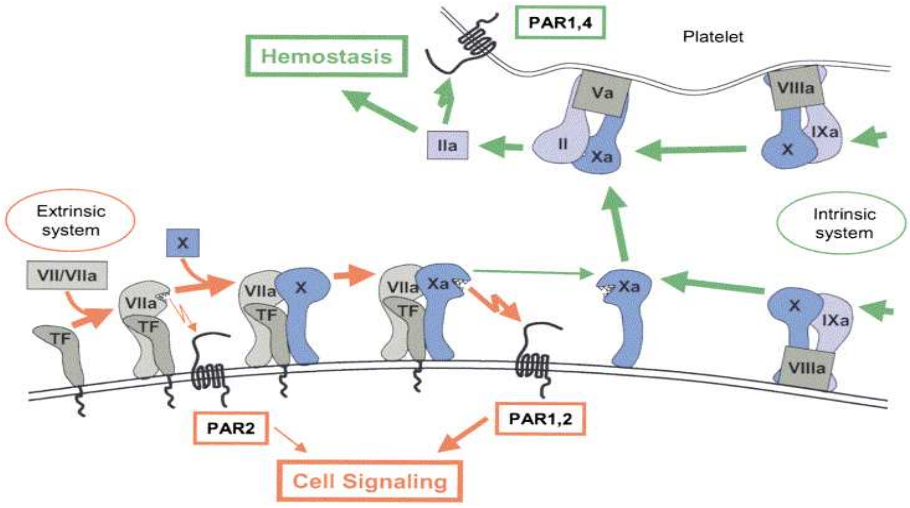

Figure 4. Evénements protéolytiques menant à l'activation des récepteurs PAR-1 et 2, orchestrés par les facteurs VIIa et Xa ancrés au TF (Riewald and Ruf, 2002).

L'activation simultanée de la voie intrinsèque permet d'obtenir du facteur Xa qui contribue à la formation du complexe de la prothrombinase à la surface membranaire des plaquettes activées et participe à l'activation de PAR1 et à la génération de la thrombine (IIa) (Figure 2). L'étude histologique de l'expression du TF dans le tissu rénal dans un modèle d'I/R rénal unilatéral chez le rat a montré une augmentation du marquage entre 0 et 12 heures de reperfusion dans les cellules endothéliales, les monocytes infiltrés ainsi que dans les cellules épithéliales de la membrane basale de la capsule de Bowman des glomérules.

Le TF semble être un point de départ à l'établissement des lésions inflammatoires et nécrotiques du tissu rénal.

Les PARs sont des récepteurs décrits depuis une dizaine d'années appartenant à la famille des RCPG (Récepteurs Couplés Aux Protéine G à sept domaines transmembranaires). Ils ont pour particularité d'être activés par le clivage de la partie N terminale du récepteur par des sérines protéases. Ceci entraîne le démasquage d'une séquence jouant le rôle de ligand. Cette dernière interagit avec le récepteur au niveau de sa deuxième boucle extracellulaire.

Quatre récepteurs PAR ont été identifiés, le récepteur de la thrombine (ou PAR1), PAR2, PAR3 et PAR4 possédant des sites de clivage en N terminal distincts (Macfarlane et al., 2001; O'Brien et al., 2001; Sevastos et al., 2007).

Les PAR1 sont activés par la thrombine (activateur non sélectif). Dans des systèmes expérimentaux, des peptides synthétiques permettant l'activation du récepteur sont utilisés pour activer de manière sélective ce récepteur. Le peptide TFLLR-amide est l'un des peptides synthétiques activateurs de PAR1. Ce récepteur entraîne l'activation et l'agrégation plaquettaire. PAR1 est couplé aux protéines $G_{12/13}$, Gi et Gq qui relayent le signal d'activation vers un réseau de voies de signalisation intracellulaire. L'activation de PAR1 contrôle de nombreuses fonctions cellulaires : la modulation du cytosquelette, l'activation des intégrines, ainsi que des réponses métaboliques et transcriptionnelles (Coughlin, 2000). PAR1 est exprimé dans les cellules endothéliales et les monocytes. PAR1 est impliqué dans les dommages de l'I/R du myocarde et l'inhibition fonctionnelle de la thrombine diminuerait l'importance des infarctus. L'absence de PAR1 chez des souris KO pour le récepteur, a montré son caractère protecteur vis-à-vis des défaillances rénales dans un modèle d'I/R (Strande et al., 2007).

La thrombine activée lors de la coagulation à la reperfusion active des cellules aux propriétés pro-inflammatoires telles que les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et les neutrophiles. Elle favorise l'infiltration et la séquestration des cellules de l'inflammation dans le parenchyme rénal. Les facteurs de la coagulation tels que le FXa, la

thrombine et le FVIIa activent les PARs et conduisent à l'expression de molécules de l'inflammation. Le facteur Xa, comme la thrombine induit la sécrétion d'une multitude de cytokines pro-inflammatoires par de nombreux types cellulaires : IL8 (Interleukine 8), IL6 (Interleukine 6) (Ruf and Riewald, 2003), IL1 (Interleukine 1) et MCP1 (CCL2) (Borensztajn et al., 2009), MIP2a (CXCL2). Certains de ces effets seraient amorcés par le relargage initial du NO (Nitric Oxyde) (Krupiczojc et al., 2008).

L'activation des PAR semble réguler le relargage du NO via eNOS (endothelial NO synthase). Des études récentes montrent que eNOS doit être phosphorylé de manière spécifique pour exercer pleinement son activité. PAR1 et PAR2 régulent de manière distincte la phosphorylation de eNOS, son activité passe par une protéine $G_{12/13}$ et une protéine Gq respectivement. Cela décrit de nouvelles voies de signalisation par lesquelles les protéases agissent sur les PAR pour moduler potentiellement les fonctions endothéliales (Suzuki et al., 2009).

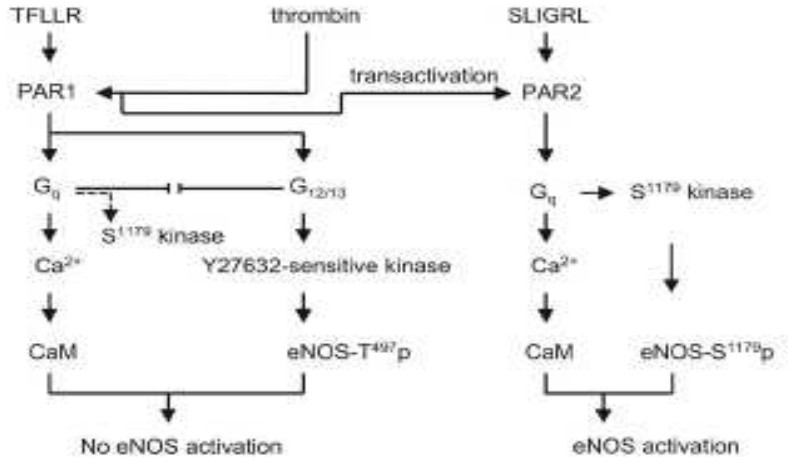

Figure 5 : Proposition de la cascade de transduction du signal de PAR1 et PAR2 dans la régulation de la phosphorylation d'eNOS dans les cellules endothéliales (Suzuki et al., 2009).

Le stress oxydant et sa régulation

Le stress oxydatif peut être défini comme un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) et l'activation des moyens de défense anti-oxydants. Les EROs sont des radicaux libres avec un électron non apparié dérivé de l'oxygène moléculaire. Les 5 principaux EROs sont l'anion superoxyde (O_2--), le radical hydroxyle (OH-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux azotés comme l'oxyde nitrique (NO) et le péroxynitrite (NO_3-). Dans des conditions physiologiques normales, les EROs sont générées pour assurer 2 grandes fonctions :

- Une défense immunitaire non spécifique par les cellules immunitaires,
- Un moyen de communication inter et intracellulaire (Kwak et al., 2003) notamment pour les cellules épithéliales.

Cependant, dans des conditions pathologiques, la production de EROs augmente à un point tel que les systèmes antioxydants sont dépassés (Wakabayashi et al., 2004).

Les conséquences d'un excès de EROs sont très variables car elles vont dépendre de 2 paramètres : la concentration en EROs et la durée d'exposition à cet excès d'EROs. Les EROs peuvent être ainsi nocifs ou bénéfiques.

Une concentration élevée d'EROs va interagir avec les différents compartiments cellulaires (les membranes lipidiques, l'ADN, la mitochondrie, effecteurs de l'homéostasie calcique) et les endommager (Keyer et al., 1995).

Le stress oxydant peut ainsi engendrer la mort cellulaire par apoptose en dégradant 3 éléments cellulaires majeurs : la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et les membranes lipidiques.

Les EROs vont altérer le rôle de contrôle et de correction de la bonne conformation protéique du réticulum endoplasmique et l'accumulation de protéines « mal conformées » va entraîner une saturation des systèmes de contrôle (notamment le système des ubiquitines) et mettre la cellule sur la voie de l'apoptose (Friguet, 2006).

Les acides gras polyinsaturés sont une autre cible des EORs. La péroxydation lipidique qui en résulte va altérer les membranes des mitochondries et de la cellule avec une destruction de celle-ci.

Les mitochondries sont une source majeure de production d'EROs. Dans les mitochondries, le radical superoxyde O_2-- peut être produit par des complexes respiratoires, des enzymes sur les membranes mitochondriales (externe et interne) et dans la matrice (Grune, 2002). La production non enzymatique de O_2-- se produit principalement dans les mitochondries, en particulier au niveau des complexes I et III de la chaîne de transport de l'électron (Turrens, 2003).

Plusieurs systèmes enzymatiques intracellulaires sont aussi à l'origine de la formation de radicaux superoxyde : les oxydases NADPH, xanthine oxydase et oxygénases dépendantes du cytochrome P450 (Babior, 2000; Goeptar et al., 1992; Yokoyama et al., 1990).

Toute condition qui entraîne une surconsommation d'oxygène peut conduire à la production de radicaux. On estime que jusqu'à 1 à 5 % de l'oxygène qui passe par le chaîne de transport de l'électron à l'intérieur des mitochondries, produit de l'O_2-- (McCord, 2000). Dans des conditions pathologiques, O_2-- peut réagir avec le fer par la réaction de Fenton, pour produire des OH- toxiques et hautement réactifs, conduisant à une production plus importante de radicaux libres. OH- est également formé à partir de H_2O_2 par la réaction de Fenton (Wardman and Candeias, 1996) ou à partir de O_2-- par une autre réaction dépendante des

métaux de transition, appelée réaction de Haber-Weiss catalysée par le fer (Kehrer, 2000). Elle est considérée comme l'ERO la plus réactive (Lubec, 1996).

Les antioxydants ont été définis comme des substances capables, à des concentrations relativement faibles, d'inverser significativement la production et les effets des EROs.

Le rôle physiologique des antioxydants est de prévenir les dommages cellulaires résultant de la production de radicaux libres. Cependant, dans de nombreux états pathologiques, les mécanismes qui préviennent ou limitent les dommages causés par les EROs peuvent devenir inadéquats.

Les antioxydants agissent en :

- Prévenant la formation d'EROs,
- Eliminant ou en favorisant la décomposition des EROs,
- Limitant les lésions tissulaires induites par les EROs (Halliwell, 1996; Sies, 1993).

Les systèmes de réponse antioxydante sont basés sur un système enzymatique avec deux enzymes principales : la superoxyde dismutase intracellulaire et la catalase, et un système non enzymatique qui comprennent les vitamines C, E, A et le glutathion (Grune, 2002; Young and Woodside, 2001).

L'une des voies de modulation de la voie enzymatique de réponse au stress oxydant est celle impliquant sirtuine 1 (SIRT1) et nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2).

La famille des sirtuines comprend sept membres (Michan and Sinclair, 2007). Ces isoformes ont en commun une séquence conservée de 275 acides aminés correspondant au domaine portant l'activité catalytique. Les sirtuines ont différentes fonctions et différentes

localisations cellulaires. Par exemple SIRT1 est localisée dans le cytoplasme et SIRT3 dans la mitochondrie. SIRT1 a une activité enzymatique de déacétylase dépendante du NAD+.

Bien que cette notion soit débattue, l'activité de SIRT1 serait modulée par le stress oxydant. Le sens de cette modulation fait l'objet de controverses avec des données en faveur d'une augmentation de l'activité de SIRT1 (Kim et al., 2007; Prozorovski et al., 2008) en cas de stress oxydatif et d'autres au contraire en faveur d'une diminution (Gu et al., 2013; Yang et al., 2007). En agissant sur une protéine nucléaire co-activatrice, le peroxysome proliferator activator receptor ϒ coactivator-1α (PGC-1α), impliquée dans la mise en place du programme transcriptionnel lié au métabolisme énergétique mitochondrial et NRF2, SIRT1 permet l'expression de la réponse enzymatique au stress oxydant (Radak et al., 2013).

Le NRF2 est un important facteur de transcription sensible au potentiel redox. Il permet de moduler une réponse cellulaire au stress oxydant en induisant l'expression des gènes codant pour des protéines anti-oxydantes et de détoxifications par sa liaison à l'élément de réponse anti-oxydant (ERA). On trouve NRF2 dans de nombreux tissus et particulièrement dans les reins. Dans des conditions normales, le NRF2 est séquestré par Keap1. Keap 1 est sensible aux EROs car il dispose de cystéines réactives. Keap1 est un régulateur clé de la voie de signalisation NRF2 et sert de commutateur moléculaire pour activer et désactiver la réponse anti-oxydante régulée par NRF2 (Kwak et al., 2003).

Les familles de gènes régulés par la voie NRF2 comprennent les enzymes NAD(P)H quinone 1, Heme oxydase 1, les antioxydants (Superoxyde dismutase SOD, catalase CAT, Gluthation peroxydase GPx), les enzymes génératrices de NADPH et les enzymes réparatrices d'ADN. Dans l'ensemble, ces 50 gènes anti-oxydants jouent généralement un rôle important dans la protection des membranes cellulaires contre le stress oxydatif, la réparation de l'ADN et les dommages protéiques.

mTOR et la pathologie rénale

La mechanistic target of rapamycin (mTOR) fonctionne dans au moins deux complexes multiprotéiques distincts : le complexe mTOR1 (mTORC1) et le complexe mTOR2 (mTORC2). mTORC1 est souvent décrit comme un " capteur de nutriments " car il peut être activé par les acides aminés et inhibé par un stress oxydatif important et un épuisement des réserves énergétiques.

Les rôles principaux de mTOR sont de faciliter la croissance cellulaire et l'anabolisme ainsi que de prévenir l'autophagie. Bien que mTORC1 ait d'abord été localisé au cytoplasme, ce complexe a depuis été identifié dans d'autres compartiments cellulaires (membranes mitochondriales externes et noyau (Flinn et al., 2010; Yadav et al., 2013)) et il a été démontré qu'il joue un rôle dans la formation de granules de stress (Fournier et al., 2013). Ces résultats fournissent d'autres preuves que mTOR est un rhéostat métabolique pour les cellules eucaryotes. Les facteurs de croissance et les cytokines peuvent activer mTORC1 via la signalisation en amont par la phosphoinositide 3 kinase (PI3K).

Conformément à ces cascades de signalisation, les processus orchestrés par mTORC2 comprennent la survie cellulaire, la synthèse protéique, la réorganisation du cytosquelette de l'actine et l'homéostasie du sodium. Bien que le mTORC2 actif s'associe physiquement aux ribosomes dans les cellules de mammifères, les complexités de cette voie n'ont pas été complètement caractérisées (Zinzalla et al., 2011). De plus mTORC1 inhibe la voie PI3K-mTORC2 par un mécanisme de rétroaction négative ce qui complexifie la compréhension des voies de régulation de mTOR.

Étant donné l'expression omniprésente de mTORC1 et de mTORC2 dans le rein, il est très difficile d'élucider le rôle de mTOR dans la physiologie rénale. Néanmoins, l'inhibition

pharmacologique et la délétion génétique ciblée de cellules spécifiques ont permis d'analyser la fonction mTOR chez le rongeur et le rein humain.

Dans le cadre de la transplantation et de la séquence d'ischémie/reperfusion qui l'accompagne, les données sur l'effet d'une inhibition de mTOR sur les reprises de fonction post-greffe ne permettent pas de conclure. En effet, les effets positifs et négatifs potentiels du traitement par inhibiteur de mTOR ont d'abord été mis en évidence chez les receveurs d'allogreffes rénales (Loverre et al., 2004; McTaggart et al., 2004; Smith et al., 2003). Sur une cohorte rétrospective de 144 patients, ceux traités par inhibiteur de mTOR présentaient plus de reprises retardées de fonction (25% vs 8,9%, p=0.02) avec sur les biopsies plus de lésions tubulaires (Smith et al., 2003). Dans une cohorte retrospective, le sirolimus était un facteur indépendant de reprise retardée de fonction post-greffe (McTaggart et al., 2004). Toutefois, dans tous les essais prospectifs randomisés publiés à ce jour, aucune association entre le traitement par la rapamycine et une diminution du débit de filtration glomérulaire n'a été rapportée, ce qui pondère les données comparatives rétrospectives. Pour mieux comprendre les effets des inhibiteurs de mTOR sur les cellules tubulaires rénales et les cellules endothéliales vasculaires, ainsi que sur les cellules immunitaires locales et systémiques, des modèles de rongeurs d'ischémie/reperfusion (I/R) et différents modèles de transplantation rénale ont été utilisés. La aussi les résultats sont contradictoires avec des études précliniques faisant état d'un effet délétère de l'inhibition de mTOR (Fuller et al., 2003; Gonçalves et al., 2007) par le biais de l'effet antiprolifératif qui limiterait les mécanismes de réparation cellulaire post-greffe (Lieberthal et al., 2001), et d'autres qui démontrent le contraire avec un effet protecteur de cette inhibition de mTOR (Cicora et al., 2010; Inman et al., 2003).

Les trois facteurs de confusion les plus probables ayant contribué à ces résultats contradictoires étaient probablement le groupe témoin choisi, le moment de l'administration de l'inhibiteur mTOR et le moment de l'analyse.

La plupart des études qui ont utilisé un groupe placebo ont rapporté des effets indésirables après l'administration d'un inhibiteur de mTOR (Fuller et al., 2003; Lui et al., 2006). Par contre, les études qui ont comparé les inhibiteurs de mTOR à d'autres inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine) ont rapporté des résultats bénéfiques de l'inhibition de mTOR qui peuvent s'expliquer principalement par le fait d'éviter les effets délétères de la ciclosporine sur la microcirculation rénale (Inman et al., 2003; Yang et al., 2005). De plus, un effet de préconditionnement de l'inhibition de mTOR avant la transplantation a été observé dans le cadre de transplantations rénales expérimentales ; le traitement du donneur avec une dose unique de rapamycine avant néphrectomie a amélioré la fonction des greffons (Cicora et al., 2012).

Un autre facteur de confusion important dans les études sur les inhibiteurs de mTOR dans l'insuffisance rénale aiguë est le moment de l'analyse après l'I/R. Les études qui ont fait état d'un effet indésirable de l'inhibition de mTOR ont analysé les reprises de fonction précoses et les lésions rénales notamment tubulaires, tandis que celles qui ont analysé des paramètres similaires (débit de filtration glomérulaire, lésions histologiques) beaucoup plus tard (jusqu'à 16 semaines après la séquence d'I/R initiale) ont montré des effets bénéfiques (Gonçalves et al., 2006; Viklický et al., 2004; Yang et al., 2005). Malheureusement, seules quelques études ont exploré les mécanismes qui sous-tendent les effets observés. Les lésions d'I/R impliquant mTOR entraîneraient une réduction de la prolifération cellulaire et une l'augmentation de l'apoptose. Néanmoins l'inhibition de mTOR influencerait l'autophagie et les effets sur le système anti-oxydatif et pourraient être responsables des effets bénéfiques tardifs des inhibiteurs mTOR en I/R (Kezic et al., 2013; Nakagawa et al., 2012).

Le rôle de mTOR dans l'induction et la progression de la pathologie de l'insuffisance rénale avec fibrose est moins bien décrit que celui de mTOR dans l'insuffisance rénale aiguë. Des résultats concordants indiquent que l'utilisation de la rapamycine à la suite d'une lésion

rénale, quelle qu'en soit l'étiologie (notamment en cas de lésion d'I/R et en transplantation) réduit le développement ultérieur de la fibrose interstitielle et/ou l'expression de gènes liés à la fibrose (Jain et al., 2001; Jolicoeur et al., 2003). Lors d'une stimulation de voie pro-fibrosante par TGFβ, mTOR est activé. L'inhibition de mTOR dans ce contexte induit une diminution de l'expression de la fibronectine et de l'actine du muscle lisse (Li et al., 2015).

Des modèles de transplantation rénale de rongeurs entièrement appariés ont également été utilisés pour évaluer le rôle du mTOR dans la néphropathie chronique post-allogreffe. Comme dans d'autres modèles de lésions rénales chroniques, l'inhibition de mTOR chez ces animaux a amélioré la protéinurie et la glomérulosclérose (Koch et al., 2007; Viklický et al., 2000), réduit l'infiltrat inflammatoire (Lutz et al., 2003) et diminué l'expression des facteurs pro-fibrotiques (Luo et al., 2013; Lutz et al., 2003).

2) Fragilité des greffons liée au type de donneur

Les donneurs décédés après mort encéphalique : les donneurs à critères élargis

L'évolution épidémiologique de l'âge et des pathologies cardiovasculaires des donneurs est associée à la nécessité d'augmenter le pool de greffons face à la pénurie. En France, l'âge moyen des donneurs est passé de 37 ans en 1996 à 42,1 ans en 2001 (Eggers, 1988) et est de 58,3 ans en 2017. Actuellement la proportion de donneurs prélevés âgés de plus de 65 ans entre 2000 et 2017 a été multipliée par un facteur 6 et ils représentent 41,3% des donneurs (ABM, 2017). En 2005, 26,8 % des donneurs étaient âgés de plus de 60 ans (Gridelli and Remuzzi, 2000) alors qu'aujourd'hui cette proportion s'est inversée avec seulement 26,2% des donneurs dans la tranche d'âge 18-49 ans. Cette évolution des caractéristiques des donneurs décédés après mort encéphalique a conduit au début des années 2000 à rechercher des facteurs associés à une diminution de la survie des greffons. Ainsi en se

basant sur une analyse rétrospective du registre nord-américain UNOS (United Network for Organ Sharing), quatre facteurs ont été identifiés comme étant indépendamment liés à un moins bon devenir des greffons : l'âge du donneur supérieur à 40 ans ou inférieur à 10 ans ; une fonction rénale définie par une créatinine supérieure à 150µmol/L ; une histoire d'hypertension artérielle ; un décès par accident vasculaire cérébral (Nyberg et al., 2003). Ces données ont permis de définir une catégorie de donneurs dit « à critères élargis » qui est constituée par les donneurs dont l'organe présente un risque relatif de non reprise de fonction primaire supérieure > 1,7 par rapport à un greffon idéal. Les donneurs ainsi identifiés sont tous les donneurs de 60 ans et plus et ceux de 50 à 59 ans avec au moins deux facteurs de risque associés parmi les trois suivants : un décès de cause cérébro-vasculaire, un antécédent d'hypertension artérielle et une créatinine supérieure à 150µmol/L lors du prélèvement (Hariharan et al., 1997). Ces données ont été par la suite confirmées par l'analyse de nombreuses cohortes notamment en France (Pessione et al., 2003). En 2007, environ 30 % des transplantations rénales étaient réalisées à partir d'un donneur à critères élargis contre 50,1% en 2017 (ABM, 2017).

Ces chiffres sont importants car les greffons issus de DME dit à critères élargis sont plus fragiles.

Sans prise en charge spécifique du greffon, le devenir des patients greffés avec ces reins ont une évolution moins favorable, avec un taux annuel de mortalité de 100 pour 1000 patients-années dans le cas d'une greffe à partir d'un donneur à critères élargis contre 48 pour 1000 patients-années en cas de greffe avec un rein standard (Pessione et al., 2003). Plusieurs équipes ont ainsi montré que la mortalité à 1 an et 5 ans était supérieure dans les cohortes de patients greffés avec des reins issus de donneurs à critères élargis (9,4% vs 5,5% à 1 an et 18,8-20 % vs 26-31% à 5 ans). Néanmoins la mortalité des patients en attente sur liste de greffe est toujours supérieure à celle des patients greffés avec des reins issus de donneurs à

critères élargis (Metzger et al., 2003). L'origine de cette surmortalité est probablement d'origine cardio-vasculaire.

De plus ces greffons issus de donneurs à critères élargis présentent une survie moindre par rapport à celle des greffons optimaux avec une survie inférieure de 5 à 15% (Chertow et al., 1996; Pessione et al., 2003; Wolfe et al., 1999).

Ce devenir pourrait trouver son explication dans une susceptibilité plus importante de ces greffons aux lésions d'ischémie/reperfusion et notamment au stress oxydant (Tabriziani et al., 2018).

L'une des approches ces dernières années a consisté à utiliser pour ces greffons des systèmes de conservation dynamiques via des machines de perfusion rénale et l'optimisation des solutions de conservation (Kerforne et al., 2016).

Les donneurs décédés après mort encéphalique : le stress oxydant

Lors du passage en mort encéphalique, les organes sont soumis à diverses agressions secondaires à la perturbation majeure de l'homéostasie de l'organisme (système cardio-vasculaires, endocrinien, immunitaire, respiratoire, sanguin) (Pinsard et al., 2013).
L'une des conséquences de ces agressions est le déséquilibre de la balance génération/destruction d'espèces oxydantes radicalaires entraînant *de facto* un stress oxydant.
Expérimentalement chez le porc, il a été montré que les animaux chez qui était provoquée une mort encéphalique induisait l'expression de la nitrotyrosine reflétant un stress oxydatif (Stiegler et al., 2013).

Le stress oxydant est responsable des lésions rénales aiguës et chroniques (Tabriziani et al., 2018). De manière cumulative le processus de prélèvement, de conservation et de greffe de par la séquence obligatoire d'ischémie/reperfusion génère aussi un stress oxydatif

responsable de lésions des membranes cellulaires et des organelles, de lésions de l'ADN et de dysfonction des protéines conduisant à l'apoptose cellulaire et *in fine* une destruction néphronique.

Les donneurs décédés après arrêt circulatoire : l'ischémie chaude

Les donneurs décédés après arrêt circulatoire bien qu'indispensable comme nouvelle source de greffons donnent accès à des reins soumis à une période prolongée d'ischémie chaude. En effet de par leur nature les reins issus de ces donneurs sont soumis à un arrêt circulatoire relativement prolongé et donc à une ischémie à température corporelle. Bien que cette période doive être la plus courte possible, elle peut aller de 30 minutes dans le cadre des DDAC de classe I, II et IV de Maastricht à 120 minutes pour les DDAC de la classe III de Maastricht (l'ischémie chaude fonctionnelle définie par le moment ou la pression artérielle moyenne passe en dessous de 45 mmHg jusqu'au démarrage de la CRN dans le protocole français).

Objectifs et méthode

I. Objectifs du travail

La pénurie de greffons rénaux nécessite de recourir à diverses stratégies permettant d'augmenter le nombre de reins prélevés et greffés. Les mesures ayant permis d'augmenter le nombre de greffons est le développement des prélèvements sur des donneurs décédés après arrêt circulatoire et l'utilisation de greffons issus de donneurs décédés après mort encéphalique dit à critères élargis. 9,7% des reins prélevés n'ont pas été greffés et la raison principale de prélèvement non suivi d'une greffe est la mauvaise qualité du greffon.

De plus les organes prélevés chez les donneurs décédés après arrêt circulatoire ou de donneurs à critères élargis sont plus sujets aux lésions d'ischémie/reperfusion.

Une première partie ce travail de thèse a eu pour but d'étudier certains mécanismes physiopathologiques chez le donneur :

- L'impact de la cinétique de passage en mort encéphalique sur la reprise de fonction primaire et les lésions chroniques des greffons rénaux en explorant l'intensité du stress oxydant et la réponse anti-oxydante associée ;
- Les mécanismes sous-tendant le reconditionnement des reins par CRN lors de la prise en charge des donneurs décédés après arrêt circulatoire et la durée optimale de celle-ci sans intervention.

La deuxième partie de ce travail de thèse a eu pour objectif d'évaluer des stratégies innovantes de reconditionnement :

- Chez le donneur décédé après mort encéphalique en utilisant une molécule modulant les effets du stress oxydant ;

- Chez le donneur décédé après arrêt circulatoire en utilisant une molécule bloquant les voies de la coagulation et *in fine* de l'inflammation.

Ces travaux réalisés chez des modèles porcins de donneurs de reins (DME et DDAC) sont d'une part translationnels car touchant à des phénomènes liés à l'ischémie/reperfusion (stress oxydatif, coagulation, inflammation) et d'autre part réalisés sur des modèles précliniques très proches de l'homme permettant potentiellement une application clinique rapide.

II. Méthode

1. Modèles porcins de donneurs

Toutes les expérimentations animales ont été réalisées conformément aux recommandations de l'Animal Reasearch Reporting of In Vivo Experiments (A.R.R.I.V.E.) et ont été appouvées par le comité d'éthique d'expérimentation animale du Poitou-Charentes. Il s'agissait de porcs de race large white de 40±4kg (MOPICT IBiSA Plateforme, INRA Magneraud, Surgères, France).

1) Modèle de donneur décédé après mort encéphalique :

La prémédication est réalisée par du Midazolam IM 0,05mg/kg 20 min avant le début de l'expérimentation. Les porcs étaient anesthésiés avec une induction inhalatoire par un mélange de Sévoflurane 8% et d'oxygène. Après la perte de conscience, un cathéter 20G était mis en place dans une veine de l'oreille et l'anesthésie était approfondie par l'injection de Propofol 3mg/kg, Fentanyl 1µg/kg, Kétamine 1mg/kg et Rocuronium 1mg/kg. La prise en charge des voies respiratoires était assurée par la mise en place d'une sonde d'intubation orotrachéale taille 6,5 (Hi-Contour, Mallinckrodt Medical™, Athlone, Ireland). Les porcs étaient ventilés avec un Servo 900C™ (Siemens, Solna, Suède) en mode volume contrôlé avec un volume courant de 8ml/kg. La fréquence respiratoire était ajustée pour obtenir une $PaCO_2$ entre 35 et 40mmHg avec FiO_2 à 50%, pression expiratoire positive de 5cm d'H_20 et un rapport I/E à 1/3. Aucune manœuvre de recrutement alvéolaire n'était réalisée.

L'entretien était poursuivi par l'administration de Propofol à 3mg/kg/h, Fentanyl 1,5µg/kg/h et Rocuronium 1mg/kg de manière itérative adaptée au comportement de l'animal. Un cathéter artériel fémoral et une voie veineuse centrale jugulaire interne étaient mis en place chirurgicalement puis le monitorage était assuré par PICCO1® Edward (Pulsion medical

system, Irving, USA). Un cathéter sus-pubien était mis en place après incision vésicale avec mesure horaire de la diurèse.

Le passage en état de mort encéphalique était provoqué par la réalisation d'un trou de trépan à 10cm de la ligne coronale et à 10cm de la ligne sagittale au niveau de la zone frontale, puis le décollement dure-mérien et l'insertion d'une sonde de Foley Ch 18, dans l'espace épidural. Celle-ci était gonflée au sérum physiologique selon le modèle de Purins (Purins et al. 2011).

- L'induction progressive de la mort encéphalique était provoquée par l'inflation du ballonnet de la sonde de Foley selon la séquence de 5ml à 0 min, puis déflation de 5ml à 10 min, inflation de 10ml à 20 min, déflation de 5ml à 30 min, inflation de 10 ml à 40 min, déflation de 5ml à 50 min, inflation de 10ml à 60 min jusqu'au passage en mort encéphalique.
- L'induction brutale de la mort encéphalique était provoquée rapidement par l'inflation du ballonnet de la sonde de Foley de 20ml en 5 minutes

Les animaux étaient monitorés par un électroencéphalogramme (E.E.G.) 2 dérivations. Le diagnostic de mort encéphalique était fait d'une part sur la base de l'examen clinique avec la survenue d'une mydriase bilatérale aréactive, la disparition des réflexes cornéens, abolition de la ventilation spontanée après test d'hypercapnie et sur la mise en évidence d'un E.E.G. plat.

Les sédations étaient arrêtées au moment de la validation de la mort encéphalique. La réanimation a consisté à maintenir une pression artérielle moyenne supérieure à 70mmHg, une hématose normale sous ventilation mécanique (Volume courant 8ml/kg), une diurèse entre 10 et 15ml/kg/h. Le remplissage vasculaire à l'aide de cristalloïdes était guidé par les variations du volume d'éjection (VVE). Le support hémodynamique était réalisé par noradrénaline IVSE. La survenue d'une polyurie attribuée à un diabète insipide d'origine central lors du passage en mort encéphalique était traitée par de la Desmopressine à faible dose. La nécessité

d'augmenter les doses de noradrénaline au-dessus de 0,3µg/kg/min motivait l'administration d'hydrocortisone à 1mg/kg/h.

La réanimation après le passage en mort encéphalique était poursuivie 4h.

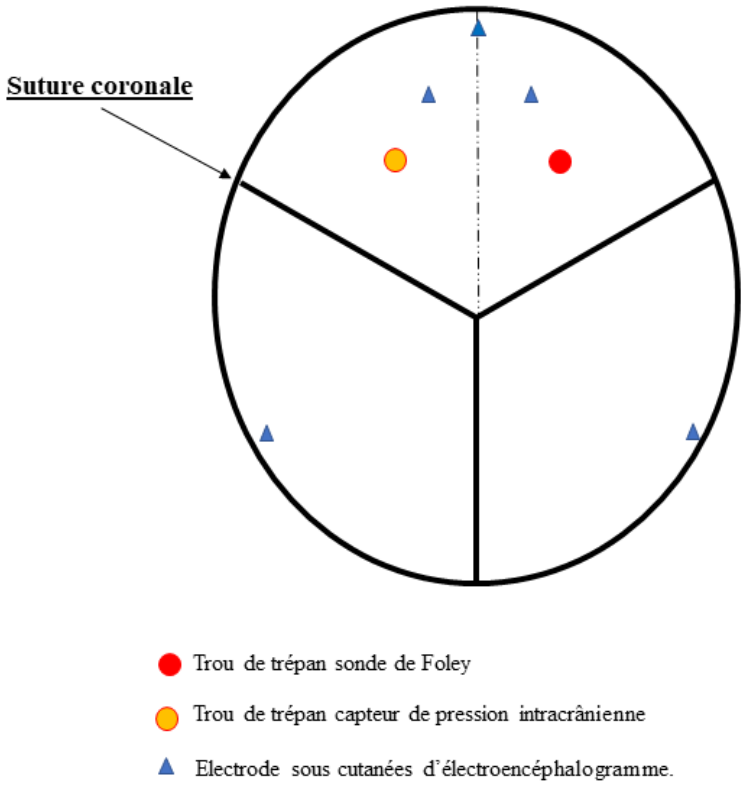

Figure 6. Schéma de mise en place de la sonde de Foley générant la mort encéphalique et l'électroencéphalogramme dans le modèle porcin de DME.

2) Modèle de donneur décédé après arrêt circulatoire

L'induction anesthésique est réalisée par un mélange de protoxyde d'azote et d'oxygène 50/50 associé à du sévoflurane 8% et relayé par de l'isoflurane 2,5%. L'animal est alors scopé (moniteur M1092A Hewlett Packard). Les pertes hydrosodées sont compensées par une perfusion d'hydroxyéthylamidon (HEA). Une intubation oro-trachéale (Hi-Contour™, Mallinckrodt Medical) est alors réalisée sous contrôle laryngoscopique. La

ventilation contrôlée est pratiquée avec une fréquence respiratoire de 16/min (respirateur LKB médical d'Engström system 300) et maintien d'un taux de CO_2 expiré entre 35 et 45mmHg (moniteur CapnomacUltima, Datex-Ohmeda). Une sonde gastrique à double courant 14Fr (Vygon) est mise en place. La curarisation de l'animal est obtenue par l'administration initiale de rocuronium 1,5mg/kg. L'analgésie per-opératoire est réalisée par l'injection intraveineuse de fentanyl 1µg/kg.

La circulation régionale normothermique est mise en place après abord vasculaire chirurgical de l'aorte abdominale et de la veine cave inférieure.

Un arrêt cardiaque est alors provoqué par injection intraveineuse de 2g de chlorure de potassium. L'arrêt cardiaque est authentifié par l'absence d'activité électrique sur l'enregistrement continue de l'électrocardiogramme. Après 30 minutes, l'aorte descendante est clampée.

L'animal reçoit un bolus d'héparine non fractionnée (molécule inhibitrice du FIIa). Celui-ci est déterminé par la machine Hepcon® HMS Plus (Medtronic France) avec comme objectif un temps de coagulation activé (ACT) supérieur à 200 secondes. Cette valeur, valable en clinique, a été retenue chez l'animal. La CRN est alors amorcée progressivement pour atteindre le débit recherché en 3 à 5 minutes.

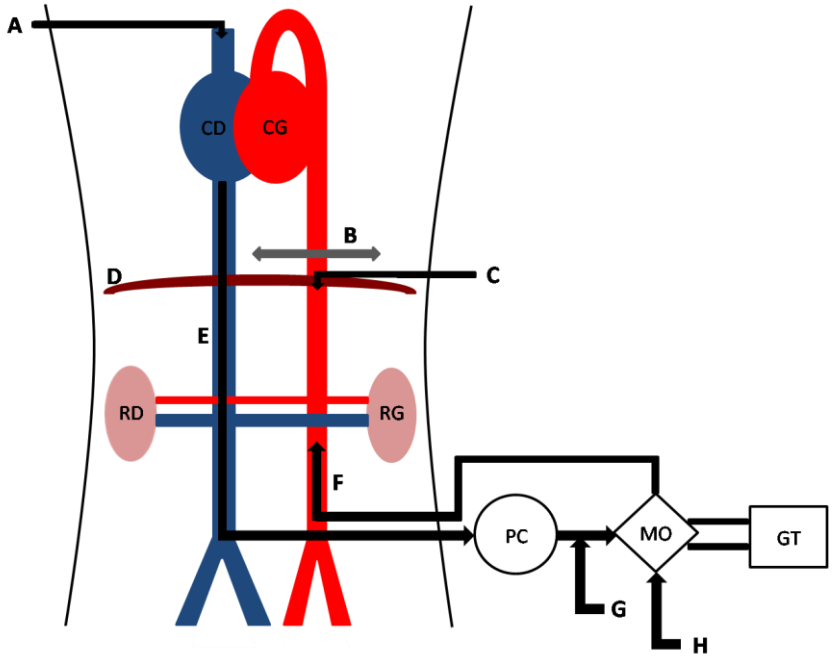

Figure 7. Schéma du modèle porcin de circulation régionale normothermique. A : voie veineuse centrale, B : clamp aortique, C : cathéter artériel, D : diaphragme, E : canule veineuse dans la veine cave inférieure, F : canule artérielle dans l'aorte, G : ligne de remplissage, H : entrée des gaz, PC ; pompe centrifuge, CG : cœur gauche, CD : cœur droit, RD : rein droit, RG : rein gauche, GT : groupe thermique, MO : membrane d'oxygénation.

Paramètres	Objectifs		Facteurs correctif
Débit de pompe	2-3l/min (50% débit théorique)	Fréquence de surveillance Surveillance continue	Remplissage de 10ml/kg/h
Pression artérielle moyenne	> 60 mmHg		Perfusion continue de noradrénaline
Pression veineuse centrale	<5mmHg		-
pH	7.5	Prélèvement sanguin toutes les 30 min	Administration continue de bicarbonate 1,4‰
Pression partielle artérielle en CO2	30-40 mmHg		Variation du balayage de la membrane
Pression partielle artérielle en O2	100-150 mmHg		Ajustement de la FiO2
Acitvated clotting time	>200 sec		Bolus de 5000 UI d'héparine sodique

Tableau 4. Réglages et objectifs hémodynamiques de la circulation régionale normothermique.

3) Modèle d'allo-transplantation rénale

Après conservation, le rein gauche était allo-transplanté à un porc compatible sur le "swine leukocyte antigen" (SLA) et ayant été bi-néphrectomisé au préalable. L'allo-transplantation hétérotopique était réalisée sur un porc anesthésié *via* une incision médiane. Le greffon était anastomosé directement par son artère et sa veine sur l'aorte abdominale et la veine cave inférieure. Enfin une anastomose urétéro-urétérale était réalisée sur une sonde double J. Après la transplantation, le porc greffé était placé dans une cage métabolique pour recueillir les urines et les échantillons sanguins pendant 7 jours. Il rejoignait ensuite un box individuel pendant 3 mois.

2. Analyses des échantillons

Les différentes techniques d'analyse utilisées dans les études (RT-PCR, Western-Blot, ELISA, immuno-histochimie, anatomopathologie) sont détaillées dans les articles présentés.

Partie I : Modélisation et description physiopathologique

1) Article 1 :

Kerforne T., Giraud S, Thuillier R, Danion J, Couturier P, Hebrard W, Mimoz, Thierry Hauet. Rapid or slow time to brain death declaration: Impact on kidney graft injuries in an allotransplantation porcine model. Article soumis à Disease models & mechanisms.

Rappel des objectifs et hypothèses :

Dans la littérature, les différents modèles animaux sont essentiellement des modèles murins avec leurs limites en ce qui concerne les reins, et des modèles induisant la mort encéphalique brutalement. Les données issues de ces modèles sont parfois contradictoires par rapport à ce qui retrouvé chez l'homme.

Une étude expérimentale récente s'est intéressée à l'impact de la cinétique de passage en mort encéphalique sur les différents organes intra-abdominaux (reins et foie) avec des résultats mettant en évidence une différence sur l'expression de molécules d'adhérence forte, de protéines inflammatoires et sur la balance survie cellulaire/apoptose.

Mais cette étude s'est basée sur un modèle murin ce qui conduit à interpréter les résultats avec prudence et n'a pas été jusqu'à la greffe.

Notre objectif est d'évaluer l'impact de la cinétique d'induction de la mort encéphalique sur la reprise de fonction primaire du greffon et dans la genèse de lésions chroniques tissulaires de type fibrose chez un modèle porcin de donneur décédé après mort encéphalique.

Nous avons supposé que l'on observerait une différence de reprise de fonction primaire et dans l'intensité de la fibrose à 3 mois.

Nous avons choisi de décrire l'hémodynamique per-réanimation avec des déterminants précis du transport en oxygène, l'intensité du stress oxydant et de sa réponse ainsi que son influence sur mTOR.

Données non publiées:

Nous avions aussi émis l'hypothèse que s'il y avait différence dans la reprise de fonction post-greffe selon la cinétique d'induction de la mort encéphalique, elle pourrait

s'expliquer par une activation différente de la coagulation et par voie de conséquence, de l'inflammation.

Le tissu cérébral et notamment les astrocytes contiennent de grandes quantités de facteurs tissulaires. Nous avons donc mesuré par une technique d'ELISA les concentrations plasmatiques de facteur tissulaire au cours des procédures d'induction de mort encéphalique et des périodes de 4 heures de réanimation avant prélèvement. En parallèle, nous avons mesuré les concentrations plasmatiques du complexe thrombine-antithrombine reflétant la génération de thrombine secondaire à initiation de la coagulation.

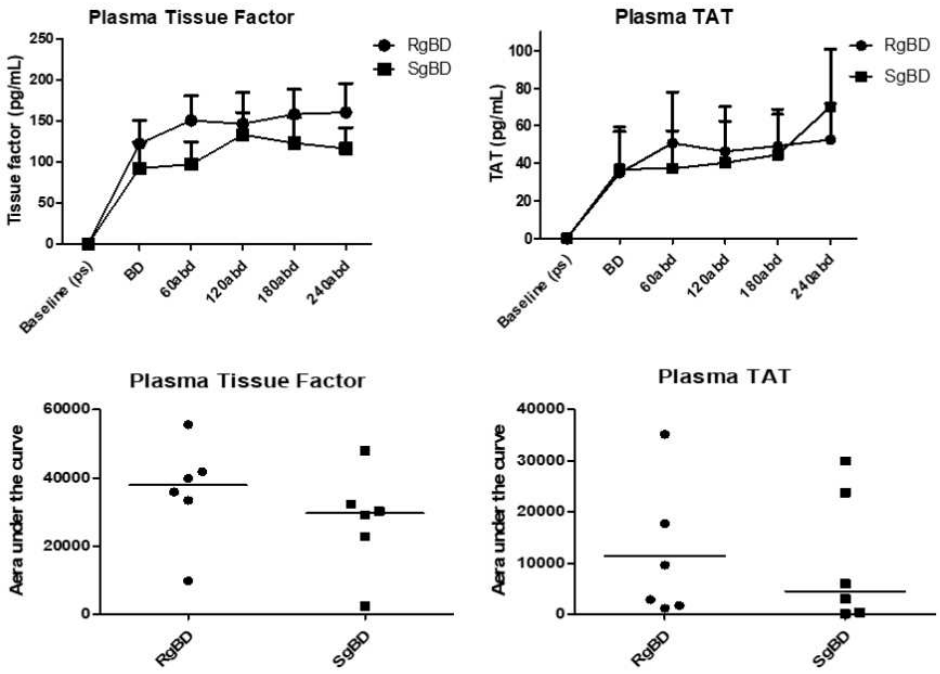

Figure 8. Cinétique des concentrations plasmatiques de facteur tissulaire (TF) et complexes thrombine-antithrombine (TAT) pendant les procédures d'induction de ME et de réanimation pré-prélèvements rénaux. Les concentrations de TF et TAT augmentent brutalement au moment de la ME puis restent stables au cours de la réanimation des porcs jusqu'au prélèvement. Les aires sous la courbe des différentes cinétiques issues des 2 groupes expérimentaux ne sont pas significativement différentes. (RgBD: Rapidly generated Brain Death, SgBD: Slowly generated Brain Death, Baseline ps: Baseline pooled sample, abd: after brain death).

Nous avons analysé le tissu rénal en fin de réanimation sur les protéines du facteur tissulaire qui est synthétisé de manière constitutive mais qui est activé par phosphorylation, et de la thrombomoduline qui va venir moduler la réponse endothéliale à l'activation de la coagulation.

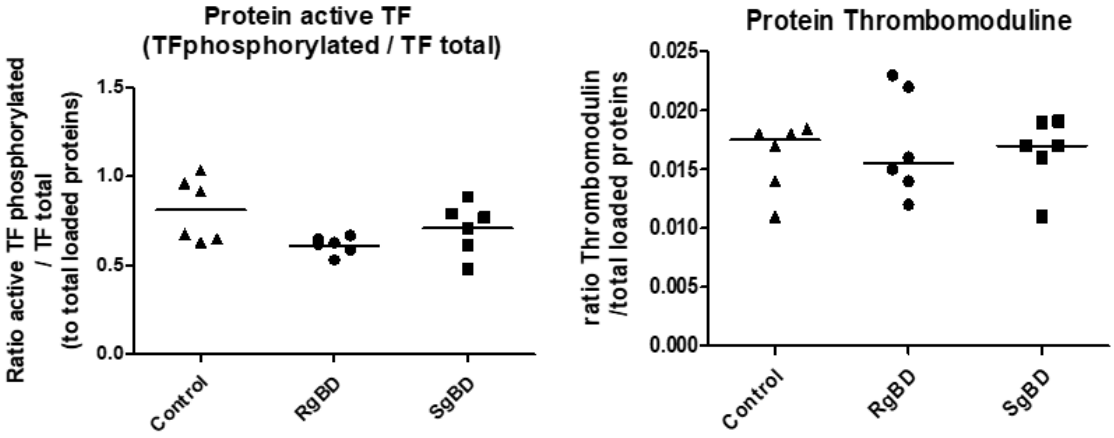

Figure 9. Expression en protéine du facteur tissulaire rénale représenté par le ratio de sa forme activée par phosphorylation sur le facteur tissulaire total et de la thrombomoduline. Il n'y a pas de différence mise en évidence entre les 2 groupes expérimentaux et les protéines issues de reins contrôles.

Ces résultats mettent en évidence une activation de la coagulation par relargage massif de facteur tissulaire (voie extrinsèque) secondaire aux lésions cérébrales expérimentales entrainant la mort encéphalique. Néanmoins nous n'avons pas mis en évidence de différence quant aux cinétiques de concentrations plasmatiques de facteurs tissulaires ni d'un des produits de dégradation reflétant l'intensité de la génération de thrombine, i.e., les complexes thrombine-antithrombine. L'analyse tissulaire quant à elle n'a pas montré de différence entre les reins issus d'animaux ayant subi une mort encéphalique et les reins contrôles.

Ces résultats nous ont conduits à écarter l'implication des phénomènes liant coagulation et inflammation dans la différence observée sur les reprises de fonction précoce des greffons rénaux en fonction de la cinétique de passage en mort encéphalique.

Publication

Rapid or slow time to brain death? Impact on kidney graft injuries in an allotransplantation porcine model.

Thomas Kerforne [1,2,3 *], Sébastien Giraud [3,4, 5*], Raphael Thuillier [3,4,5], Jérôme Danion [6], Pierre Couturier [3,4,7], William Hebrard [7,8], Olivier Mimoz, Thierry Hauet [3,4,5,7].

[1] CHU Poitiers, Coordination des prélèvements d'organe et de tissus, Poitiers, F-86000, France

[2] CHU Poitiers, Département d'anesthésie-réanimation, Poitiers, F-86000, France;

[3] INSERM U1082 (IRTOMIT), Poitiers, F-86000, France ;

[4] CHU Poitiers, Service de Biochimie, Poitiers, F-86000, France;

[5] Université de Poitiers, Faculté de Médecine et Pharmacie, Poitiers, F-86000, France ;

[6] CHU de Poitiers, Service de Chirurgie viscérale, Poitiers, F-86000, France.

[7] IBiSA 'plate-forme MOdélisation Préclinique - Innovations Chirurgicale et Technologique (MOPICT)', Domaine Expérimental du Magneraud, Surgères, F-17700, France.

[8] INRA, Unité expérimentale Génétique, expérimentations et systèmes innovants (GENESI), Domaine Expérimental du Magneraud, Surgères, F-17700, France.

* Authors: Equal contribution

Corresponding author:

Thierry HAUET

INSERM U1082, CHU de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, CS90577, 86021 Poitiers Cedex France**, Phone :** 33 5 49 44 48 29, **Fax :** 33 5 49 44 38 34, **Email: thierry.hauet@gmail.com**

Summary statement: Rapidity of brain death induction influences kidney graft quality through the intensity of the allostasis response to oxidative stress involving nuclear factor erythroid-2-related factor 2 and mechanistic target of rapamycin.

Disclosure of funding : This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Poitiers, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Conseil Régional Poitou-Charentes (convention 15/RPC-R-017) and by a grant from the Fondation de l'Avenir (Recherche Medicale Appliquée, program ET3-686).

Acknowledgements: The authors acknowledge the sources of funding. We gratefully thank Dr Michel Pinsard (CHU de Poitiers, France) for his help in manuscript drafting. We also thank Joris Ramalingom, Irene Launay and Virginie Ameteau (INSERM U1082, Poitiers, France), for their technical assistance.

Conflicts of interest: The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

Abstract:

The use of donors deceased after brain death (BDD) with extended criteria in response to the shortage of grafts leads to the removal of more fragile kidneys. These grafts are at greater risk of not being grafted or delayed function. A better knowledge of the pathophysiology of BDDs would improve this situation. There is a difference between the results from animal models of BDD and the clinical data potentially explained by the kinetics of brain death induction. We compared the effect of the induction rate of brain death on the recovery of post-transplant renal function in a pig model of BDD followed by allografts in nephrectomized pigs. Resumption of function between D0 and D14 post-transplant was better in the rapidly generated brain death group (RgBD) and graft fibrosis at 3 months less important. 2 groups of animals had identical oxidative stress intensity but a greater response to this oxidative stress by SIRT1, PGC1-α and NRF2 in the RgBD group. Modulation of mTOR stimulation by NRF2 would also regulate the survival/apoptosis balance of renal cells. For the first time we have shown that an allostatic response to oxidative stress can explain the impact of the rapidity of Brain Death induction on the quality of kidney transplants.

Introduction

At this time, renal transplantation is the recommended treatment for end-stage kidney disease. Unfortunately, there is a persistent lack of kidney grafts, with a mismatch between the number of new patients registered on a transplant waiting list and the number of grafts available. Even though over recent years, several strategies have been drawn up to alleviate this gap with new types of organ donations from marginal donors and controlled and non-controlled donors having died after circulatory collapse, brain death donors (BDD) remain the principal source of grafts in the world (Mizraji et al., 2007; Sung et al., 2008).

However, BDD organs are exposed to injuries induced by brain death (BD) increasing their sensitivity to ischemia-reperfusion (IR) injury and compromising organ quality. Indeed, these injuries contribute to primary non-function and delayed graft function. This phenomenon is aggravated by the growing number of "expanded criteria" donors (Troppmann et al., 1995). In this context, better understanding and improvement of BDD management protocols prior to organ explantation is of utmost importance in view of upgrading organ quality. Comprehension of the different phenomena secondary to brain death occurrence and their repercussions on potential grafts is essential to the elaboration of management protocols increasing the in quantity and improving the quality the donor organs susceptible to being extracted.

In the literature the usual animal brain death models are essentially mouse models characterized by brutally induced brain death, and they present limits, particularly as regards the kidneys (Giraud et al., 2011). At times, the data issued from these models are contradictory to findings in health clinics for humans (Barklin, 2009).

A recent experimental model was focused on the impact of the kinetics of brain death on the different intra-abdominal organs (kidney and liver), and the results highlighted appreciable difference (Rebolledo et al., 2016). However, this study was based on a mouse model, and its results are to be interpreted with caution, especially insofar as the grafts from the donors were finally not transplanted.

Wishing to provide clinicians with potential intervention routes in brain death donor (BDD) management, we reproduced near clinical brain death (BD) conditions in a preclinical porcine model of kidney BD donors prior to transplantation. In fact, due to anatomy and physiology similar to humans, the pig is of pronounced interest as a preclinical model (Giraud et al., 2011).

Our objective was to determine the time-dependent effects of rapid brain death induction (RgBD) as opposed to slow brain death induction (SgBD) on the kidney during 4h donor management after BD declaration. We opted for 4 hours of management subsequent to brain death based on the results reported by Schuurs et al. (Schuurs 2006), who showed that after 4 hours, considerable expression of the genes coding for the pro and anti-inflammatory responses secondary to brain death was to be observed.

We consequently explored the impact of RgBD and SgBD on critical pathways determining kidney graft quality, specifically targeting oxidative stress (Stiegler et al., 2013) and post-transplant outcome (Figure 1).

We highlighted a difference in early function recovery and observed more severe chronic injuries in pigs grafted with kidneys from slow generated brain death (SGBD). This observation validates previous findings in mouse models and should lead to proposal of animal models better suited to the models being tested.

Results

Early function recovery from D0 to D14 ; markers of endothelial, renal tubular lesions and tissue injuries

We observed no difference in diuresis recovery between the two groups. However, the pigs grafted with group RgBD kidneys presented better early function recovery, with post-graft creatinemia from D1 and D5 significantly lower than that of the pigs grafted with SgBD kidneys (Figure 2A). At post-transplantation D3, the SgBD group presented a significantly higher creatinemia peak ($p=0.0012$) than the RgBD group (1239 µmoL/L vs 733 µmoL/L respectively). Area under the curve (AUC)

creatinine kinetics from D0 to D14 was significantly greater in the SgBD group than in the RgBD group (Figure 2B). The glomerular filtration rates (GFR) were significantly different between the two groups, with a better filtration rate in the RgBD group from D1 to D14 (Figure 2C-D). Fractional excretion of sodium was significantly higher in the RgBD group than in the SgBD group from D1 to D5 (Figure 2E-F).

In terms of markers of cell necrosis, concentrations of blood LDH and blood HMGB1 (High mobility group box 1) were higher in the SgBD group from D1 to D14 (Figure 2G-H-I-J). Concentrations of blood NGAL increased significantly from 60 min to D1 after renal unclamping in the RgBD group and until D2 in the SgBD group (Figure 2K). In the two groups, degrowth without normalization was observed at D14. On the contrary, no significant difference in blood NGAL level between the two groups was observed during the first 14 days of transplantation (Figure 2L). Concentrations of blood IL-18 did not increase significantly in the two groups between unclamping and D14 (Figure 2M-N). During the first post-transplantation hours, circulating 8-isoprostane concentrations were not detectable in either of the two groups (data not shown).

We observed no histological differences from post-transplantation D7 to D14 between the RgBD and SgBD groups concerning necrosis lesions, brush border loss or leukocytic infiltrate (data not shown).

Late function recovery (J90), injury markers and fibrosis

At D90 after transplantation we observed no significant difference between groups RgBD and SgBD concerning blood creatinine level, glomerular filtration rates or proteinuria/creatininuria ratio (Figure 3A-B-C). Three months after transplantation, blood HMGB1, NGAL and IL-18 concentrations did not significantly differ between the two groups (Figure 3D-E-F). However, there was significantly more fibrosis in the kidneys of the SgBD group than in those of the RgBD group (Figure 3G-H).

Donor management: Hemodynamic stability, oxygen transport and biological stability

After induced brain death, all donor animals presented a Cushing reflex with maximal cardiac output and arterial hypertension, which was followed after brain death by a fall in arterial pressure and arterial flow. The animals were stabilized by the introduction of norepinephrine and vascular filling maintaining mean arterial pressure at 65 mmHg and cardiac index between 2 and 3 l/min. Hourly diaresis by reanimation did not significantly differ between the two groups (Table 1). Lactate significantly increased in the two groups after 60 minutes of reanimation and subsequently diminished in both of them (Table1).

From a biological standpoint, a significant increase in creatinemia following three hours of reanimation was observed in the SgBD group, as was an increase in blood LDH (Figures 4A-B-C-D). The circulating level of NGAL increased non-significantly during the 4 hours of reanimation, and there was no significant difference between the animals of the RgBD and the SgBD groups (Figures 4E-F). ASAT blood levels increased non-significantly during the two hours of reanimation, and then decreased in induction group RgBD while continuing to increase in the SgBD group. In comparison of the areas under curve (AUC) of the kinetic parameters of ASAT between the two groups, AUC for the SgBD group was significantly higher than for the RgBD group (Figure 4G-H). HMGB1 blood levels did not increase in the two study groups (data not shown).

Donor management: Markers of oxidative stress and antioxidant response

At the conclusion of reanimation, protein expression in renal tissue marked the intensity of oxidative stress. Nitrotyrosine, Aconitase and 4HNE were overexpressed in the two groups as compared to the uncontrolled kidneys without any significant difference between the SgBD and the RgBD groups (Figure 5A-B-C). Plasma concentrations of 8-isoprostanes were not detectable in the two study groups during donor management (data not shown). The response proteins implicated in response to oxidative stress, ratio of phosphorylated SIRT-1 to total SIRT-1, SIRT-3 and PGC-1a, were significantly more expressed in the RgBD group than in the SgBD group (Figure 5D-E-F). The antioxidant protein NRF2 (also called NRLF2) was overexpressed in the two groups at the conclusion of reanimation

without any significant difference between the SgBD and the RgBD groups (Figure 5G). The ratio of phosphorylated mTOR to total mTOR was significantly lower in the RgBD groups than in the control and the SgBD groups (Figure 5H). The phosphorylated mTOR / NRF2 ratio was significantly lower in the RgBD group than in the SgBD group (Figure 5I). After 4h of reanimation, the Bcl2/Bax protein ratio, a marker of anti-apoptotic mitochondrial protein balance, was significantly higher in the RgBD group than in the SgBD group (Figure 5J).

Donor management: Markers of endothelial activation

Messenger RNa molecules with low E-selectin adhesion, and MCP-1 monocyte attraction were significantly more overexpressed in the two BD groups after 4h of reanimation and with regard to MCP-1, to a significantly greater extent in the SgBD group (Figure 6A-B). The RNA messenger of the high-adhesion model ICAM-1 was significantly more expressed in the two BD groups after 4h of reanimation than in the controlled kidneys (Figure 6C). At the end of the static conservation period, the eNOS and the serine 1177 phosphorylated eNOS vasoreactivity proteins were significantly more expressed in the RgBD group than in the SgBD and the control groups (Figure 6D-E).

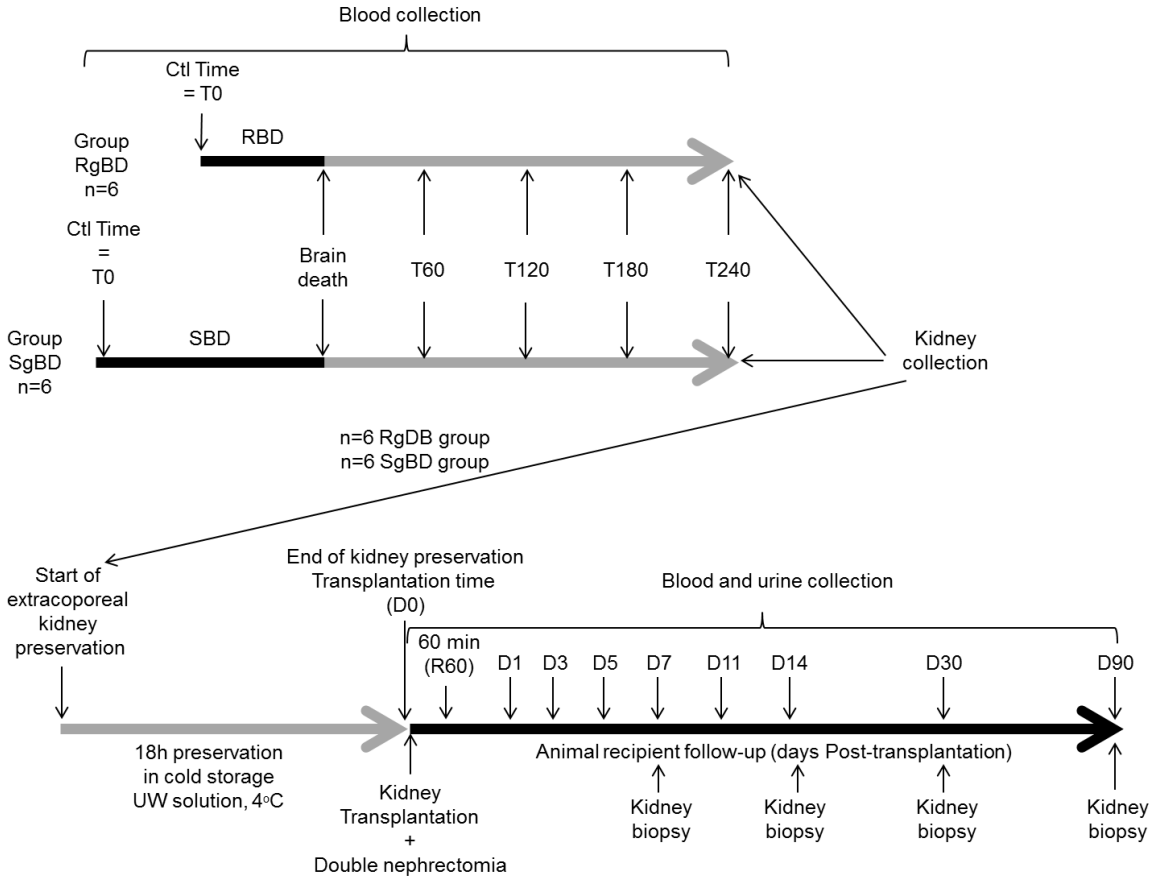

Figure 1. Experimental design

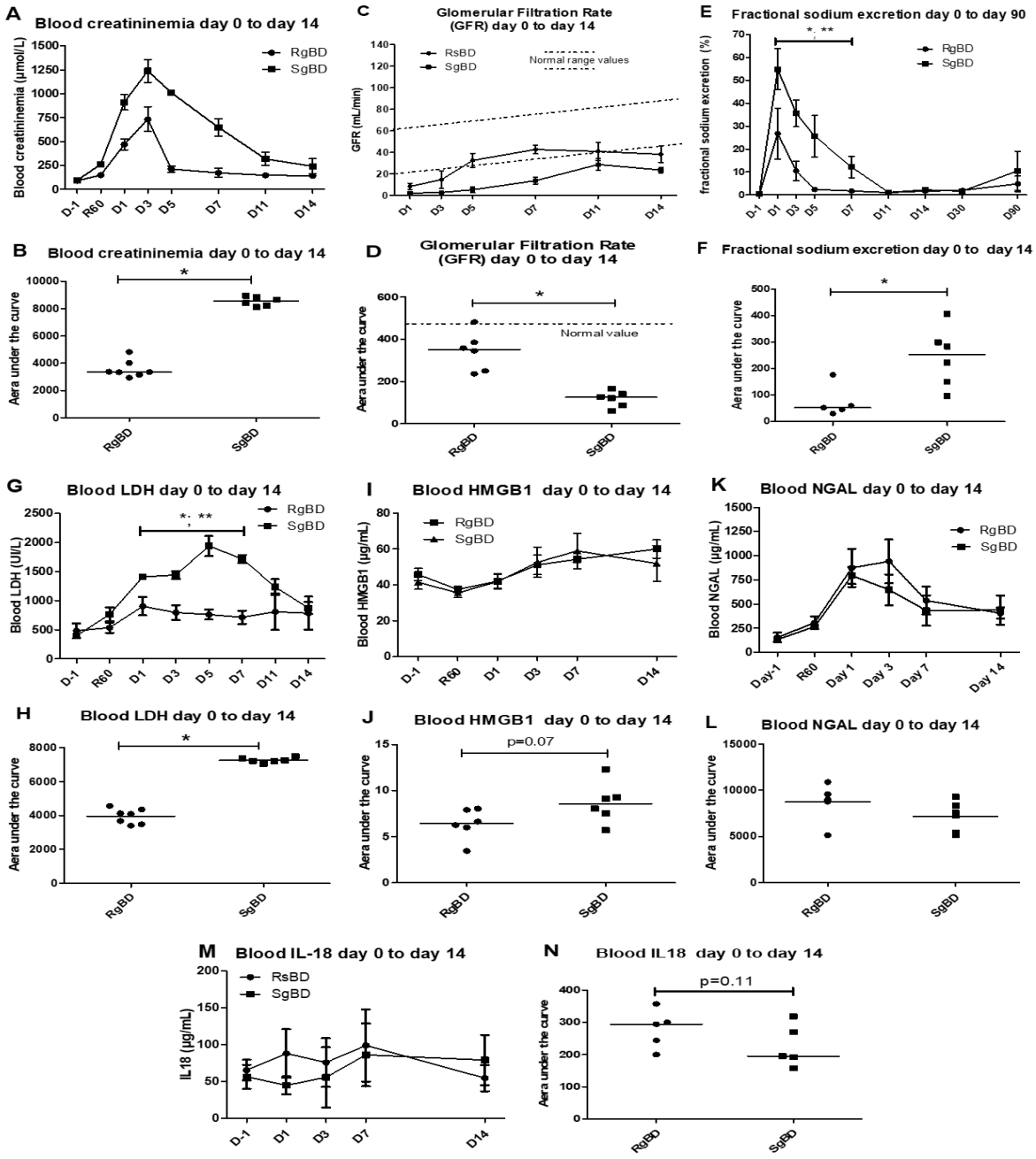

Figure 2. Renal function evaluation from day 0 to day 14 after transplantation

Renal function evaluation of the first 14 days after allotransplantation of kidneys subjected to rapid brain death induction (RgBD) or slow brain death induction (SgBD). Blood creatinine (A-B), Glomerular filtration rate in mL/min (C-D), Fractional sodium excretion (E-F), blood LDH (G-H), blood HMGB1 (I-J), blood NGAL (K-L) and blood IL-18 (M-N) were analyzed from day before transplantation (D-1) to day 14 after transplantation. (n= 5 to 7 per group). Kinetic results (A) (C) (E) (G) (I) (K) (M) are expressed as mean ± SD, statistical analysis were performed with Kruskal-Wallis Multiple-Comparison

Dunn's Test. Areas under the curve (AUC) (B) (D) (F) (H) (J) (L) (N) are expressed in Scatter plot with median, statistical analysis were performed with Mann-Whitney test. *$p<0.05$.

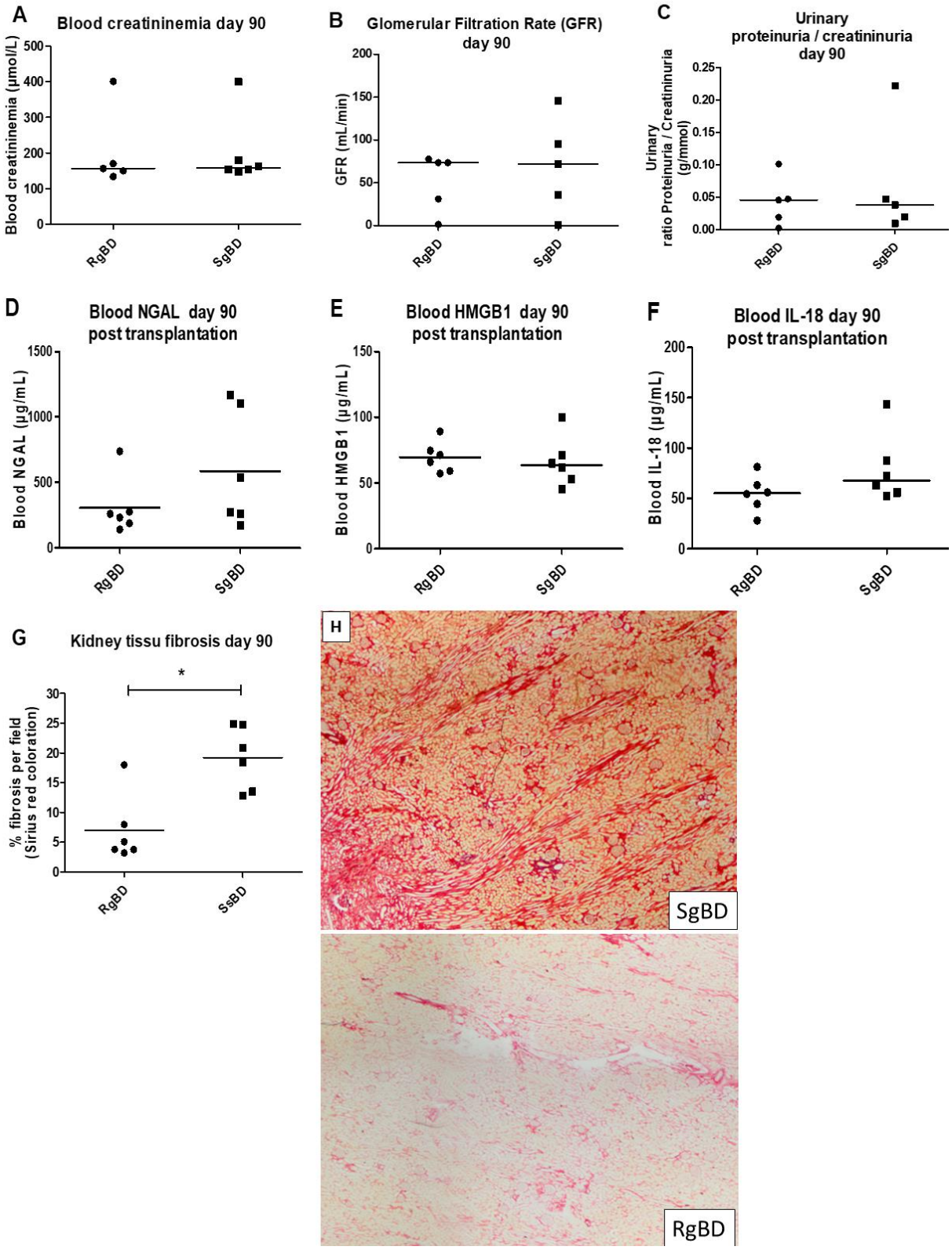

Figure 3: Renal function evaluation at day 90 after transplantation

Renal function evaluation at day 90 after allotransplantation of kidneys submitted to rapid brain death induction (RgBD) or slow brain death induction (SgBD). Blood creatinine (A), Glomerular

filtration rate in mL/min (B), ratio proteinuria/creatininuria (C), blood NGAL (D), blood HMGB1 (E), blood IL-18 (F) and kidney tissue fibrosis (G) evaluated by histological Red Sirius staining (H) analyzed at day 90 after transplantation. (n= 6 per group). Results are expressed in Scatter plot with median, statistical analysis was performed with the Mann-Whitney test. *$p<0.05$.

Table 1 : Hemodynamic parameters evolution of SgBd and RgBD groups, before brain death (Baseline), at brain death (BD) and during 240 minutes of porcine management after brain death (aBD).

	Baseline	**BD**	**60_{abd}**	**120_{abd}**	**180_{abd}**	**240_{abd}**
MAP_{SgBD}. mmHg	102±4	160±10$^{\beta}$	78±6	91±14	75±2	83±3
MAP_{RgBD}. mmHg	105±2	146±13$^{\beta}$	68±5	74±3$^{£}$	71±4	72±8
CO_{SgBD}. l/min	6.7±0.5	10.6±3.3$^{\beta}$	7. 0±2.5	6.9±2.2	7.7±1.4	7.3±2.3
CO_{RgBD}. l/min	5.9±1.4	11.3±1.7$^{\beta}$	7.7±1.3	7.4±1.2	6.5±2.2	7.5±2.0
$PaO_{2\ SgBD}$. mmHg	333±97	334±120	324±75	254±48	334±103	301±122
$PaO_{2\ RgBD}$. mmHg	365±113	394±134	374±180	260±63	405±103	326±127
Hb_{SgBD}. g/dl	8.6±0.5	11.6±0.8	9.7±1	10.2±1.5	10.1±1.5	10.5±1.5
Hb_{RgBD}. g/dl	9.0±0.5	11.0±1	10.1±1	9.6±1.6	10.3±1.5	11±1.5
$Lactate_{SgBD}$. mmol/l	1.0±0.4	2.4±1.0$^{\beta}$	3.4±0.7$^{\beta}$	2.5±1.3	2.3±1.8	2.2±1.7
$Lactate_{RgBD}$. mmol/l	0.9±0.4	2.4±1.0$^{\beta}$	2.8±1.2$^{\beta}$	1.6±0.6	1.3±0.5	1.2±0.3

MAP (Mean Arterial Pressure), CO (Cardiac Output), PaO_2 (Blood oxygen Partial pressure), Hb (Hemoglobin), BD= Brain Death, aBD= after brain death. Results are expressed as mean ± SEM.

Statistics: $p<0.05$; $^{\beta}$ time vs CTL (T0) and $^{£}$ RgBD group vs SgBD group.

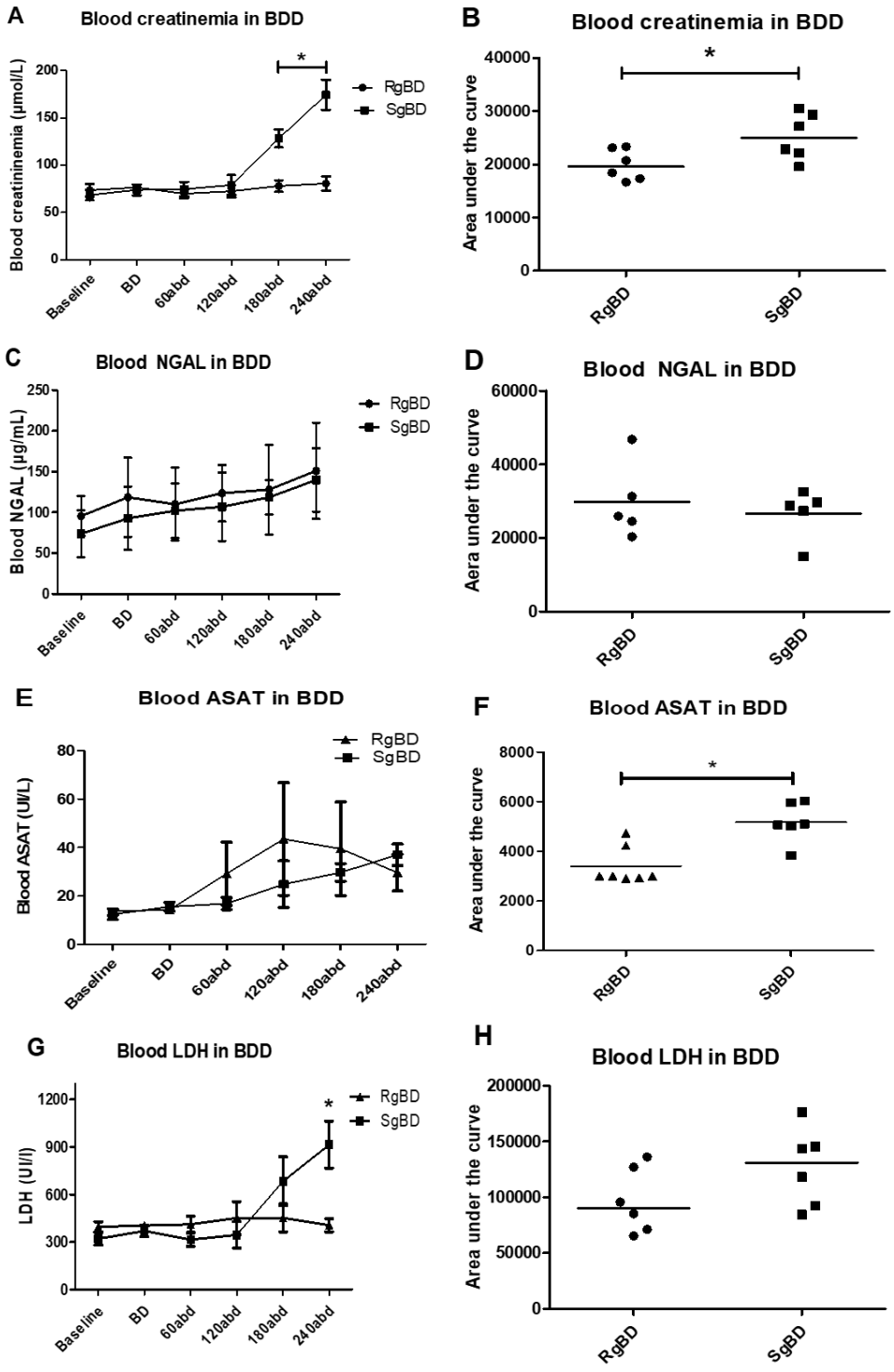

Figure 4. Donor management: Biological stability of the two groups during reanimation.

Evaluation of kidney injury marker evolution during BD donor management after rapid brain death induction (RgBD) or slow brain death induction (SgBD). Blood creatinine (A-B), blood NGAL (C-D), blood ASAT (E-F) and blood LDH (G-H) concentration blood evolution, investigated at control time (baseline), brain death time (BD), and per donor management at 60, 120, 180 and 240 min after brain

death (abd) (n= 5-6 per group). Kinetic results (A) (C) (E) (G) are expressed as mean ± SD, statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Dunn's Test. Areas under the curve (B) (D) (F) (H) are expressed in Scatter plot with median, statistical analysis was performed with Mann-Whitney test. *$p<0.05$.

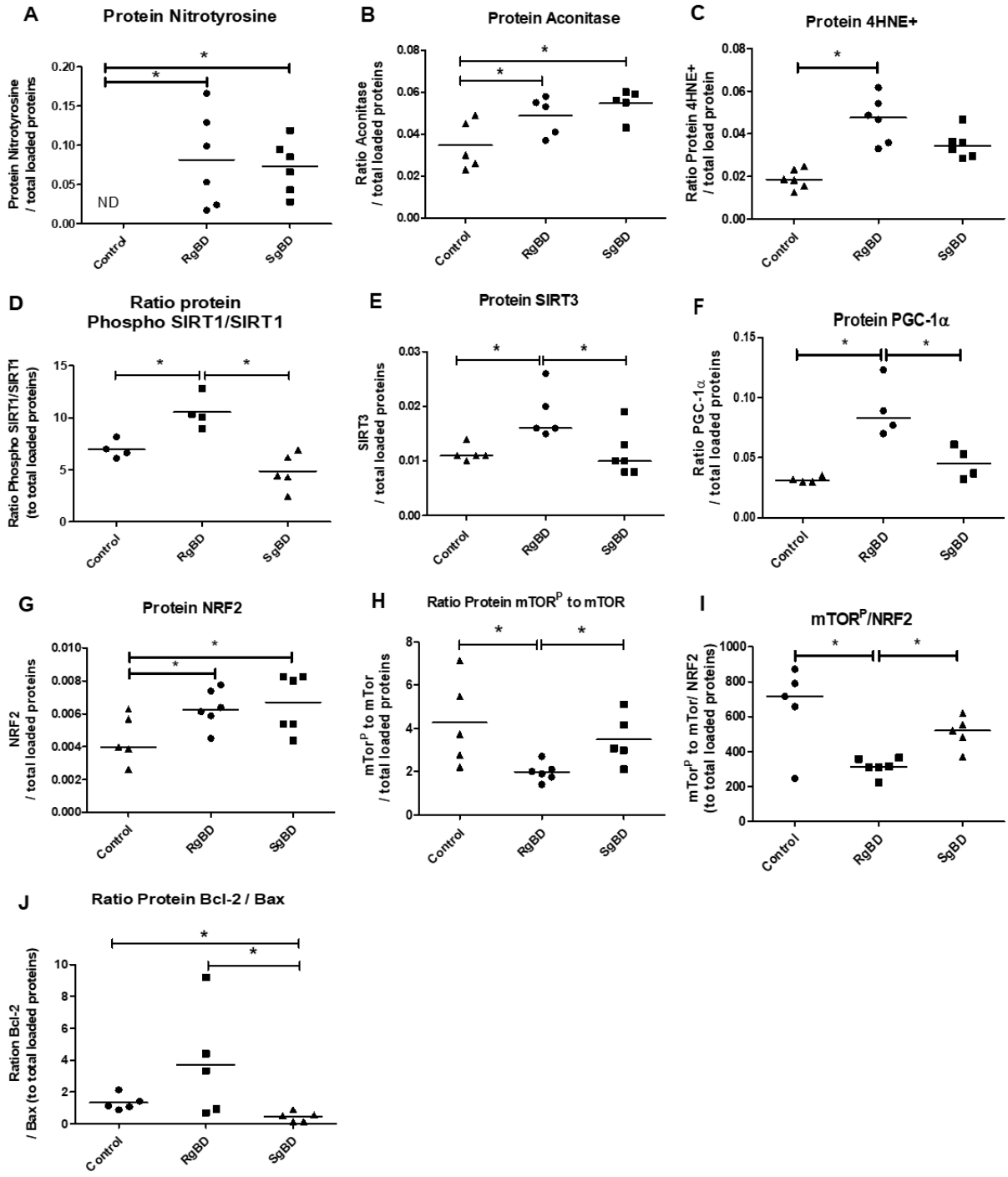

Figure 5. Donor management: Oxidative stress and response to oxidative stress by SIRTs-PGC-1a-NRF2-mTOR path and mitochondrial integrity at the end of reanimation.

Protein expression level of Nitrotyrosine (A), Aconitase (B), 4HNE (C), ratio phosphorylated SIRT-1 to total SIRT-1 (D), SIRT-3 (E), PGC-1a (F), NRF2 (G), ratio Phosphorylated mTOR to total mTOR (H), ratio Phosphorylated mTOR to NRF2 (I), and ratio Bcl2 to Bax (J), evaluated by western blot at the end of 4h donor management in renal tissue of rapid brain death induction (RgBD) and slow brain death

induction (SgBD) groups versus Control kidney (n= 5-6 per group). Results are expressed in Scatter plot with median, statistical analysis were performed with Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Dunn's Test. *p<0.05.

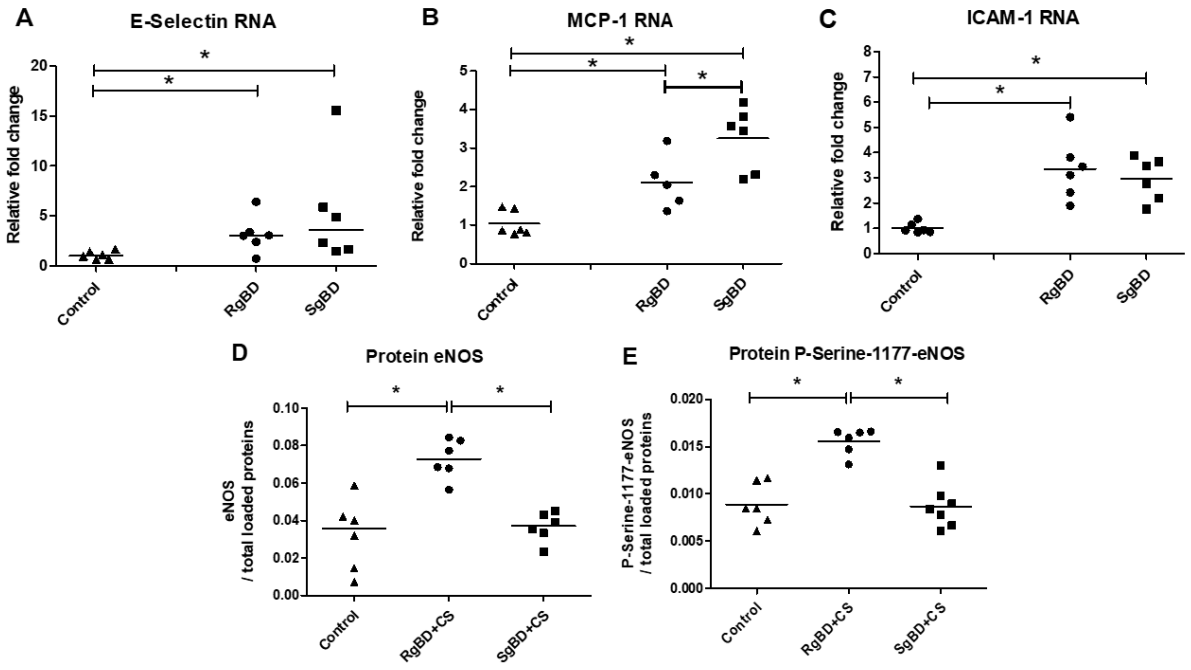

Figure 6. Donor management: Endothelial activation; genomic expression of adherence molecules and protein expression of eNOS and P-Serine-1177-eNOS at end of reanimation

RNA expression level of E-Selectin (A), MCP-1 (B) and ICAM-1 (C), and protein expression level, by western blot, of eNOS (D) and ratio Serine 1177 phosphorylated eNOS to eNOS total (E) evaluated in renal tissue of rapid brain death induction (RgBD) and slow brain death induction (SgBD) groups at the end of cold storage following 4h donor management (called RgBD+CS and SgBD+CS) versus Control kidney (n= 5-6 per group). Results are expressed in Scatter plot with median, statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Dunn's Test. *p<0.05. * p<0.05.

Table 2. Summary of the differences between the 2 kinetics of brain death induction.

	Parameters	SgBD vs RgBD
Graft function and biomarkers post-transplantation	**GFR D0-D14**	**<**
	GFR D14-D90	**=**
	LDH	**>**
	HMGB1	**=**
	NGAL	**>**
	IL-18	**=**
	Fibrosis	**>**
Donor management : Stability during resuscitation	**DAO_2**	**=**
	Créatinémie	**>**
	NGAL	**=**
	LDH	**>**
	ASAT	**>**
Donor management : Oxidative stress intensity	**Nitrotyrosine**	**=**
	4HNE	**=**
	Aconitase	**=**
Donor management : Oxidative stress response	**SIRT1**	**<**
	SIRT3	**<**
	PGC-1a	**<**
	NRF2	**=**
	P-mTOR	**<**
Donor management : endathelial cell activation	**E-Selectine ARN**	**=**
	MCP-1 ARN	**>**
	ICAM-1 ARN	**=**
	eNOS totale protéine	**>**
	P-Serine-1177-NOS protéine	**>**
Donor management : Mitochondrial integrity and cell survival	**Bcl2/Bax**	**<**

Discussion

At present we are lacking in fundamental data that would improve treatment of blood death donors (BDD) and achieve early characterization of future kidney grafts during the phase of donor reanimation. The relevant scientific literature presents contradictory clinical and pre-clinical data featuring sizeable differences between the data obtained in humans and those in animal models. The difference may be explained by a limited choice of usable animal models, namely mouse models with rapid, even instantaneous systemic inflammation during BD (Barklin, 2009). While mouse models in renal transplantation are imperfect, pig models are anatomically and physiologically more satisfactory (Giraud et al., 2011). Moreover, one of the other limitations in pre-clinical studies in rodents consists in systemic inflammatory response during BD, which does not correspond to usual clinical situations in which several hours elapse between a patient's brain injury and occurrence of BD. That said, a recent study using a mouse model compared the impact of different speeds of BD induction. While the results are of interest, showing a detrimental effect of slow-speed induction of brain death on the biological parameters of renal injuries (Rebolledo et al., 2016), this study did not purport to evaluate post-transplant function recovery in kidney grafts. The authors highlighted overexpression of genes coding for TNF-and IL-6 in the "slow" BD induction group as compared to the "rapid" induction group. The same result was recorded in measurement of IL-6 plasma concentrations. As regards plasma creatinine concentration, once again it was higher during reanimation in the slow induction than in the rapid induction animal groups. The one hemodynamic parameter considered in this study was mean arterial pressure (MAP), and its mean values did not significantly differ between the two groups.

Here, in our preclinical study of a BD pig model, we recorded comparable results, with a deleterious impact of slowly induced BD on post-transplant function recovery in kidney grafts. The originality of our work consists in (a) our having used a BD pig model, (b) our transplantation of kidneys from donor models, and (c) follow-up lasting up to 3 months, a time span enabling us to complement data on recovery of initial kidney function with data on chronic injuries.

Our results show that primary graft function recovery is pronouncedly less satisfactory in pigs grafted with kidneys originating in the “slow” group than with pigs grafted with kidneys originating in the “rapid” group, who displayed markedly superior post-transplantation plasma creatinine levels during the first week. This difference is also found in post-transplantation kinetics up until D14.

In human clinical cases, the BDD parameters liable to impact primary functional recovery are: preexisting pathological states along with age, cardiovascular comorbidity factors (expanded criteria donors) (Troppmann et al., 1995), donor hemodynamic instability (Giral et al., 2007; O’Brien et al., 1996; Salim et al., 2006; Schnuelle et al., 2001) and cold ischemia duration. In the controlled setting of our pre-clinical study, all of the pigs had the same age (14 weeks) and were devoid of any pathological state prior to experimentation; moreover, reanimation duration was uniform, and the different grafts underwent cold ischemia in static conservation for the same length of time. Only the BD hemodynamics was more unstable in the RgBD group, and the variations were statistically identical.

The quality of post-BD hemodynamic reanimation was identical in the two groups of animals, and the results were similar as regards the determinants of oxygen transport (cardiac output, oxygen saturation of arterial hemoglobin, and partial pressure of oxygen). Moreover, the arterially extracted blood lactate in the two groups observed the same growth kinetics at the moment of brain death and after 60 minutes of reanimation, a result underlining a balance between the supplies and needs of oxygen in the two groups. A possible difference in oxygen transport during reanimation consequently does not explain the observed differences between the groups regarding function recovery. That much said, we observed a progressive increase of LDH plasma concentration in the “progressive” group; it is explained by the peculiarities of kinetics during brain death, all other factors remaining experimentally identical. This cell lesion marker was associated with a tendency toward ASAT increase, which may function as a marker of renal tubular lesion (Jochmans et al., 2011) and be considered as deterioration of the renal function in association, notwithstanding satisfactory hemodynamics, with plasma creatinine increase. When it had been decided that reanimation would

go on for 4 hours, the decision was based on the fact that in 100% of procedures, this time lapse allowed for stabilization of a given hemodynamic state; moreover, it allowed for presentation of maximum tissular expression of inflammatory markers (Schuurs et al., 2006).

If we decided to explore oxidative stress and response to oxidative stress, this choice was justified for two fundamental reasons : a) Oxidative stress is associated with the occurrence and aggravation of numerous chronic renal illnesses (Tabriziani et al., 2018); data collected in works by Stiegler et al. highlighted activation of oxidative stress subsequent to BD occurrence (Stiegler et al., 2013). In their study, renal nitrotyrosine through immunohistochemistry testing was shown to increase after BD. Moreover, oxidative stress in a donor tends to delay function recovery (Dutkiewicz et al., 2009).

In the study by Stiegler et al., a number of markers, parameters of response to oxidative stress (superoxide dismutase 2, gluthation synthetase, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, oxidative stress responsive 1 and gluthation peroxidase 3) were analyzed, but only as regards their mRNA. The authors found no increased expressions of these genes in the kidneys of BDDs; this is probably due to the fact that response to oxidative stress in the short time span of reanimation is mainly induced by the activation of anti-oxidizing proteins. In our study, we focused on three markers reflecting the intensity of oxidative stress at the level of renal tissue: 4HNE, aconitase and nitrotyrosine. In order to evaluate response to oxidative stress, we analyzed the expression of anti-oxidizing proteins by Western blot (Sirtuins, PGC1α and NRF2), which is more informative than mRNA.

Our results have shown that the kinetics of BD induction exerted little or no influence on the intensity of oxidative stress; levels of 4HNE, nitrotyrosine and aconitase were similarly overexpressed in the two BD groups. However, the kinetics of BD induction seemed to influence the response to oxidative stress mediated by Sirtuin 1 and 3 and PG1alpha. However, NRF2 was similarly overexpressed in the two groups. In addition, we studied the degree of phosphorylated mTOR expression in total mTOR. mTOR is a major, indispensable actor in numerous cellular mechanisms, particularly as regards energy regulation in renal tubular cells and fibrosis generation secondary to an

aggression inducing delayed graft function loss (Fantus et al., 2016). In the explanted kidneys of the RgBD group, activation of the mTOR protein was significantly reduced. While mTOR modulation by the ROS produced during oxidative stress is confirmed by the relevant scientific data, it can take on the form of either upregulation via AMPK (Chen et al., 2011) or of downregulation via FoxO3 (Yalcin et al., 2010). On this topic, recent publications have highlighted direct regulation of mTOR by NRF2 (Bendavit et al., 2016) as well as double downregulation involving mTOR and NRF2 (Kapuy et al., 2018).

Our hypothesis was that the observed differences in primary function recovery in kidney grafts according to BD kinetics was associated not with a difference in oxidative stress intensity, but rather with modulation of anti-oxidative response intensity leading to modulation of mTOR by NRF2. This difference in secondary adaptation to an aggression corresponds to the phenomenon of allostasis, i.e. adaptation of a system to new environmental conditions. To our knowledge, this is the first time that a donor allostasis mechanism has been described. The observed difference in allostatic adaptation could originate in the protective phenomena initiated by shear stress, insofar as it has been demonstrated that sheer stress has a protective effect, particularly through eNOS activation (Chatauret et al., 2014), and that the effect may entail the intervention of SIRT-1 (Chen et al., 2010; Liu et al., 2015). Part of the originality of this paper consists in our having highlighted more pronounced expression of the ratio of phosphorylated eNOS to total eNOS in the rapidly generated brain death (RgBD) group. And even if we found no significant difference in the post-BD hemodynamic parameters, the hemodynamic phenomena secondary to BD were more condensed in the RgBD group (5 minutes) than in the in the “slow” SgBD group (90 minutes). We may hypothesize that post-BD, the renal cells were subject to intensified shear stress involving SIRT-1 activation, which might help to explain our results.

The potential interest of this work consists in its possibly explaining, for reasons other than the imperfect use of mouse models, the divergencies of the results reported in the literature. Indeed,

analysis has often been based on evaluation of intensity of aggression rather than intensity of the response to the aggression of the regulation/response systems.

This work presents some limits, particularly as regards extrapolation of the results to humans and to the kidneys of donors presenting preexisting lesions, given the fact that mTOR is regulated in different ways in different renal pathologies (Fantus et al., 2016). And even if our results possess some external validity insofar as they confirm those of Schuur et al., other experimentations remain necessary.

Were our results to be confirmed, several possible applications could be envisioned, particularly therapeutic utilization of the mTOR and/or NRF2 modulator in a donor having died following brain death. Another possible aspect would consist in early characterization of renal grafts through analysis of mTOR and NRF2 expression. While access to this type of information would necessitate an invasive approach, one possible track would consist in analysis of renal cellular material in donor urine and blood; relevant assessments have been carried out in cancerology (Noel et al., 2015).

Conclusion

Brain death kinetics influences early function recovery in graft and contributes to the intensity of fibrosis in a pig model of renal transplantation. The mechanism involved would seem to be an allostatic response differing from response to the oxidative stress modulating the NRF2-mTOR system. Confirmation of these results might lead to proposal of new means of characterization and preconditioning of brain death donors (BDD).

Materials and Methods

Experimental model

All animal experiments were performed in accordance with the Care and Use of Laboratory Animals and Animal Research Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines and approved by French Poitou-Charentes ethics committee of animal experimentation (protocol number CE2012-14). We used 3-month-old Large White pigs weighing 40±4 kg (MOPICT IBiSA Plateforme, INRA Magneraud, Surgères, France).

Brain death model: 12 pigs (*Large White*, 35-52 kg) were utilized for the purposes of the study, which was conducted following the agreement of the *Comité d'éthique de Poitou-Charentes* (C2EA-84), protocol CE2012-14 in the surgical experimentation platform MOPICT (INRA, domaine du Magneraud, Surgères, France). Pre-medication was carried out using Midazolam IM 0.05mg/kg 20 min prior to initiation of the experimentation. The pigs were anesthetized by inhalational induction with a mixture of Sevoflurane 8% and oxygen. Following loss of consciousness, a 20G catheter was set up on an ear vein and the anesthesia was deepened by injection of Propofol (3mg/kg), Fentanyl (1µg/kg), Ketamine (1mg/kg) and Rocuronium (1mg/kg). Respiratory tract treatment was ensured by installation of orotracheal intubation, size 6.5 (Hi-Contour, Mallinckrodt Medical™, Athlone, Ireland). The pigs were ventilated with a volume-controlled Servo 900C™ (Siemens, Solna, Sweden) with tidal volume set at 8ml/kg, and the respiratory rate was adjusted to obtain PaCO2 between 35 and 40mmHg and FiO2 at 50%. Positive end-expiratory pressure was 5cm of H20, an I/E ratio set at 1/3. No alveolar recruitment maneuver was carried out. Maintenance was achieved through iterative administration of Propofol at 3mg/kg/h, Fentanyl 1.5µg/kg/h and Rocuronium 1mg/kg according to the animal's behavior. A femoral arterial catheter and a central venous line in the internal jugular vein put into place surgically, and monitoring was then ensured by PICCO1® Edward (Pulsion medical system, Irving, USA). A supra-pubic catheter was installed following vesical incision with hourly diuresis measurement. Transition to brain death (BD) was provoked by carving a hole at 10 cm from

the coronal plane and 10 cm from the sagittal line at the level of the frontal zone, and afterwards by detachment of the dura mater and insertion of a Foley catheter Ch 18 in the epidural space; the catheter was then swollen with physiological serum according to the Purins model (Purins et al. 2011). Among the 6 animals in the **SgBD (**slowly generated brain death) group, brain death was provoked slowly by inflation of the Foley catheter balloon in accordance with a sequence of 5ml at 0 min, followed by deflation of 5 ml at 10 min, inflation of 10 ml at 20 min, deflation of 5 ml at 30 min, inflation of 10 ml at 40 min, deflation of 5 ml at 50 min and inflation of 10 ml at 60 min up until brain death. Among the 6 animals in the **RgBD** (rapidly generated brain death) group, brain death was rapidly provoked by inflation of the Foley catheter balloon of 20 ml in 5 minutes. The animals were monitored by a double-derivation electroencephalogram (EEG). Brain death diagnosis was carried out on the basis of clinical examination showing areactive bilateral mydriasis, absent corneal reflexes, abolition of spontaneous ventilation after hypercapnia response test and flat line EEG. Sedation was discontinued once brain death had been validated. Reanimation consisted in maintaining mean arterial pressure above 70 mmHg, with normal hematosis under mechanical ventilation (tidal volume 8ml/kg) and diuresis between 10 and 15 ml kg/h. Vascular filling with crystalloid solutions was guided by injection volume variation (IVV). Hemodynamic support was achieved by Noradrenaline IVSE. Occurrence of polyuria, which was attributed to central diabetes insipidus during brain death, was treated by low-dose Desmopressin. A need to increase noradrenalin doses to a level exceeding 0.3µg/kg/min occasioned administration of hydrocortisone at 1mg/kg/h. Reanimation following brain death proceeded for 4h.

Blood collections were performed at baseline time (before BD induction), at the time of BD declaration (BD time), and during donor management at 60 min after BD declaration (60abd), 120 min (120abd), 180 min (80abd) and 240 min (240abd). At 240 min after BD (4h management) kidneys were collected. The left kidney was flushed with a cold UW solution and preserved in cold UW in static condition during 18h before transplantation. The right kidney was collected for biological analysis from biopsies at the end of donor management and at the end of kidney preservation in UW

as previously described. The biological analyses of BD kidney were compared to control kidneys collected on 3-month-old healthy pigs.

Kidney allo-transplantation and renal function evaluation after transplantation: At the end of static preservation, the left kidney was allotransplanted in a fully swine leukocyte antigen (SLA) compatible littermate, bilaterally nephrectomized pig (6 with grafts of fast induction group and 6 with grafts of slow induction group), Heterotopic allotransplantation was performed in anaesthetized pig via midline incision. End-to-side aorta and inferior vena cava anastomoses were performed, just above the iliac bifurcation. Ureteroneocystostomy was carried out. After kidney transplantation, the pigs were placed in a metabolic cage for urine and blood collection during the first 7 days and at days 11, 14 and 90 after transplantation (Figure 1). Blood collections were performed at day -1 (1 day before transplantation), 60 min after kidney reperfusion and at days 1 (D1), D3, D5, D7, D11, D14 and D90 after kidney transplantation. Follow-up was performed for 90 days, animals were anesthetized at D90 post-transplantation and the transplanted kidneys were collected for histological analysis.

Soluble protein quantification and renal function evaluation

Blood NGAL, HMGB1 and IL18 proteins were assessed in porcine plasma using ELISA kit (respectively, Eurobio, Euromedex and Invitrogen France) according to the manufacturer's instructions. Blood Creatinine, Sodium, Lactate dehydrogenase (LDH) and Aspartate Aminotransferase (ASAT) were measured with a Modular bioanalyzer (Roche-Diagnostics, France). Diuresis was evaluated by urine production after transplantation. Glomerular Filtration Rate (GFR) was calculated as: ((Diuresis mL/h)*Urine Creatinine)/ Blood Creatinine = GFR L/h, and converted in GFR mL/min.

Histological study

Biopsy samples from corticomedullary kidney collected at day 90 after transplantation were fixed with 4% formalin and paraffin-embedded. Histological interstitial fibrosis evaluated by Red Sirius

staining (collagen fibers I and III staining) was quantified with ImageJ software. Renal tubulitis and leukocyte infiltration were scored on histological HES staining.

Real-Time Quantitative PCR: Total RNAs from porcine cortical renal tissue were extracted with a commercial kit (Macherey-Nagel, Hœrdt, France). Genomic DNA was removed using DNA-free kit and first-strand reverse-transcription (Applied-Biosystems, Saint-Aubin, France) was performed. Real-Time qPCR assays were performed on a RotorGene Q (Qiagen, Courtaboeuf, France). Porcine DNA primers were designed using OligoPerfect™ (Life Technologies), QuantPrim (Max-Planck-Gesellschaft, Potsdam, Germany) and OligoAnalyser (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA); the sequences are detailed in supplementary Table S1. RNA was expressed as "relative to expression in healthy ctl kidney" determined with the Pfaffl method (expressed as Relative Fold Change), using β-actin, CYA62, SDHA, RPLPO and L19 genes as internal controls.

Western blot analysis: Western Blotting was carried out using specific antibodies; Bcl-2 (D17C4, Cell Signaling, France), Bax (ab115193, Abcam, France), Aconitase 2 (ab110321, Abcam, France), Nitrotyrosine (05-233, Millipore, France), 4HNE (ab5605, Millipore, France), Sirtuine-3 (D22A3, Cell signaling, France), Sirtuine-1 (SC-9475, Cell signaling, France), Phosphorylated Sirtuine-1 (Sc-2314, Cell signaling, France), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1a, ab54481, Abcam, France), Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2, ab31163, Abcam, France), Mammalian target of rapamycin (mTOR, 2983S, Cell signaling, France), phospho mTOR (5536P, Cell signaling, France), eNOS total (610296, BD Transduction, Le Pont de Claix, France) and eNOS phophorylated Ser1177 (C9C3; Cell-Signaling, Saint Quentin-Yvelines, France). Protein quantification level was expressed as ratio of total proteins loaded on *precast* gels with stain-free technology (BioRad, France). All blots were obtained by imaging with chemidoc and quantificated with ImageLab software (BioRad).

Statistical methods

Kinetic results are expressed in mean ± SD, and other results are expressed as scatter plot with median. Statistical analysis was performed with Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test for kinetic parameters, and for other parameters statistical analysis was performed as Mann-Whitney test, with R and NCSS software, statistical significance was set at $p<0.05$.

Table S1: Primers used for real-time RT-PCR in porcine renal cortex tissue

Target		Primer Sequence
L19 (RPL19)	Forward primer	5’- AATCGCCAACGCCAACTC -3’
	Reverse primer	5’- CAGCCCATCTTTGATCAGCTT -3’
RPLPO	Forward primer	5’- AGAAACTGTTGCCTCACATCC -3’
	Reverse primer	5’- CCTTATTGGCCAGCAGCA -3’
-Actin	Forward primer	5’- GATCGTGCGGGACATCAAG -3’
	Reverse primer	5’- GCCATCTCCTGCTCGAAGTC -3’
SDHA	Forward primer	5’- GAGTTCGTGCAGTTCCACCCTA -3’
	Reverse primer	5’- CCTCTCACCCTGGCTGTTGATA -3’
CYA62	Forward primer	5’- AAGACTGAGTGGTTGGATGG -3’
	Reverse primer	5’- AATGGTGATCTTCTTGCTGGT -3’
MCP-1	Forward primer	5’- TCTCCAGTCACCTGCTGCTAT -3’
	Reverse primer	5’- TGCTTCTTTAGGACACTTGCTG -3’
E-Selectin	Forward primer	5’- TCCAACCTTGCAGGATGATGTGC -3’
	Reverse primer	5’- TGCCAATACGCATTCAGCCCTTC -3’
ICAM-1	Forward primer	5’- GGCTGTGCACTGCAACAAGA -3’
	Reverse primer	5’- TGTGGCAATGCCAAATCCT -3’
MCP-1	Forward primer	5’- TCTCCAGTCACCTGCTGCTAT -3’
	Reverse primer	5’- TGCTTCTTTAGGACACTTGCTG -3’

Abbreviations: L19 ribosomal protein gene (RPL19), ribosomal protein large P0 (RPLPO), succinate dehydrogenase complex subunit A (SDHA), cyclophilin A 62 (CyA62), Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), Endothelial Selectin (E-Selectin), Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)

References

Barklin, A. (2009). Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. Acta Anaesthesiol. Scand. *53*, 425–435.

Bendavit, G., Aboulkassim, T., Hilmi, K., Shah, S., and Batist, G. (2016). Nrf2 Transcription Factor Can Directly Regulate mTOR: LINKING CYTOPROTECTIVE GENE EXPRESSION TO A MAJOR METABOLIC REGULATOR THAT GENERATES REDOX ACTIVITY. J. Biol. Chem. *291*, 25476–25488.

Chatauret, N., Coudroy, R., Delpech, P.O., Vandebrouck, C., Hosni, S., Scepi, M., and Hauet, T. (2014). Mechanistic analysis of nonoxygenated hypothermic machine perfusion's protection on warm ischemic kidney uncovers greater eNOS phosphorylation and vasodilation. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *14*, 2500–2514.

Chen, L., Xu, B., Liu, L., Luo, Y., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Han, X., Kontos, C.D., and Huang, S. (2011). Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. Free Radic. Biol. Med. *50*, 624–632.

Chen, Z., Peng, I.-C., Cui, X., Li, Y.-S., Chien, S., and Shyy, J.Y.-J. (2010). Shear stress, SIRT1, and vascular homeostasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 10268–10273.

Dutkiewicz, G., Domanski, L., Binczak-Kuleta, A., Pawlik, A., Safranow, K., Dziedziejko, V., Wisniewska, M., Ciechanowicz, A., and Ciechanowski, K. (2009). Lack of association of polymorphisms 239+34A/C in the SOD1 gene and 47C/T in the SOD2 gene with delayed graft function and acute and chronic rejection of kidney allografts. Transplant. Proc. *41*, 3701–3703.

Fantus, D., Rogers, N.M., Grahammer, F., Huber, T.B., and Thomson, A.W. (2016). Roles of mTOR complexes in the kidney: implications for renal disease and transplantation. Nat. Rev. Nephrol. *12*, 587–609.

Giral, M., Bertola, J.P., Foucher, Y., Villers, D., Bironneau, E., Blanloeil, Y., Karam, G., Daguin, P., Lerat, L., and Soulillou, J.P. (2007). Effect of brain-dead donor resuscitation on delayed graft function: results of a monocentric analysis. Transplantation *83*, 1174–1181.

Giraud, S., Favreau, F., Chatauret, N., Thuillier, R., Maiga, S., and Hauet, T. (2011). Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model. J. Biomed. Biotechnol. *2011*, 532127.

Jochmans, I., Lerut, E., van Pelt, J., Monbaliu, D., and Pirenne, J. (2011). Circulating AST, H-FABP, and NGAL are early and accurate biomarkers of graft injury and dysfunction in a preclinical model of kidney transplantation. Ann. Surg. *254*, 784–791; discussion 791-792.

Kapuy, O., Papp, D., Vellai, T., Bánhegyi, G., and Korcsmáros, T. (2018). Systems-Level Feedbacks of NRF2 Controlling Autophagy upon Oxidative Stress Response. Antioxid. Basel Switz. *7*.

Liu, J., Bi, X., Chen, T., Zhang, Q., Wang, S.-X., Chiu, J.-J., Liu, G.-S., Zhang, Y., Bu, P., and Jiang, F. (2015). Shear stress regulates endothelial cell autophagy via redox regulation and Sirt1 expression. Cell Death Dis. *6*, e1827.

Mizraji, R., Alvarez, I., Palacios, R.I., Fajardo, C., Berrios, C., Morales, F., Luna, E., Milanés, C., Andrade, M., Duque, E., et al. (2007). Organ donation in Latin America. Transplant. Proc. *39*, 333–335.

Noel, N., Couteau, J., Maillet, G., Gobet, F., D'Aloisio, F., Minier, C., and Pfister, C. (2015). TP53 and FGFR3 Gene Mutation Assessment in Urine: Pilot Study for Bladder Cancer Diagnosis. Anticancer Res. *35*, 4915–4921.

O'Brien, E.A., Bour, S.A., Marshall, R.L., Ahsan, N., and Yang, H.C. (1996). Effect of use of vasopressors in organ donors on immediate function of renal allografts. J. Transpl. Coord. Off. Publ. North Am. Transpl. Coord. Organ. NATCO *6*, 215–216.

Rebolledo, R.A., Hoeksma, D., Hottenrott, C.M.V., Bodar, Y.J.L., Ottens, P.J., Wiersema-Buist, J., and Leuvenink, H.G.D. (2016). Slow induction of brain death leads to decreased renal function and increased hepatic apoptosis in rats. J. Transl. Med. *14*, 141.

Salim, A., Martin, M., Brown, C., Rhee, P., Demetriades, D., and Belzberg, H. (2006). The effect of a protocol of aggressive donor management: Implications for the national organ donor shortage. J. Trauma *61*, 429–433; discussion 433-435.

Schnuelle, P., Berger, S., de Boer, J., Persijn, G., and van der Woude, F.J. (2001). Effects of catecholamine application to brain-dead donors on graft survival in solid organ transplantation. Transplantation *72*, 455–463.

Schuurs, T.A., Morariu, A.M., Ottens, P.J., 't Hart, N.A., Popma, S.H., Leuvenink, H.G.D., and Ploeg, R.J. (2006). Time-dependent changes in donor brain death related processes. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *6*, 2903–2911.

Stiegler, P., Sereinigg, M., Puntschart, A., Bradatsch, A., Seifert-Held, T., Wiederstein-Grasser, I., Leber, B., Stadelmeyer, E., Dandachi, N., Zelzer, S., et al. (2013). Oxidative stress and apoptosis in a pig model of brain death (BD) and living donation (LD). J. Transl. Med. *11*, 244.

Sung, R.S., Galloway, J., Tuttle-Newhall, J.E., Mone, T., Laeng, R., Freise, C.E., and Rao, P.S. (2008). Organ donation and utilization in the United States, 1997-2006. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *8*, 922–934.

Tabriziani, H., Lipkowitz, M.S., and Vuong, N. (2018). Chronic kidney disease, kidney transplantation and oxidative stress: a new look to successful kidney transplantation. Clin. Kidney J. *11*, 130–135.

Troppmann, C., Gillingham, K.J., Benedetti, E., Almond, P.S., Gruessner, R.W., Najarian, J.S., and Matas, A.J. (1995). Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. Transplantation *59*, 962–968.

Yalcin, S., Marinkovic, D., Mungamuri, S.K., Zhang, X., Tong, W., Sellers, R., and Ghaffari, S. (2010). ROS-mediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3(-/-) mice. EMBO J. *29*, 4118–4131.

Synthèse :

Actuellement, il manque des données fondamentales permettant d'améliorer la prise en charge des donneurs en ME et de qualifier précocement dès cette phase de réanimation les futurs greffons rénaux. La littérature scientifique fait état de données cliniques et précliniques contradictoires avec des différences importantes entre les données obtenues chez l'homme et chez les modèles animaux. Cette différence peut s'expliquer par le choix des modèles animaux utilisés avec 2 limites, l'utilisation de modèles murins et une cinétique de passage en ME très rapide voir instantanée. Les modèles murins dans le contexte de la transplantation rénale est très imparfait alors que le modèle porcin est plus satisfaisant anatomiquement et physiologiquement. De plus, une des autres limites des études précliniques est la cinétique de passage en ME qui ne correspond pas aux situations cliniques habituelles où les patients mettent plusieurs heures voire dizaines d'heures à passer en ME après la lésion cérébrale initiale. Récemment, une étude sur un modèle murin a comparé l'impact de la cinétique de la ME. Les résultats sont intéressants avec un effet péjoratif de la durée d'induction de la mort cérébrale sur des paramètres biologiques de lésions rénales mais cette étude n'évaluait pas la reprise de fonction post-greffe. Dans cette étude les auteurs ont mis en évidence une surexpression de gènes codant pour TNF-α et IL-6 dans le groupe à induction « lente » de la ME par rapport au groupe à induction « rapide ». Le même résultat est obtenu sur les mesures des concentrations plasmatiques d'IL-6. Concernant la concentration plasmatique de créatinine, là aussi les valeurs per-réanimation des animaux du groupe à induction lente sont plus élevées significativement que celles du groupe des animaux à induction rapide. Le seul paramètre hémodynamique renseigné dans cette étude est la pression artérielle moyenne. Les valeurs moyennes de MAP n'étaient pas significativement différentes entre les 2 groupes.

Dans notre étude préclinique sur un modèle porcin de ME nous avons obtenu des résultats similaires avec un impact péjoratif du passage lent en mort cérébrale sur la reprise de fonction

des greffons rénaux. L'originalité de notre travail repose sur l'utilisation d'un modèle porcin de ME, sur la greffe des reins issus de ce modèle et sur un suivi jusqu'à 3 mois ce qui permet de compléter les données de reprise de fonction initiale par des données sur les lésions chroniques.

La reprise de fonction primaire des greffons est nettement moins bonne chez les porcs greffés avec les reins provenant du groupe "lent" que celle des porcs greffés avec les reins provenant du groupe "rapide" avec une créatinémie plasmatique post-greffe bien supérieure la première semaine. Cette différence se retrouve sur les cinétiques de LDH post-greffe jusqu'à J14.

Les paramètres des donneurs en ME pouvant influencer la reprise de fonction primaire sont en clinique humaine, les états pathologiques préexistants avec l'âge, les co-morbidités cardiovasculaires (les donneurs dits à critère élargis), l'instabilité hémodynamique du donneur et la durée d'ischémie froide. Dans le contexte contrôlé de cette étude préclinique, les porcs avaient le même âge (14 semaines), étaient dénués de tout état pathologique détectable préexistant à l'expérimentation, bénéficiaient des mêmes durées de réanimation et les greffons subissaient la même durée d'ischémie froide en conservation statique. Seule l'hémodynamique lors du passage en ME était initialement plus instable dans le groupe brutale mais les variations subies étaient statistiquement identiques.

La qualité de la réanimation hémodynamique post-ME était identique. Les 2 groupes d'animaux étaient semblables sur les déterminants du transport en oxygène (le débit cardiaque, la saturation en oxygène de l'hémoglobine artérielle et la pression partielle en oxygène). De plus, les lactates sanguins prélevés en artériel dans les 2 groupes suivaient la même cinétique de croissance au moment de la mort encéphalique et après 60 minutes de réanimation, ce qui traduit une adéquation entre les apports et les besoins en oxygène dans les 2 groupes d'animaux. Néanmoins nous avons observé une augmentation progressive de la concentration plasmatique en LDH dans le groupe progressif qui ne s'explique que par la

cinétique de passage en ME le reste étant expérimentalement identique. Ce marqueur de lésion cellulaire était associé à une tendance à l'augmentation des ASAT qui peuvent être un marqueur de lésion tubulaire rénale, et à une dégradation de la fonction rénale avec, malgré une hémodynamique satisfaisante, une augmentation de la créatinine plasmatique. La durée de réanimation choisie a été de 4h en se basant sur le fait que ce délai permettait de stabiliser un état hémodynamique dans 100% des procédures et que cette durée était celle qui présentait un maximum d'expression tissulaire de marqueurs inflammatoires.

Nous avons choisi d'explorer la piste du stress oxydant et la réponse de l'organisme a ce stress. Ce choix se justifiait par les données issues des travaux de Stiegler et al. qui mettaient en évidence une activation du stress oxydatif dans les suites du passage en ME. Dans le travail de Stiegler la nitrotyrosine rénale, en immunohistochimie, était augmentée après la mort encéphalique. Or, le stress oxydant chez le donneur favoriserait les reprises retardées de fonction.

Dans l'étude de Stiegler, certains paramètres de réponse au stress oxydatif ont été étudiés : la superoxide dismutase 2, la gluthatione synthétase, le peroxisome proliferators-activated receptor alpha, l'oxydative stress responsive 1et la gluthatione peroxidase 3. Les auteurs n'avaient pas retrouvé d'augmentation de l'expression de ces gènes dans les reins de donneurs en mort encéphalique. Nous nous sommes intéressés à 3 marqueurs reflétant l'intensité du stress oxydant au niveau du tissu rénal : 4HNE, aconitase et nitrotyrosne. Pour mesurer la réponse au stress oxydant, nous avons analysé en Western blot, la voie de SIRT1, PGC1α et NRF2.

Nos résultats ont mis en évidence que la cinétique d'induction de la mort encéphalique n'influait pas ou peu sur l'intensité du stress oxydant, les niveaux de 4HNE, de nitrotyrosine et d'aconitase étant surexprimés de la même manière dans les 2 groupes. Par contre la réponse au stress oxydant médié par les sirtuine 1et 3 et PG1-α était plus importante

dans le groupe à induction rapide. NRF2 était surexprimé de la même manière dans les 2 groupes. Nous avons regardé l'expression de mTOR phosphorylé sur mTOR total. mTOR est un acteur incontournable de nombreux mécanismes cellulaires et notamment de régulation énergétique au sein des cellules tubulaires rénales et dans la génération de fibrose secondaire à une agression rénale, ce qui chez le greffon rénal, se traduit par une survie diminuée du greffon. Dans les reins explantés du groupe à induction rapide, l'expression protéique de mTOR est diminuée signicativement. Une modulation de mTOR par les ROS générés par le stress oxydatif est appuyée par des données scientifiques mais cette modulation peut aller dans le sens d'une up-régulation via l'AMPK ou dans le sens d'une down-régulation via FoxO3.

D'autre part, certaines publications récentes ont mis en évidence une régulation directe de mTOR par NRF2 ou une double down-régulation entre mTOR et NRF2.

Notre hypothèse était que la différence observée sur les reprises de fonction primaire de greffons rénaux en fonction de la cinétique de passage en ME était liée, non pas à une différence dans le niveau d'intensité du stress oxydant mais dans celui de la réponse conduisant à une modulation de mTOR via NRF2. Cette différence d'adaptation secondaire à une agression correspond au phénomène d'allostasie, i.e. l'adaptation d'un système à de nouvelles conditions environnementale. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un mécanisme d'allostasie chez le donneur est décrit. Cette différence d'adaptation allostatique pourrait trouver son origine dans les phénomènes protecteurs initiés par le shear stress. En effet, il a été démontré que le shear stress a un effet protecteur notamment par le biais de eNOS, et cet effet ferait intervenir SIRT 1. Or, nous avons mis en évidence une expression plus importante de P-eNOS/eNOS total dans le groupe à induction rapide de la mort encéphalique. Même si nous ne retrouvons pas de différence significative sur les paramètres hémodynamiques post-ME, les phénomènes hémodynamiques secondaires à la mort

encéphalique étaient plus condensés dans le temps dans le groupe à induction brutale (5 minutes) que dans le groupe progressif (90minutes). Nous pouvons émettre l'hypothèse que les cellules épithéliales rénales étaient soumises à un shear stress plus intense avec une activation de SIRT 1 plus importante pouvant expliquer nos résultats.

L'intérêt de ce travail est qu'il pourrait expliquer pourquoi les résultats dans la littérature sont parfois très divergents, indépendamment du choix du modèle murin. En effet, souvent l'analyse se base sur une intensité d'agression et non pas sur l'intensité de la réponse des systèmes de modulation à une même agression.

Ce travail présente des limites dans l'extrapolation de ces résultats, d'une part chez l'homme, d'autre part sur des reins présentant des lésions préexistantes (mTOR étant régulé de diverses manières lors de pathologies rénales). De plus même si ces résultats ont une certaine validité externe car confirmant ceux de Schuur et al., il manque des données sur la voie que nous avons explorée et d'autres expérimentations sont nécessaires.

Si ces résultats viennent à être confirmés, plusieurs applications potentielles peuvent être envisagées : l'utilisation thérapeutique de modulateur de mTOR et/ou de NRF2 chez le donneur décédé après mort encéphalique et une qualification précoce des greffons rénaux par analyse de l'expression de mTOR et NRF2. L'accès à cette information nécessiterait une approche invasive mais une hypothèse de travail est l'analyse de matériel cellulaire rénal dans les urines du donneur comme cela a déjà était évalué dans le domaine de la cancérologie.

La cinétique de passage en mort encéphalique influence la reprise de fonction précoce des greffons et l'intensité de la fibrose dans ce modèle porcin d'allogreffe rénale. Le mécanisme impliqué semblerait être une réponse allostatique différente de la voie de réponse au stress oxydant modulant le système NRF2-mTOR. La confirmation de ces résultats permettrait de proposer de nouveaux moyens de qualification et de préconditionnent du donneur en mort encéphalique.

2) Article 2 :

Thomas Kerforne, Geraldine Allain, Sébastien Giraud, Delphine Bon, Virginie Ameteau, Pierre Couturier, William Hébrard, Jérôme Danion, Jean-Michel Goujon, Raphael Thuillier, Thierry Hauet, Benoit Barrou, Christophe Jayle. Defining the optimal duration for normothermic regional perfusion in the kidney donor: a porcine preclinical study. Am J Transplant. 9 août 2018;

Rappel des objectifs et hypothèses :

Les reins issus de donneur décédés après arrêt circulatoire permettent d'augmenter le pool de greffons. Les reprises de fonction primaire sont variables du fait de la fragilité de ces organes soumis à une période d'ischémie chaude obligatoire de par la nature des donneurs.
Il existe deux possibilités de prise en charge de ces donneurs :

- Le refroidissement rapide avec un lavage des organes intra-abdominaux par une solution de conservation à 4°C ;
- Le reconditionnement par la mise en place d'une ECMO V-A sur les organes intra abdominaux appelée circulation régionale normothermique (CRN) dans le contexte.

Les données cliniques semblent en faveur de l'utilisation de la CRN mais il n'y a pas d'étude comparative méthodologiquement bien faite. De plus les modalités de mise en œuvre de la CRN sont variables selon les pays avec notamment des temps de reconditionnement allant de 2 heures à 6 heures. Deux questions sur l'utilisation de la CRN persistent : les voies de reconditionnement mises en jeux par la technique et la durée optimale de ce reconditionnement
Le but de ce travail était de comparer à l'aide d'un modèle porcin les reprises de fonction primaire des reins issus de DDAC soumis ou non à une CRN et reconditionnés par des temps de CRN de 2h, 4h et 6h. Ce travail évaluait aussi l'impact de la CRN sur la survenue de lésions chroniques post-greffe par l'évaluation de la fonction rénale et du degré de fibrose.
Enfin plusieurs voies de reconditionnement ont été évaluées :

- La voie de HIF-1α avec l'angiogénèse et l'érythropoïèse,
- La voie de l'activation de l'inflammation par la coagulation via les PARs.

Publication

Synthèse

Les données cliniques sont plutôt en faveur de la prise charge du DDAC par une CRN que par un refroidissement *in situ* même si à l'heure actuelle il n'y a pas de recommandation en ce sens pour les DDAC non contrôlés de classe Maastricht II (4,18).

Malgré cette tendance, de par la grande hétérogénéité des pratiques quant à la mise en œuvre de la CRN, les questions de la durée nécessaire et de la nature du reconditionnement qu'elle permet étaient sans réponse. Ces données permettraient d'optimiser la technique ce qui justifie notre travail.

Nous avons évalué les reprises de fonction précoce des greffons issus de DDAC soumis à des temps différents de CRN en procédant à des allogreffes sur des porc SLA compatibles (équivalant porcin du HLA). Les reins étaient au préalable conservés en machine à perfuser type ORS avec une solution de conservation de type UW. Les meilleures reprises de fonction ont été observées dans les groupes 4h et 6h de CRN. Ces constatations restaient valables pour les débits de filtration glomérulaire à 3 mois ainsi que pour les lésions de fibrose.

Le modèle porcin que nous avons mis au point et employé a permis une stabilité hémodynamique reproductible jusqu'à 4h de CRN. A 6h on a observé une dégradation avec une baisse de l'hémoglobine secondaire à 2 phénomènes : l'hémodilution et l'hémolyse secondaires à l'utilisation d'une circulation extracorporelle, et aux suffusions hémorragiques intra péritonéales inévitables dans notre modèle.

La CRN permet d'activer la voie de reconditionnement initiée par HIF1α avec l'expression d'EPO, de VEGF, de Glut-1 et de HO-1. Le pic d'expression de ces paramètres s'observe à 4h de CRN.

L'autre voie de reconditionnement que nous avons étudiée est celle liée à l'activation de l'inflammation *via* la coagulation par l'intermédiaire des PARs. Nous nous sommes intéressés essentiellement à la voie du facteur tissulaire et de PAR2 ainsi qu'à la réponse à l'initiation de la coagulation par la thrombomoduline. La CRN permet une diminution du facteur tissulaire circulant et une restauration de l'expression de

thrombomoduline down-régulée lors de l'ischémie chaude. Néanmoins à partir de 2h de CRN on observe une surexpression et une activation par phosphorylation du facteur tissulaire dans le tissu cortical rénal et à 4h une augmentation de PARs2 clivé donc activé.

La résultante de ces 2 voies activées et modulées lors de la CRN est une diminution de la forme inductible de iNOS délétère pour les greffons et une expression en ARNm progressive de cytokines pro et anti-inflammatoires, expression significative à partir de 4h de CRN.

Il est à noter que la CRN permet une sécrétion de NO croissante jusqu'à 4h par la voie protectrice d'eNOS activée par phosphorylation dont on a montré une cinétique superposable.

Le délai de 4h de CRN sans autre intervention semble un temps pivot qui permet un reconditionnement ischémique optimal mais à partir duquel certains mécanismes lésionnels commencent à se mettre en action avec des marqueurs de lésion rénale (KIM, NAGL) qui après une première décroissance se remettent à être sécrétées.

Au total, ce travail permet de donner des premiers éléments de réponse quant au délai optimal de reconditionnement par CRN qui semblerait être de 4h et sur les mécanismes de reconditionnement des reins par la CRN.

Le reconditionnement ischémique par la voie de HIF-1α semble efficient mais l'amorce de dégradation biologique et tissulaire observée entre 4 et 6h semble avoir une double origine :

L'altération du transport en oxygène avec la diminution significative de l'hémoglobine entre 4 et 6h de CRN et l'activation de la coagulation entraînant celle de l'inflammation.

Le transport en oxygène pourrait être amélioré par une simple transfusion mais on peut imaginer utiliser des transporteurs innovant comme l'hémoglobine de ver marin déjà utilisé en conservation et pouvant apporter en plus une action anti-oxydantes.

L’autre piste d’amélioration thérapeutique serait de tester des molécules anticoagulantes modulant la réaction inflammatoire par inhibition de la coagulation de manière plus efficace que l’héparine non fractionnée utilisée en pratique clinique et dans notre modèle.

Partie II : innovation thérapeutique

1) Article 3: Giraud S, Kerforne T, Zely J, Couturier P, Tauc M, Hauet T. Preventive GC7 reduces brain death-induced renal injuries in a preclinical kidney transplantation porcine model. Soumis à JASPN.

Rappel des objectifs et hypothèses :

La mort encéphalique génère de graves troubles de l'homéostasie avec notamment un stress oxydatif important qui induit des lésions rénales dès la période de réanimation. Ce stress oxydatif est aggravé lors de la séquence d'I/R secondaire au prélèvement, à la conservation et à la réimplantation de l'organe.

Une thérapeutique permettant de réduire les conséquences du stress oxydant sur les futurs greffons rénaux permettrait théoriquement d'améliorer les reprises de fonction primaire et les lésions chroniques notamment de fibrose.

GC7 est un inhibiteur très spécifique de la désoxyhypusine synthase (DHS). En tant qu'inhibiteur compétitif, il se lie au site actif de la DHS et empêche la première étape de la conversion post-traductionnelle d'une seule lysine en hypusine dans le facteur 5A (eIF5A).

Le traitement par GC7 des cellules proximales rénales a induit de manière réversible un glissement métabolique vers la glycolyse ainsi qu'un remodelage mitochondrial et a conduit à une expression et une activité moins régulées des complexes de la chaîne respiratoire, caractéristiques du " silencing " mitochondrial. Cette modulation mitochondriale GC7 peut entraîner une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs).

Nous avons déjà montré dans un modèle porcin d'auto-transplantation que l'injection intraveineuse de GC7 avant l'ischémie chaude et la conservation statique à 4°C en UW (University of Wisconsin solution) diminuait significativement le stress oxydatif et l'apoptose 30 min après la transplantation rénale, ce qui améliore la récupération fonctionnelle rénale et réduit les lésions de fibrose interstitielle à 3 mois après transplantation.

L’objectif de notre travail est d’étudier l'effet du N-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7), analogue de la spermidine, sur la protection des reins dans un modèle porcin de DME induite progressivement.

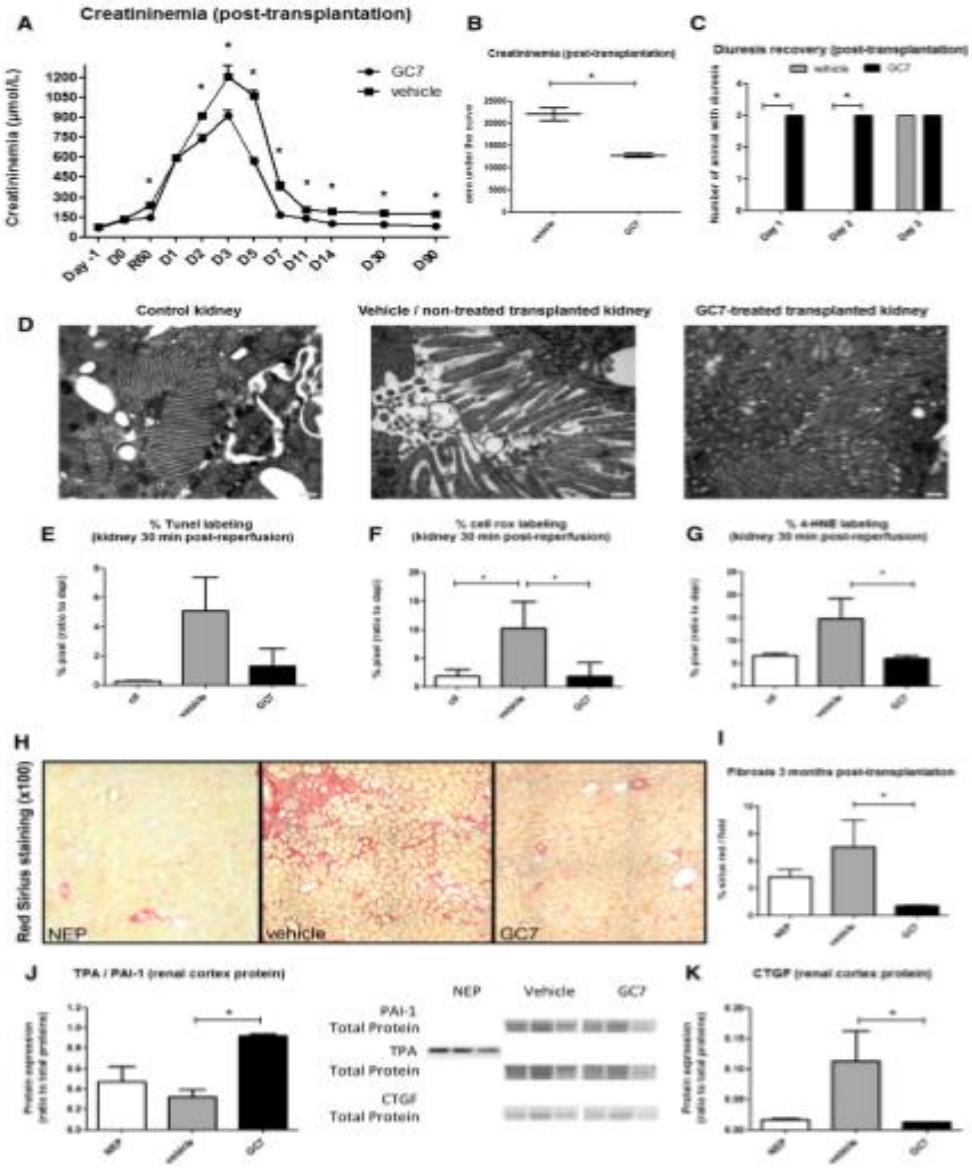

Figure 10. Résultats principaux justifiant l’étude (Melis et al., 2017).

(A) Les concentrations plasmatiques de créatinine étaient significativement plus basses dans le groupe GC7 que dans le groupe contrôle en post greffe. (B) Ce résultat ce retrouve aussi pour les surfaces sous courbe des cinétiques de créatinines post greffe. (C) Les animaux du groupe GC7 reprennent une diurèse dès J1 alors que les contrôles ne la reprenne qu’à J3. (D) Les aspects de bordures en brosse des cellules tubulaires rénales semble mieux préservées en microscopie électronique dans le groupe traité par GC7 que dans le groupe contrôle. (E-G). L’analyse immunohistochimique des greffons du groupe GC7 présentent moins

d’apoptose (marquage TUNEL) et moins de stress oxydant (CellRox, 4-HNE). (H-K). Les greffons du groupe traité par GC7 présentent moins de fibrose et de marqueurs de fibrose à 3 mois.

Publication

Preventive GC7 reduces brain death-induced renal injuries in a preclinical kidney transplantation porcine model

Sebastien Giraud [1,2,3 #], Thomas Kerforne [1,3,4 #], Jeremy Zely [1,3,4], Pierre Couturier [1,2,5], Michel Tauc [6], Thierry Hauet [1,2,3,5,7]

Affiliations:

[1] INSERM U1082 IRTOMIT, Poitiers, F-86000, France

[2] CHU Poitiers, Service de Biochimie, Poitiers, F-86000, France

[3] Université de Poitiers, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Poitiers, F-86000, France

[4] CHU Poitiers, Service d'Anesthésie-Réanimation, F-86000 Poitiers, France

[5] IBiSA 'plate-forme MOdélisation Préclinique - Innovations Chirurgicale et Technologique (MOPICT)', Domaine Expérimental du Magneraud, Surgères, F-17700, France

[6] University of Nice-Sophia Antipolis, LP2M, CNRS-7370, Nice, F-06107, France

[7] FHU SUPORT 'SUrvival oPtimization in ORgan Transplantation', Poitiers, F-86000, France

[#] S Giraud and T Kerforne participated equally to the work.

Running Title: Brain death donor conditioning with GC7

Corresponding author: Thierry HAUET (MD, Ph.D)

Address : INSERM U1082, CHU de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, BP 577, 86021 Poitiers, France. **Phone:** +33.5.49.44.48.29, **Fax :** +33.5.49.44.38.34, **Email: thierry.hauet@gmail.com**

Abstract

N1-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7), an inhibitor of eIF5A hypusination, protects to ischemic injuries. Thus, GC7 could be useful in order to preconditioning kidneys from donors before transplantation process. Using a pig brain-death (BD) donation preclinical model, we carried out the *in vivo* evaluation of GC7 pre-treatment (3 mg/kg iv bolus, 5 min after BD), at the beginning of the 4h-donor management, after which kidneys were collected, cold-stored (18h in UW), and one was allo-transplantated in a double-nephrectomized recipient. Groups were defined as follows (n=6 per group): healthy (CTL), untreated BD (Vehicle) and GC7-treated BD (GC7). At the end of 4h-management, GC7 decreased BD-induced markers (i) eIF5A hypusination, (ii) tissue levels of reactive oxygen species markers, and (iii) the mitochondrial-dependent apoptosis pathway (Bax and cleaved Caspase-9). In addition, GC7 increased (2 to 6-fold, $p<0.05$) the expression of anti-oxidant proteins (SOD2, HO-1, PGC1, NRF2, and total & phosphorylated-Sirtuin1 & 3). At the end of cold storage, GC7 treatment induced an increase of NRF2 and PGC1a mRNA and a better mitochondrial integrity/homeostasis with an increase of the Bcl-2/Bax anti-apoptotic ratio, of MFN2 and mTOR ($p<0.05$). The GC7 treatment improved significantly the kidney outcome during 3 months follow up after transplantation; decrease of NGAL and creatinine blood levels, as well as fibrosis. At the brain-death donor management phase, GC7 treatment proved protective for kidneys against brain-death-induced injuries; during the cold storage phase, GC7 appeared to preserve antioxidant defences and to protect mitochondria. Early and long-term, post-transplantation propagation of observed protective effects induced better graft function outcome.

Introduction

Organ transplantation is the most cost-effective treatment for end-stage renal failure. However, this success has led to an organ shortage crisis, and only one quarter of patients on waiting list have access to organ transplantation. This state changed the donor demography, with the increased use of organs from extended criteria donors (ECD) from Brain Death Donor (BDD) with important co-morbidity factors. However, older and more ECD donors following the physiologically abnormal state of brain death do function less well and have a shorter graft survival[1]. These ECD organs are more prone to ischemia-reperfusion injuries (IRI), which have a critical influence on graft outcome.

Cerebral injury leading to brain death (BD) causes major physiologic troubles in potential organ donors, which may result in progression of hemodynamic troubles, oxidative stress and kidney injuries[2,3]. Rat model of slow and fast BD induction, showed that slow induction of BD leads to poorer renal function compared to fast induction[3]. Renal inflammatory and oxidative stress markers were increased in slow BD induction[3]. In a porcine donor model of slow BD induction, immunohistochemistry revealed more apoptotic and nitrotyrosine positive cells (marker of oxidative stress) in kidney tissue of BD donor compared to prior BD induction[4].

Thus new donor management treatment strategies must to be developed to limited these injuries and improved kidney quality and graft outcome. For this purpose we explored the effect of the spermidine analog N-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7)[5] in the protection of kidney during BD donor management. GC7 is a highly specific inhibitor of deoxyhypusin synthase (DHS), as a competitive inhibitor it binds to the active site of DHS and prevents the first step in the post-translational conversion of a single lysine to hypusine in translation initiation factor 5A (eIF5A)[6].

GC7 treatment of renal proximal cells reversibly induced a metabolic shift toward glycolysis as well as mitochondrial remodeling and led to downregulated expression and activity of respiratory chain complexes, features characteristic of mitochondrial 'silencing'[7]. This mitochondrial GC7 modulation may leads to decrease the radical oxygen species (ROS) production. Previously, in our preclinical pig kidney transplant model, we showed that the intravenous injection of GC7 before warm ischemia and cold storage significantly decreased kidney oxidative

and apoptosis stress 30 min after kidney transplantation And thus consequently improved kidney function recovery and reduced late interstitial fibrosis after transplantion[7].

In this way, in this present study, we evaluated the GC7 treatment benefits during BDD management in a pre-clinical slow BD induction porcine donor model, with the main advantage that porcine and human kidneys are extremely similar in size, structure and function[8]. We demonstrate that the pharmacological GC7 treatment during BDD management decreased the oxidative stress and apoptosis induced by BD, increased cytoprotective and mitoprotective markers and kidney markers injury at the end of donor management and kidney cold storage and finally improved kidney graft transplantation outcome. This innovative pharmacological target could be an interesting way to preconditionning organs from BDD and improve the graft quality.

Results

GC7 did not impact the hemodynamic parameters during donor management

As expected, we observed a significant increase of Mean Arterial Pressure (MAP) and Cardiac Output (CO) at the time of brain death (BD) in our porcine model. However, at the BD time no hypoxia was observed, as no modification of Blood oxygen Partial pressure (PaO_2) as well as Hemoglobin (Hb) levels. At this BD time, no differences between GC7 treated group and Vehicle group were observed. During 240 min of donor management after BD (aBD) we observed no difference between GC7 treated group and Vehicle group (except, inexplicably, for MAP with a significant increase in GC7 group at T120 after BD versus Vehicle group, respectively 91±14 vs 74±3 mmHg) (Table 1). Herein GC7 did not appear to alter the hemodynamic of treated donor animals.

GC7 treatment inhibited EIF5A hypusination

In order to confirm the GC7 effect on inhibition of eIF5A hypusination, we proceeded to a protein expression evaluation by western blot on renal tissue 240 min after BD. Indeed, we observed a significant inhibition of protein hypusinated eIF5A (ratio to eIF5A total) in the GC7 group compared to the Vehicle group ($p<0.05$) (Figure 1A). This result is the proof of the pharmacological effect of GC7 in this model.

GC7 treatment enhanced anti-oxidant and mito/cyto-protective pathways during donor management

As known as BD induce oxidative stress, we evaluated it on renal tissue 240 min after BD, also we observed a significant increase of mitochondrial Aconitase 2, Nitrotyrosine and Cell Rox staining in the Vehicle group compared to CTL group (no-BD). Interestingly GC7 treatment reduced significantly Nitrotyrosine and Cell Rox staining 240 min after BD (Figures 1B-E). Thus we evaluated the response to oxidative stress; BD induced a decreased of Superoxyde-Dismutase-2 (SOD2) mRNA and a significant increase of Heme Oxygenase-1 (HO-1) and Erythropoietin (EPO) mRNA 240 min after BD (Figure 1F-H). But BD had no impact on SOD2, and EPO protein expression 240 min after BD (Figure 1I, 1K). Interestingly, we observed that GC7 induced an anti-oxidative response marked by an increase of HO-1 protein expression compared to Vehicle group (Figure 1J). We showed that the HO-1 and EPO response observed in our BD model, was not due to Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1) activation (Figure 1L). In

association, 240 min after BD, GC7 treatment induced anti-oxidative response marked by a significant increase of total and phosphorylated Sirtuine-1 (SIRT-1), Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2) and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Coactivator-1-alpha (PGC1□) proteins expression compared to Vehicle and CTL groups (Figure 2A-D). As PGC1□ induces mito-protective benefits, 240 min after BD we then evaluated markers of dynamic mitochondrial. In our model, BD induced an increase of mitochondria loss integrity marked by expression of activated Dynamin related protein-1 (DRP1) phosphorylated-Ser616, Bax and cleaved Caspase-9, and a basal expression of Mitofusin-2 (MFN2) and mammalian Target of Rapamycin (mTOR) activation. Whereas we observed, in association with PGC1□ level, that these markers expression were inhibited by GC7 (Figures 2E-H), excepted for mTOR activation which was increase after GC7 treatment (Figure 2I). These markers of dynamic mitochondrial regulation/protection induced by GC7, could enhanced an adapted response to stress by expression of mitochondrial protective and mitophagic pathways.

GC7 treatment limits kidney injuries during donor management

To link the molecular/cellular effects of GC7, we evaluated the kidney function during donor management. As excepted, GC7 treatment induced a decrease of DB-induced injury, with a significant diminution of blood Creatinine and Lactate Dehydrogenase (LDH) levels and a tend to decrease the Aspartate Aminotransferase (AST) and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) blood levels (Figure 3A-H). In our model, we observed that the difference between groups was marked at 120 min after BD until 240 min (excepted for NGAL). At 240 min after BD, histological renal tissue integrity was not different between Vehicle and GC7 groups (Figure 3I).

GC7 treatment induces cytoprotective pathway maintenance after kidney cold storage

In term to evaluate the preconditioning effect of GC7 previous to kidney transplantation, we evaluated effect of GC7 treatment on ischemic injuries. At the end of cold storage (CS), we observed a significant increase of HO-1 and EPO RNA on kidneys from BDD, probably due to HIF-1□ activation (Figure 4A-C). Indeed, the GC7 treated kidney showed a more significant HO-1 RNA expression compared to Vehicle group (Figure 4A). In term of markers of positive mitochondrial dynamics regulation; Bcl2 and MFN2 increased significantly in the GC7 group compared to Vehicle group, and markers of negative mitochondrial dynamics regulation; Bax and Phosphorylated DRP1,

decreased significantly in the GC7 group compared to Vehicle group (Figure 4D-F). These markers of mitochondrial protection induced by GC7, could be associated with the increase of protective mitophagy in the GC7 group via significant mTOR activation (Figure 4G). In addition, RNA of anti-oxidative and cytoprotective markers, PGC1□, NRF2, mitochondrial Uncoupling Protein (UCP)-2 and UCP3, increased significantly in the GC7 group compared to Vehicle group or CTL group (Figure 4G-J). Nevertheless, no difference on histological renal injury was observed between Vehicle and GC7 groups (Figure 4K).

GC7 treatment improves early kidney function recovery after transplantation

In term to evaluate the BDD preconditioning effect with GC7 on kidney transplantation, we measured the graft function recovery on the first 14 days after transplantation. No difference was observed on diuresis recovery between GC7 treated and Vehicle kidneys (Figure 5A). However, donor preconditioning with GC7 induced a better Glomerular Filtration Rate **(**GFR) on transplanted kidneys compared to Vehicle group (Figure 5B-C). In term of kidney markers function and injury, we observed that GC7 donor treatment induced a significant decrease of blood Creatinine, fractional sodium excretion, blood LDH and blood HMGB1 in the transplanted kidney compared to Vehicle group (Figure 5D-K). Indeed, no difference was observed, in the blood NGAL marker of kidney injury, between Vehicle and GC7 groups (Figure 5L-M).

GC7 treatment improves late kidney function 3 months after transplantation

As known as early IRI are correlated to tardive kidney injury, we evaluated the kidney function and histology at day 90 after transplantation. The GC7 donor treatment induced a significant decrease of blood Creatinine and blood NGAL compared to Vehicle group (Figure 6A-B). This result is associated with a significant decrease of histological kidney injuries, as interstitial Fibrosis, leukocyte infiltration, Tubulitis and alpha-smooth muscle actin (□SMA) staining, in the GC7 group compared to Vehicle group (Figure 6C-G).

Table 1: Hemodynamic parameters evolution of Vehicle and GC7 groups, at control time (Baseline), at brain death (BD) and during 240 minutes of porcine management after brain death (aBD).

Time per brain death (BD) – per Management aBD (min)	**CTL (T0)**	**BD**	**T60 aBD**	**T120 aBD**	**T180 aBD**	**T240 aBD**
MAP (mmHg) -Vehicle group	105 ± 2	146 ± 13$^{\beta}$	68 ± 5	74 ± 3$^{£}$	71 ± 4	72 ± 8
MAP (mmHg) - GC7 group	102 ± 4	160 ± 10$^{\beta}$	78 ± 6	91 ± 14	75 ± 2	83 ± 3
CO, l/min - Vehicle group	6.7 ± 1	10.6 ± 2$^{\beta}$	7.7 ± 1	7.4 ± 1	6.5 ± 1	7.5 ± 2
CO, l/min - GC7 group	5.4 ± 1	11 ± 2$^{\beta}$	7.2 ± 1	8 ± 1	7.4 ± 2	7 ± 1
PaO_2, mmHg - Vehicle group	365 ± 113	394 ± 134	374 ± 180	260 ± 63	405 ± 103	326 ± 127
PaO_2, mmHg - GC7 group	333 ± 97	334 ± 120	324 ± 75	254 ± 48	334 ± 103	301 ± 122
Hb, g/dl - Vehicle group	9.0 ± 0.5	11.0 ± 1	10.1 ± 1	9.6 ± 1.6	10.3 ± 1.5	11 ± 1.5
Hb, g/dl - GC7 group	8.6 ± 0.5	11.6 ± 0.8	9.7 ± 1	10.2 ± 1.5	10.1 ± 1.5	10.5 ± 1.5

MAP (Mean Arterial Pressure), CO (Cardiac Output), PaO_2 (Blood oxygen Partial pressure), Hb (Hemoglobin), BD= Brain Death, aBD= after brain death. Results are expressed as mean ± SEM. Statistics: $p<0.05$; $^{\beta}$ time vs CTL (T0) and $^{£}$ GC7 group vs Vehicle group.

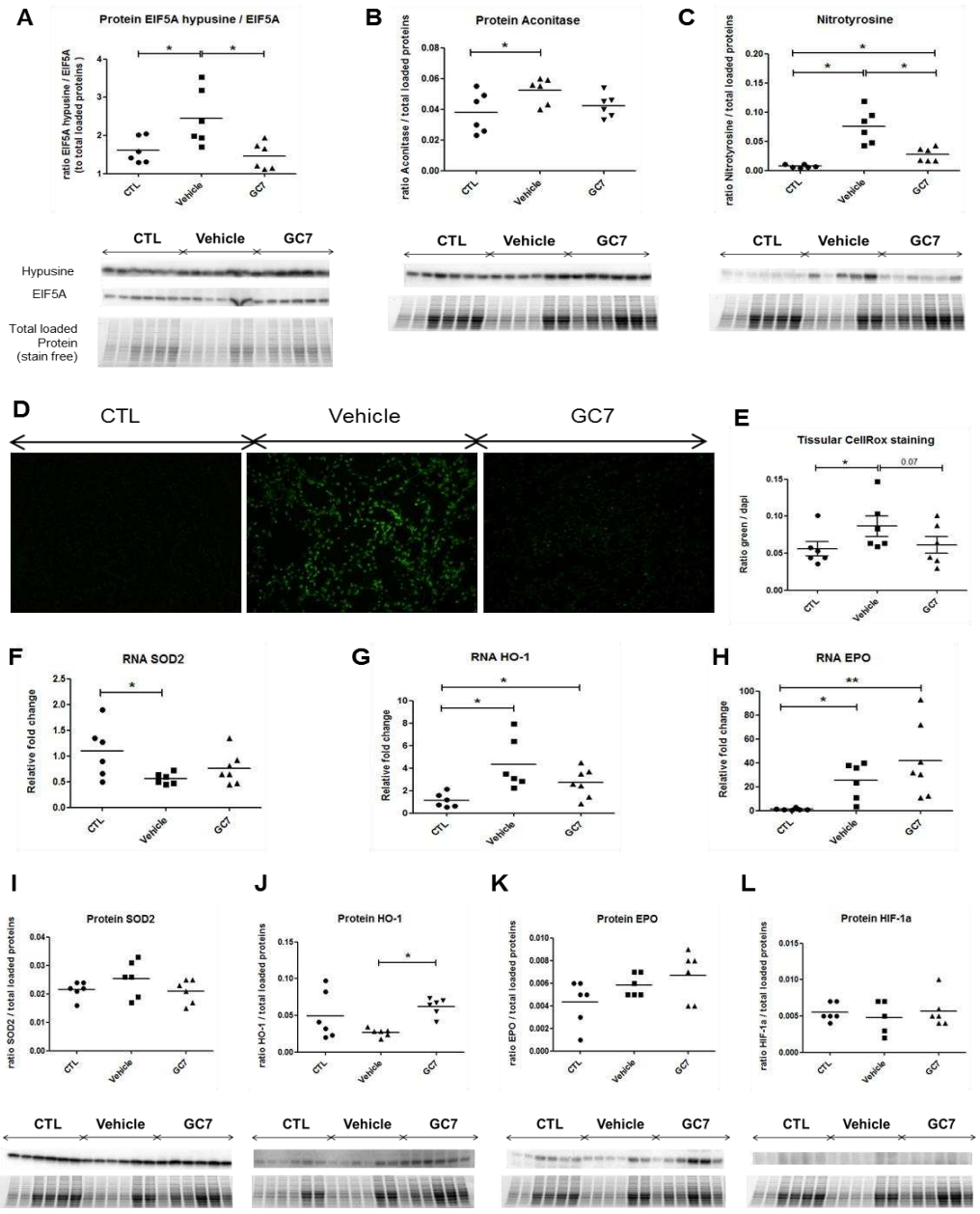

Figure 1: GC7 treatment impacts on EIF5A hypusination and oxidative stress during donor management

Protein expression level of EIF5A hypusine/EIF5A (A), Aconitase (B), Nitrotyrosine (C), SOD2 (I), HO-1 (J), EPO (K) and HIF-1a (L) detected by Western Blot, and histological tissue Cell-Rox staining (E), and mRNA SOD2 (F), HO-1 (G), EPO (H) levels at the end of GC7 treated (GC7) or not (Vehicle) brain death donor management versus Control kidney (CTL) (n= 6 per group). Results are expressed as scatter dot plot, line as mean. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Statistical analysis were performed with Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Dunn's Test.

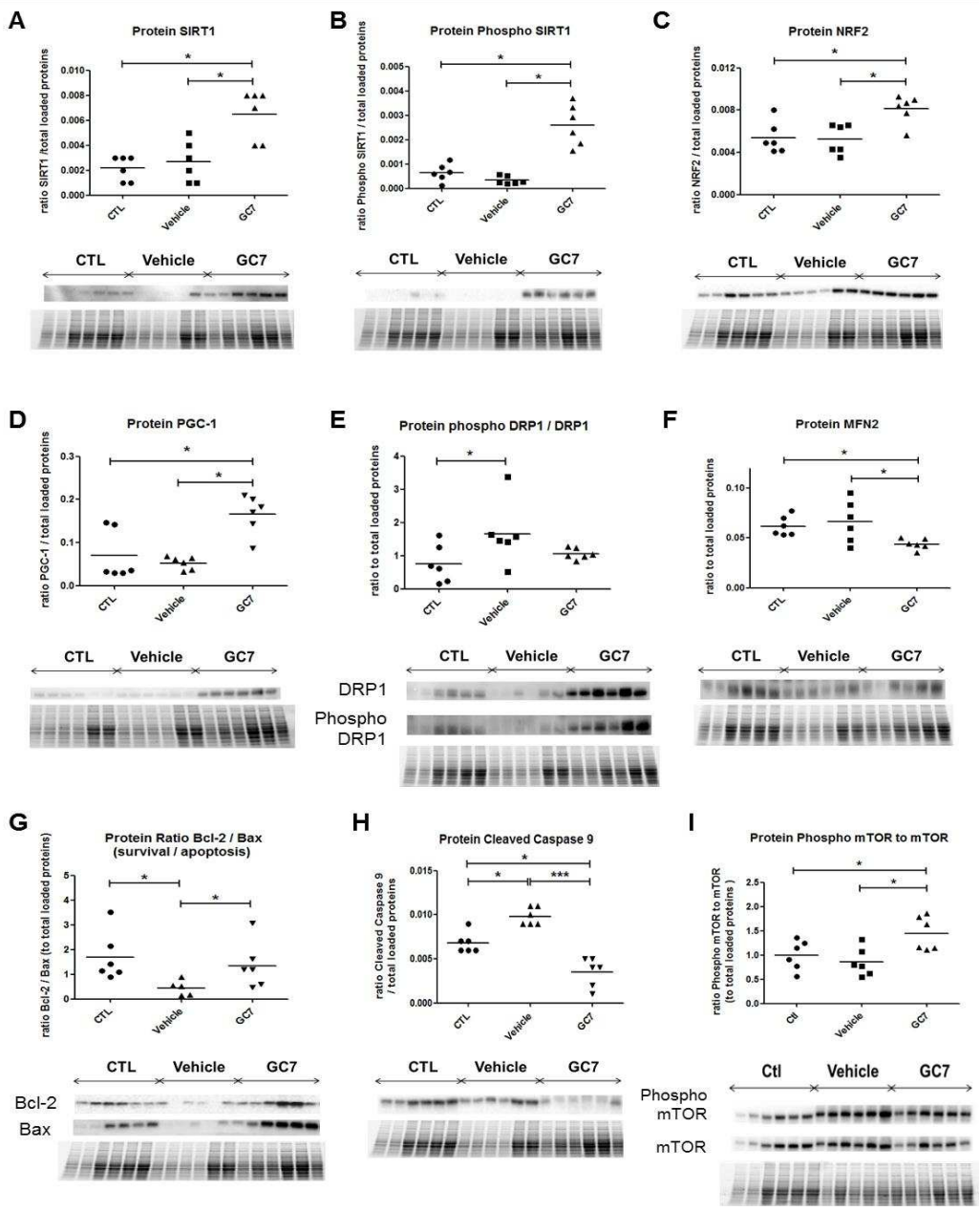

Figure 2: GC7 treatment enhance anti-oxidative and mitochondrial protective pathway during donor management Protein expression level of SIRT1 (A), Phosphorylated SIRT1 (B), NRF2 (C), PGC1α (D), Phosphorylated Ser-616 DRP1 (E), MFN2 (F), ratio Bcl-2 / Bax (G), cleaved Caspase 9 (H) and mTOR activation (I: ratio Phosphorylated mTOR / to total mTOR) detected by Western Blot at the end of GC7 treated (GC7) or not (Vehicle) brain death donor management versus Control kidney (CTL) (n= 6 per group). Results are expressed as scatter dot plot, line as mean. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Statistical analysis were performed with Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Dunn's Test.

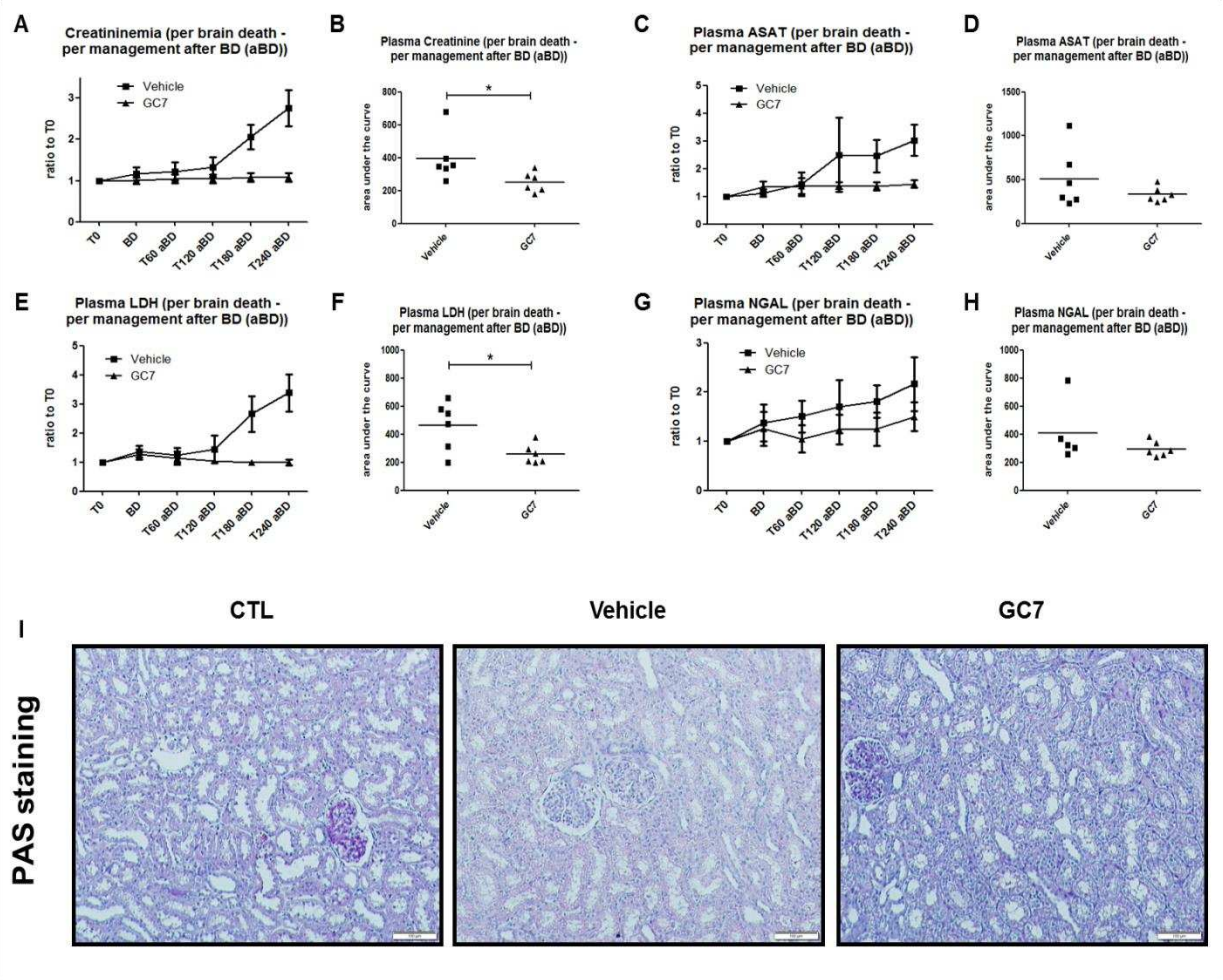

Figure 3: GC7 treatment limits kidney injuries during donor management Creatininemia (A-B), ASAT (C-D), LDH (E-F) and NGAL (G-H) quantitation in the plasma, investigated at control time (T0), at the brain death time (BD), and per donor management at 60, 120, 180 and 240 min after brain death (aBD) (n= 6 per group). Results (A) (C) (E) (G) are expressed as mean ± SD, and (B) (D) (F) (H) are expressed in area under the curve (scatter dot plot, line as mean). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Statistical analysis were performed with Mann-Whitney. Representations of kidney histological structures at the end of donor management 240 after brain death (I) (PAS staining, magnification x100).

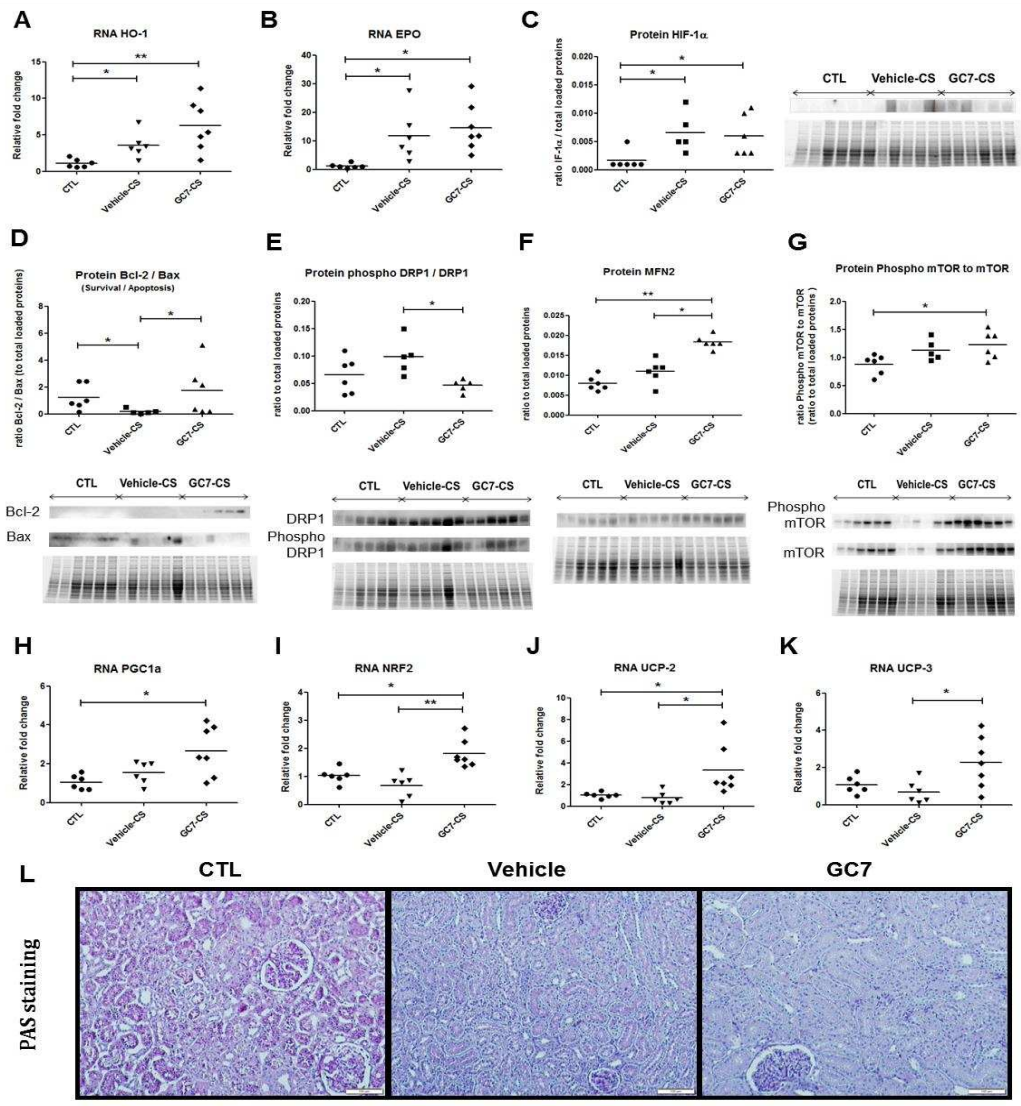

Figure 4: GC7 treatment maintained anti-oxidative and mitochondrial protective pathway after kidney cold storage Protein expression level of HIF1a (C), ratio Bcl2 / Bax (D), Phosphorylated Ser-616 DRP1 (E), MFN2 (F) and mTOR activation (G: ratio Phosphorylated mTOR / to total mTOR) detected by Western Blot, and mRNA HO-1 (A), EPO (B), PGC1a (H), NRF2 (I), UCP2 (J) and UCP3 (K) levels at the end of cold storage 18h in UW at 4°C of kidney previously treated with GC7 (GC7-CS) or not (Vehicle-CS) during brain death donor management versus Control kidney (CTL) (n= 6 per group). Results are expressed as scatter dot plot, line as mean. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Statistical analysis were performed with Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Dunn's Test. (L) Representations of kidney histological structures at the end of cold storage (PAS staining, magnification x100).

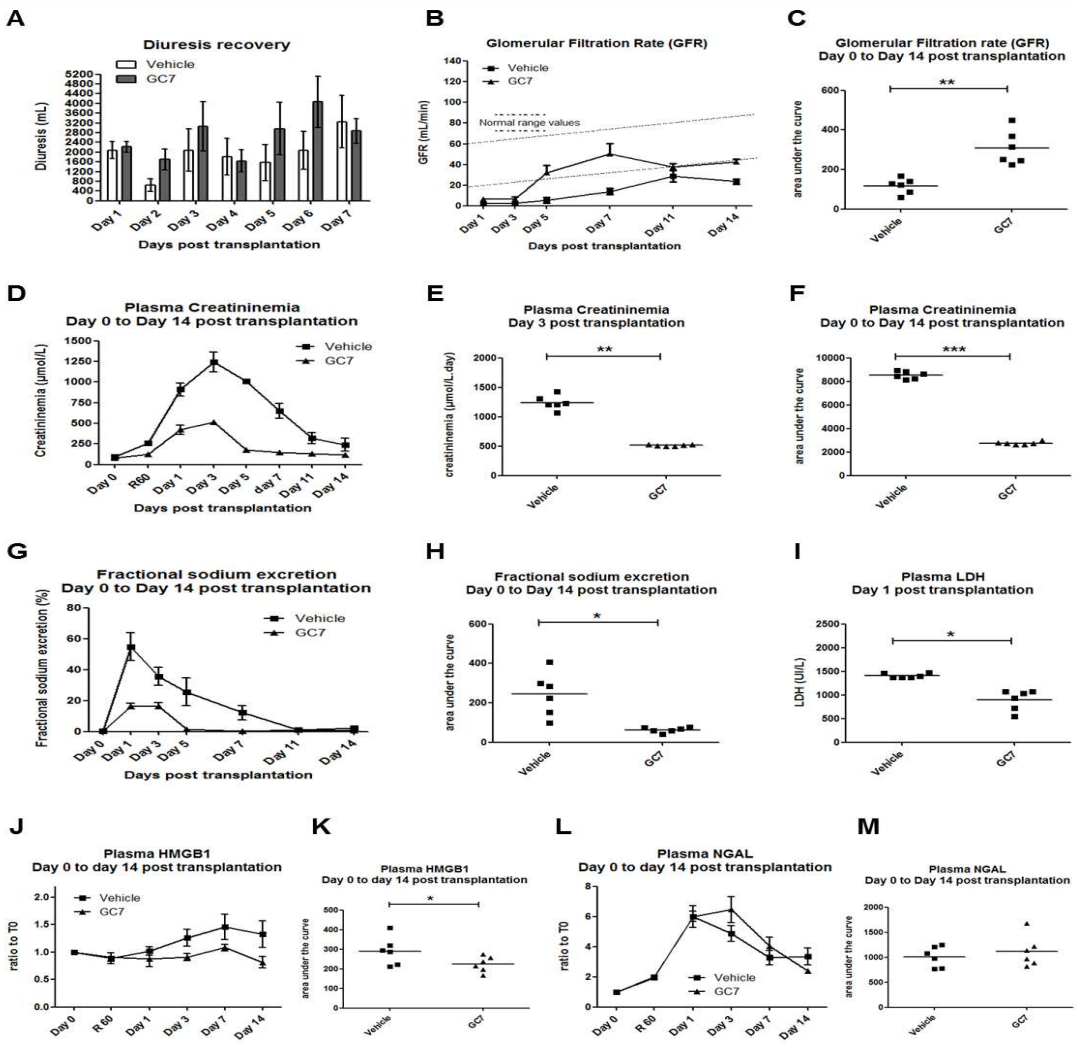

Figure 5: GC7 treatment improves early kidney function recovery after transplantation Renal function evaluation from day 0 to day 14 after allotransplantation of kidneys submitted to GC7 treatment (GC7) or not (Vehicle) during donor management: animal diuresis recovery (A), Glomerular filtration rate in mL/min (B-C), plasma creatinine (D-F), Fractional sodium excretion (G-H), LDH (at day 1 after allotransplantation) (I), plasma HMGB1 (J-K) and plasma NGAL (L-M). (n= 6 per group). Results (A) (B) (D) (G) (J) (L) are expressed as mean ± SD, and (C) (E) (F) (H) (I) (K) (M) are expressed in scatter dot plot, line as mean. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Statistical analysis were performed with Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Dunn's Test.

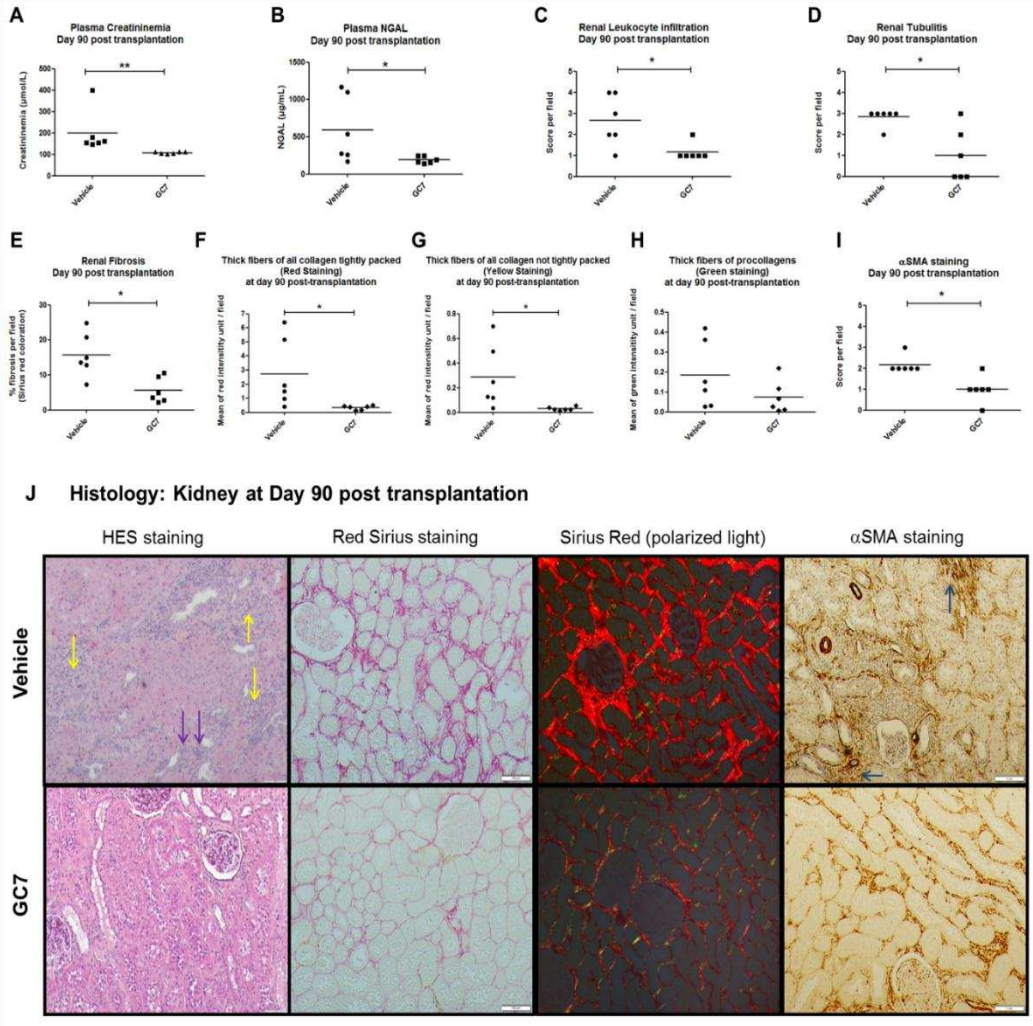

Figure 6: GC7 treatment improves tardive kidney function at day 90 after transplantation

Renal injury evaluation at day 90 after allotransplantation of kidneys submitted to GC7 treatment (GC7) or not (Vehicle) during donor management: plasma creatinine (A), plasma NGAL (B), histological renal leukocyte infiltration (C), renal tubulitis (D), renal fibrosis on Sirius Red staining on normal light) (E), evaluation of collagen fibers type on interstitial fibrosis evaluated by Sirius red on polarized light (F, G, H: tightly collagen fibers, not tightly and procollagen) and αSMA staining (I). (J) Tissue leukocytes infiltrate and tubulitis at 90 days after kidney transplantation, were scored as: 0= no infiltrate, 1= weak localized infiltrate, 2= weak diffused infiltrate, 3= intense localized infiltrate, 4= intense diffused infiltrate and 5= intense diffused and localized infiltrates. Tissue αSMA scoring at 90 days after kidney transplantation was scored in % of αSMA staining per field, as: 0= 0%, 1= 1% to

10%, 2 = 11% to 25%, 3= 26% to 50%, 4= 51% to 75%, 5 = 76% to 100%. (n= 6 per group). Representations pictures of kidney histological leukocyte infiltration (yellow arrow) and tubulitis (purple arrow) on HES staining, renal fibrosis (Sirius red staining, on normal light), collagen fibers type on interstitial fibrosis evaluated by Sirius red on polarized light and αSMA staining (blue arrow) at day 90 after allotransplantation (magnification x100). Results are expressed in scatter dot plot, line as mean. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$, Statistical analysis were performed with Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Dunn's Test.

Discussion

Pre-conditioning organ from BDD to prevent IRI is a major challenge to improve organ transplantation quality. In other hands, in a porcine model, BD induces overexpression of protein Caspase-3 apoptotic marker and nitrotyrosine oxidative marker, at the end of ischemia time[4]. Moreover, it was show that an experimental slow BD induction followed by 4h of donor management, induced an increase of Creatinine and Urea, and induced kidney Bax protein overexpression, and kidney oxidative marker increase[3]. Another experimental slow BD induction followed by 4h of donor management, induced kidney HO-1 RNA overexpression, ROS kidney and serum increase and Creatinine increase[9]. In order to limit these kidney injuries and improve organ quality, BDD pharmacological pre-conditioning seems to be a judicious way. Our previous study showed that donor pre-treatment (before warm and cold ischemia) with the GC7, inhibitor of eIF5A hypuzination, prevented the porcine kidney transplantation outcome injuries, as oxidative stress, apoptosis and kidney function disorders[7].

In this present study, we used a preclinical porcine model, with a bolus intravenously GC7 treatment 5 min after a slow BD induction, followed by 4h of donor management. We showed that in this model we controlled the pharmacological effect of GC7, by observation of an inhibition of eIF5A hypuzination in the GC7 treated group versus Vehicle group. As GC7 treatment demonstrated anti-oxidative effect in previous study, herein we observed a decrease of oxidative markers induced by BD in the GC7 group versus Vehicle group at the end of donor management. Aconitase 2, a mitochondrial enzyme known to generate ROS[10,11], was significantly increase in the Vehicle group and not modified in the GC7 group. Nitrotyrosine and CellRox staining, markers of cellular oxidative stress, were increased in the Vehicle group and prevented in the GC7 group, in association with a decrease of HO-1 and SOD2 proteins (Figure S2).

Also, this anti-oxidative GC7 effect could be due to expression of proteins HO-1, activated SIRT1, NRF2 and PGC1□. It is know that ROS production, like in BD model[2,3,9], activate Sirtuin and also anti-ROS proteins PGC1□, NRF2, HO-1 SOD2[12], and alternatively stimulate PGC1□ which then activate anti-ROS proteins as SOD2, Sirtuin, UCP, NRF2[13–15]. Oxidative stress, particularly from mitochondria, causes an imbalance in mitochondrial fission-fusion, resulting in mitochondrial fragmentation, which contributes to organelle and cell dysfunction[16]. DRP1 and DRP1 pS616 are pro-

fission and MFN2 pro-fusion[17]; in association with PGC1 and Bax decrease, the DRP1/MFN2 balance in favor of MFN2 is mito-protective and correlated with a better organ recovery[18]. It is know that PGC1α activates NRF1, NRF2 and stimulate anti-oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis particularly via DRP1/MFN2 balance[15]. Indeed, it was demonstrated that PGC1α stimulates mitochondrial biogenesis and respiration in muscle cells through an induction of UCP2 and through induction of NRF1 and NRF2 gene expression[19]. In our study, NRF2, and RNA UCP2 and UCP3 expression increased after GC7 treatment, however UCP2 protein did not increase after GC7 treatment (Figure S3). As in IR, the uncoupling proteins are programmed in ways to protect mitochondria from induced oxidative stress[20], and to regulate energy metabolism[21].

In other GC7 study results suggest that functional hypusinated eIF5A is necessary for HIF-1α expression during hypoxia[22]. Herein the eIF5A hypusination inhibitor GC7 had an important effect in normoxia donor management independently of HIF-1a expression, and also did not inhibited the HIF-1a expression during kidney preservation cold storage. Thus, in our normoxic BD donor management model, GC7 seems to act like an anti-oxidative agent through a HIF independent pathway. Indeed, GC7 is aslo a spermidine analogue, which induces effect (as autophagy) through a mechanism not involving the hypusination of eIF5A[23]. It was demonstrate that the eIF5A hypusinated form is not involved in the autophagic pathway and of basal autophagy[23]. This is, in association with other study which demonstrated that Spermine/Spermidine decreased ischemia/reperfusion injury in cardiomyocytes, via apoptosis reduction, increase of cell viability and increase autophagy by mTOR pathway activation[24]. As observed in our study, mitochondrial integrity regulation could resulted in mitophagy[25], an important part of autophagy[26]. Mitophagy/Autophagy is an adaptive response to stress, which promotes survival, and in case of starvation, the breakdown of cellular components promotes cellular survival by maintaining cellular energy levels[26]. There is also a link between NRF2 and polyamine, probably via Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase (SSAT)[27]. In addition, as suggested by previous study, the Spermidine/Spermine polyamine metabolism involved in PGC1 expression and consequently mitochondrial biogenesis and energy metabolism[28]. A previous study demonstrated that mTOR controled mitochondrial gene expression and oxygen consumption/oxidative function, through a Yin-Yang 1 (YY1)-PGC1a transcriptional complex, as YY1 is a common target of mTOR and PGC1[29]. This is in correlation with the role of spermidine to PGC1 and mTOR activation[28–30].

These suggest that in our study the inhibitor of DHS, GC7 (a spermidine analogue), may produce spermidin-like off-target effects resulting in expression of mitochondrial integrity regulation markers: PGC1, NRF2, DRP1, MFN2 and mTOR expression.

Evidence have been accumulating that protection against ischemic damage could be linked to mitochondrial biogenesis[31]. It was demonstrated that mitochondrial biogenesis also upregulates a broad spectrum of ROS detoxification systems[32], providing a mechanism by which the mitochondrial biogenesis program may additionally augment tolerance to ischemia[15].

These cytoprotective pathways induced by GC7, had herein a beneficial impact on kidney function and integrity. During BD donor management GC7 treatment inhibited kidney injuries with significant reduction of blood creatinine and LDH. Consequently of cytoprotective effect observed with GC7 prior to transplantation, kidney function recovery was better after treatment, marked by decrease of creatininemia and better GFR. It is now demonstrated that the intensity of ischemia-reperfusion injury very strongly correlates with DGF, chronic graft dysfunction and late graft loss[33]. In association with this evidence, we demonstrated that kidneys treated with GC7 showed better late graft function with a significant diminution of fibrosis, a characteristic tardive injury.

Stallons et al[18], described that, following insult or stress to the kidney (like ischemia), development of acute kidney injury is defined as a loss of renal function, and characterized by a rise in serum creatininemia. At the cellular level, increased production of ROS, permeabilization of the mitochondrial outer membrane, and loss of mitochondrial metabolism and ATP production coincide with mitochondrial damage, fragmentation, and dysfunction[18]. In this case[18], over time, mitochondrial and renal function can be restored, and specific mitochondrial-targeted processes may facilitate recovery, including enhanced PGC1α/mitochondrial biogenesis signaling[34], stimulation of mTOR pathway autophagy[35,36], inhibition of DRP1/mitochondrial fission[37], increase of MFN2[38], or reduced Bax expression[39]. Persistent mitochondrial and kidney injury may result under conditions of PGC1α decrease[40], insufficient autophagy[41,42], or reduced MFN2/mitochondrial fusion[38]. Thus to restored the mitochondrial/cellular/kidney function, GC7 pharmacological preconditioning could be a judicious intervention that causes attenuation of ischemic damage.

In conclusion our data bring evidence that GC7 preconditionning treatment greatly enhanced the functional recovery of brain death donor kidney before and after transplantation. From a more general point GC7 appear to be a judicious pharmacological therapy suitable for re/pre-conditioning organ before transplantation.

Methods

GC7 synthesis

N-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7) was synthesized by AtlanChim Pharma (Saint-Herblain, France) according to the methods described previously[43]. The molecular structure and purity of the product were evaluated using NMR and mass spectrometry.

Porcine brain death model and kidney allo-transplantation

Animal experiments were conducted at the MOPICT platform (Surgères, France) in accordance with the Care and Use of Laboratory Animals and the ARRIVE guidelines, the French Government and the institutional Committee on the Ethics of Animal Experiments (France) (Committee accreditation number: C2EA-84, Protocol approval number: CE2012-14). We used 3 months old Large White male pigs (40-45kg), a pertinent preclinical model, as its anatomy and physiology are very closed to humans[8].

Premedication is performed with intramuscular infusion of midazolam (0.05mg/kg 20 min before the start of the experiment). The pigs were anaesthetised by inhalation induction with a mixture of 8% Sevoflurane and oxygen. After loss consciousness a 20 Gauge catheter was inserted on an ear vein and anesthesia was deepened by injection of propofol at 3mg/kg, fentanyl at 1µg/kg, ketamine 1mg/kg and rocuronium at 1mg/kg. The management of the respiratory tract was ensured by the insertion of endotracheal tube size 6.5 mm (Hi-Contour, Mallinckrodt Medical™, Athlone, Ireland). The pigs were ventilated with a Servo 900C™ (Siemens, Solna, Sweden) with a tidal volume of 8ml/kg, the respiratory frequency was adjusted to obtain an end tidal CO_2 between 35 and 40 mmHg, FiO_2 at 50%, and the positive expiratory pressure was 5 cmH_20.

The anaesthesia was maintained by administration of propofol at 3mg/kg/h, fentanyl 1.5µg/kg/h and rocuronium 1mg/kg iteratively adapted to the animal's behaviour. Catheters were surgically inserted in left femoral artery and external jugular vein. Hemodynamic monitoring was performed by PICCO1® Edward (Pulsion medical system, Irving, USA). A suprapubic catheter was inserted after a bladder incision with hourly diuresis measurement.

To induce brain death, a 18 Fr silicone Foley catheter (Covidiens, USA) was introduced through a right frontal drill hole 4 cm from the sagital line after a durmerian detachment into the epidural space. The balloon was then filled with saline in 5 ml steps every 10 min according to a model derived from that of Purins[44]. The diagnosis of brain death

was validated by a flat electroencephalogram and a brain perfusion pressure at 0 mmHg. We intravenously infused GC7 (3mg/kg in NaCl 0.9%) 5 min after brain death declaration (group 'GC7', n=6) or infused NaCl 0.9% without GC7 (group 'Vehicle', n=6), then donor animals were managed during 4h (Figure S1). Blood collections were performed at baseline time (before BD induction), at the time of BD declaration (BD time), and during donor management at 60 min after BD declaration (60abd), 120 min (120abd), 180 min (80abd) and 240 min (240abd). At the end of these 4h management kidneys were approached through a midline abdominal incision, vascular pedicles and the ureters were atraumatically dissected, renal pedicles were clamping and kidneys were removed, cold-flushed and preserved in static condition during 18h in University of Wisconsin solution (UW) at 4°C. The right kidney was collected for biological analysis from biopsies at the end of donor management and at the end of 18h kidney preservation in UW. The biological analyses of BD kidney were compared to control kidneys collected on healthy pigs. At the end of cold storage (CS), the left kidney was allotransplanted in a bilaterally nephrectomized recipient, littermate of the donor and compatible on SLA-1 to 3[45,46] permitting graft survival with low-grade acute rejection avoiding the use of immunosuppressive drugs and their inherent biases. Heterotopic allotransplantation was performed via the midline incision. End-to-side aorta and inferior vena cava anastomoses, just above the iliac bifurcation, were performed. Ureteroneocystostomy was performed. After kidney transplantation, pigs were placed in a metabolic cage for urine and blood collection during the first 7 days and at days 11, 14 and 90 after transplantation (Figure 1). Blood collections were performed at day -1 (1 day before transplantation), 60 min after kidney reperfusion and at day 1 (D1), D3, D5, D7, D11, D14 and D90 after kidney transplantation. Follow-up was performed for 90 days, animals were anesthetized at D90 post-transplantation and kidneys transplanted were collected for histological analysis. Two groups were studied, Vehicle and GC7 groups (n=6 in each transplanted group) (Figure S1).

Real-Time Quantitative-PCR

Total RNAs from porcine renal tissue were extracted on columns (Macherey-Nagel, France). Genomic DNA was removed and first-strand reverse transcription (Qiagen, France) was performed. Real-Time PCR assays were carried out on a RotorGene Q (Qiagen, France) following the manufacturer's recommendations. DNA primers were designed using OligoPerfect™ (Invitrogen), QuantPrim (Universität Potsdam, Max-Planck-Gesellschaft) and OligoAnalyser (Integrated DNA Technologies Inc) with the sequences detailed in supplementary Table S1. RNA expression as

"relative to expression in healthy ctl kidney" was determined with the Pfaffl method (expressed as Relative Fold Change), using β-actin, Cyclophilin-A 62 (CYA62), Succinate Dehydrogenase complex, subunit A (SDHA), Ribosomal Protein Large P0 (RPLPO) and L19 ribosomal protein gene (L19) genes as internal controls (most stable genes determined by the geNorm algorithm with Biogazelle software from Qiagen).

Western blot procedure

Western blot analyses were performed using specific antibodies against: Bcl-2 (D17C4, Cell-Signaling, France), Bax (ab115193, Abcam, France), Cleaved Caspase-9 (ABIN486706, Antibody online, France), Aconitase-2 (ab110321, Abcam, France), SIRT-1 (SC-9475, Cell-signaling, France), Phosphorylated SIRT-1 (Sc-2314, Cell-signaling, France), PGC1a (ab54481, Abcam, France), EPO (bs-2343R, Bioss, France), HO-1 (bs-2075R, Bioss, France), SOD2 (D3X8F, Cell signaling, France), HIF1a (610959, BD Biosciences, France), Nitrotyrosine (05-233, Millipore, France), NRF2 (ab31163, Abcam, France), Hypusine (ABS1064, Millipore, France), EIF5A (LS-C186978, LSBio LifeSpan Biosciences, France), DRP1 (85705, Ozyme, France), Phosphorylated-Ser616 DRP1 (4494S, Cell Signaling, France), MFN2 (TA344104, Clinisciences, France) and mTOR (2983S, Cell signaling, France) and Phospho-mTOR Ser2448 (5536P, Cell-signaling, France). Protein quantification level was expressed to ratio of total proteins loaded on *precast* gels with the stain-free technology (BioRad, France). All blots were imaging with chemidoc and quantificated with ImageLab software (BioRad).

Histological oxidative stress detection

CellROX staining (Life-Technologies, France) was realized on kidney biopsies. Green fluorescence intensity was quantified per field with 'Image J' software (National Institute of Mental Health, USA).

Soluble proteins quantification and renal function evaluation

Blood NGAL and HMGB1 were assessed in porcine serum using ELISA kit (respectively, Eurobio and Euromedex, France) according to the manufacturer's instructions. Creatinine, Sodium, LDH and AST were measured with a Modular bioanalyser (Roche-Diagnostics, France). Diuresis was evaluated by urine production after transplantation. GFR was calculated as: ((Diuresis mL/h)*Urine Creatinine)/ Blood Creatinine = GFR L/h, and converted in GFR mL/min.

Histological study

Biopsy samples from corticomedullary kidney collected at the end of donor management, at the end of cold storage and at day 90 after transplantation were fixed with 4% formalin and paraffin-embedded. Renal histological injuries, at the end of donor management and cold storage, were study on Periodic Acid Schiff (PAS) coloration. At 3 months after transplantation, evaluation of interstitial fibrosis by Sirius red staining (collagen fibers I and III staining), and birefringence visualization by polarized light to discriminate collagen fiber packing, were quantified with ImageJ software. Renal tubulitis and leukocytes infiltration were scored on histological Hematoxylin Eosin Safran (HES) staining. αSMA staining was scored by an anatomopathologist.

Statistical methods

For Figures 3A, 3C, 3E, 3G, 5B, 5D, 5G, 5J and 5L, results are expressed in mean ± SD. For other Figures results are expressed as Scatter plot with median and Interquartile range, and statistical analysis were performed with Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test, except for Figures 3, 5 and 6 for which statistical analysis were performed as Mann-Whitney test. Tests were performed with R or NCSS softwares, statistically significance was fixed at $p<0.05$.

Acknowledgements

We gratefully thank Dr Michel Pinsard (CHU de Poitiers, France), we also thank William Hebrard and Irene Launay (INRA, Unité expérimentale Génétique, expérimentations et systèmes innovants (GENESI), Plateforme MOPICT, Domaine Expérimental du Magneraud, Surgères, France), Joris Ramalingom (INSERM, Plateforme MOPICT, Surgères, France), Virginie Ameteau (Université de Poitiers, Faculté de medicine et pharmacie, INSERM U1082, Poitiers France) and Sandrine Joffrion and Maité Jacquard (CHU de Poitiers Service de Biochimie, INSERM U1082, Poitiers, France) for their technical support.

This work was supported by institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Poitiers and CHU Poitiers, and by grant from Conseil Régional Poitou-Charentes (convention 15/RPC-R-017), by grant from Fondation de l'Avenir (Recherche Medicale Appliquée, program ET3-686) and by a grant from Fondation pour la recherche médicale (FRM) (DPM 20121125559).

Disclosures

Authors declare no conflict of interest

References

1. Westendorp WH, Leuvenink HG, Ploeg RJ: Brain death induced renal injury. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 16: 151–156, 2011

2. Morariu AM, Schuurs TA, Leuvenink HGD, van Oeveren W, Rakhorst G, Ploeg RJ: Early events in kidney donation: progression of endothelial activation, oxidative stress and tubular injury after brain death. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 8: 933–941, 2008

3. Rebolledo RA, Hoeksma D, Hottenrott CMV, Bodar YJL, Ottens PJ, Wiersema-Buist J, Leuvenink HGD: Slow induction of brain death leads to decreased renal function and increased hepatic apoptosis in rats. *J. Transl. Med.* 14: 141, 2016

4. Stiegler P, Sereinigg M, Puntschart A, Bradatsch A, Seifert-Held T, Wiederstein-Grasser I, Leber B, Stadelmeyer E, Dandachi N, Zelzer S, Iberer F, Stadlbauer V: Oxidative stress and apoptosis in a pig model of brain death (BD) and living donation (LD). *J. Transl. Med.* 11: 244, 2013

5. Wolff EC, Kang KR, Kim YS, Park MH: Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. *Amino Acids* 33: 341–350, 2007

6. Lee YB, Folk JE: Branched-chain and unsaturated 1,7-diaminoheptane derivatives as deoxyhypusine synthase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 6: 253–270, 1998

7. Melis N, Rubera I, Cougnon M, Giraud S, Mograbi B, Belaid A, Pisani DF, Huber SM, Lacas-Gervais S, Fragaki K, Blondeau N, Vigne P, Frelin C, Hauet T, Duranton C, Tauc M: Targeting eIF5A Hypusination Prevents Anoxic Cell Death through Mitochondrial Silencing and Improves Kidney Transplant Outcome. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 28: 811–822, 2017

8. 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: 532127, 2011

9. Schuurs TA, Morariu AM, Ottens PJ, 't Hart NA, Popma SH, Leuvenink HGD, Ploeg RJ: Time-dependent changes in donor brain death related processes. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 6: 2903–2911, 2006

10. Addabbo F, Montagnani M, Goligorsky MS: Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertens. Dallas Tex 1979* 53: 885–892, 2009

11. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B: Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47: 143–183, 2007

12. Kanzaki H, Shinohara F, Kanako I, Yamaguchi Y, Fukaya S, Miyamoto Y, Wada S, Nakamura Y: Molecular regulatory mechanisms of osteoclastogenesis through cytoprotective enzymes. *Redox Biol.* 8: 186–191, 2016

13. Austin S, St-Pierre J: PGC1α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J. Cell Sci.* 125: 4963–4971, 2012

14. Chen S-D, Yang D-I, Lin T-K, Shaw F-Z, Liou C-W, Chuang Y-C: Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 7199–7215, 2011

15. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V: Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc. Res.* 79: 208–217, 2008

16. Wu S, Zhou F, Zhang Z, Xing D: Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins. *FEBS J.* 278: 941–954, 2011

17. Mishra P, Chan DC: Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* 212: 379–387, 2016

18. Stallons LJ, Funk JA, Schnellmann RG: Mitochondrial Homeostasis in Acute Organ Failure. *Curr. Pathobiol. Rep.* 1: 2013

19. Jornayvaz FR, Shulman GI: Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 47: 69–84, 2010

20. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Goubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D: Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26: 435–439, 2000

21. Ozcan C, Palmeri M, Horvath TL, Russell KS, Russell RR: Role of uncoupling protein 3 in ischemia-reperfusion injury, arrhythmias, and preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 304: H1192-1200, 2013

22. Tariq M, Ito A, Ishfaq M, Bradshaw E, Yoshida M: Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is essential for HIF-1α activation in hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470: 417–424, 2016

23. Oliverio S, Corazzari M, Sestito C, Piredda L, Ippolito G, Piacentini M: The spermidine analogue GC7 (N1-guanyl-1,7-diamineoheptane) induces autophagy through a mechanism not involving the hypusination of eIF5A. *Amino Acids* 46: 2767–2776, 2014

24. Duan Q, Yang W, Jiang D, Tao K, Dong A, Cheng H: Spermine ameliorates ischemia/reperfusion injury in cardiomyocytes via regulation of autophagy. *Am. J. Transl. Res.* 8: 3976–3985, 2016

25. Ding W-X, Yin X-M: Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol. Chem.* 393: 547–564, 2012

26. Zhang J: Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control. *Redox Biol.* 1: 19–23, 2013

27. Pegg AE: Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294: E995-1010, 2008

28. Pirinen E, Kuulasmaa T, Pietilä M, Heikkinen S, Tusa M, Itkonen P, Boman S, Skommer J, Virkamäki A, Hohtola E, Kettunen M, Fatrai S, Kansanen E, Koota S, Niiranen K, Parkkinen J, Levonen A-L, Ylä-Herttuala S, Hiltunen JK, Alhonen L, Smith U, Jänne J, Laakso M: Enhanced polyamine catabolism alters homeostatic control of white adipose tissue mass, energy expenditure, and glucose metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 27: 4953–4967, 2007

29. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P: mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450: 736–740, 2007

30. Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F: Polyamines in aging and disease. *Aging* 3: 716–732, 2011

31. McLeod CJ, Pagel I, Sack MN: The mitochondrial biogenesis regulatory program in cardiac adaptation to ischemia--a putative target for therapeutic intervention. *Trends Cardiovasc. Med.* 15: 118–123, 2005

32. St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, Spiegelman BM: Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 278: 26597–26603, 2003

33. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G: Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet Lond. Engl.* 364: 1814–1827, 2004

34. Yuan Y, Chen Y, Zhang P, Huang S, Zhu C, Ding G, Liu B, Yang T, Zhang A: Mitochondrial dysfunction accounts for aldosterone-induced epithelial-to-mesenchymal transition of renal proximal tubular epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 53: 30–43, 2012

35. Gunst J, Derese I, Aertgeerts A, Ververs E-J, Wauters A, Van den Berghe G, Vanhorebeek I: Insufficient autophagy contributes to mitochondrial dysfunction, organ failure, and adverse outcome in an animal model of critical illness. *Crit. Care Med.* 41: 182–194, 2013

36. Jiang M, Wei Q, Dong G, Komatsu M, Su Y, Dong Z: Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury. *Kidney Int.* 82: 1271–1283, 2012

37. Brooks C, Wei Q, Cho S-G, Dong Z: Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models. *J. Clin. Invest.* 119: 1275–1285, 2009

38. Gall JM, Wang Z, Liesa M, Molina A, Havasi A, Schwartz JH, Shirihai O, Borkan SC, Bonegio RGB: Role of mitofusin 2 in the renal stress response. *PloS One* 7: e31074, 2012

39. Wei Q, Dong G, Chen J-K, Ramesh G, Dong Z: Bax and Bak have critical roles in ischemic acute kidney injury in global and proximal tubule-specific knockout mouse models. *Kidney Int.* 84: 138–148, 2013

40. Tran M, Tam D, Bardia A, Bhasin M, Rowe GC, Kher A, Zsengeller ZK, Akhavan-Sharif MR, Khankin EV, Saintgeniez M, David S, Burstein D, Karumanchi SA, Stillman IE, Arany Z, Parikh SM: PGC-1α promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* 121: 4003–4014, 2011

41. Takahashi A, Kimura T, Takabatake Y, Namba T, Kaimori J, Kitamura H, Matsui I, Niimura F, Matsusaka T, Fujita N, Yoshimori T, Isaka Y, Rakugi H: Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury. *Am. J. Pathol.* 180: 517–525, 2012

42. Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Kaimori J, Matsui I, Namba T, Kitamura H, Niimura F, Matsusaka T, Soga T, Rakugi H, Isaka Y: Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22: 902–913, 2011

43. Jasiulionis MG, Luchessi AD, Moreira AG, Souza PPC, Suenaga APM, Correa M, Costa CAS, Curi R, Costa-Neto CM: Inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) hypusination impairs melanoma growth. *Cell Biochem. Funct.* 25: 109–114, 2007

44. Purins K, Sedigh A, Molnar C, Jansson L, Korsgren O, Lorant T, Tufveson G, Wennberg L, Wiklund L, Lewén A, Enblad P: Standardized experimental brain death model for studies of intracranial dynamics, organ preservation, and organ transplantation in the pig. *Crit. Care Med.* 39: 512–517, 2011

45. Thuillier R, Renard C, Rogel-Gaillard C, Demars J, Milan D, Forestier L, Ouldmoulene A, Goujon JM, Badet L, Hauet T: Effect of polyethylene glycol-based preservation solutions on graft injury in experimental kidney transplantation. *Br. J. Surg.* 98: 368–378, 2011

46. Perrault LP, Aubin M-C, Malo O, Thollon C, Villeneuve N, Vilaine J-P, Vanhoutte PM: Status of the endothelium-derived hyperpolarizing factor pathway in coronary arteries after heterotopic heart transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 26: 48–55, 2007

Supplementary information

Figure S1: Experimental design

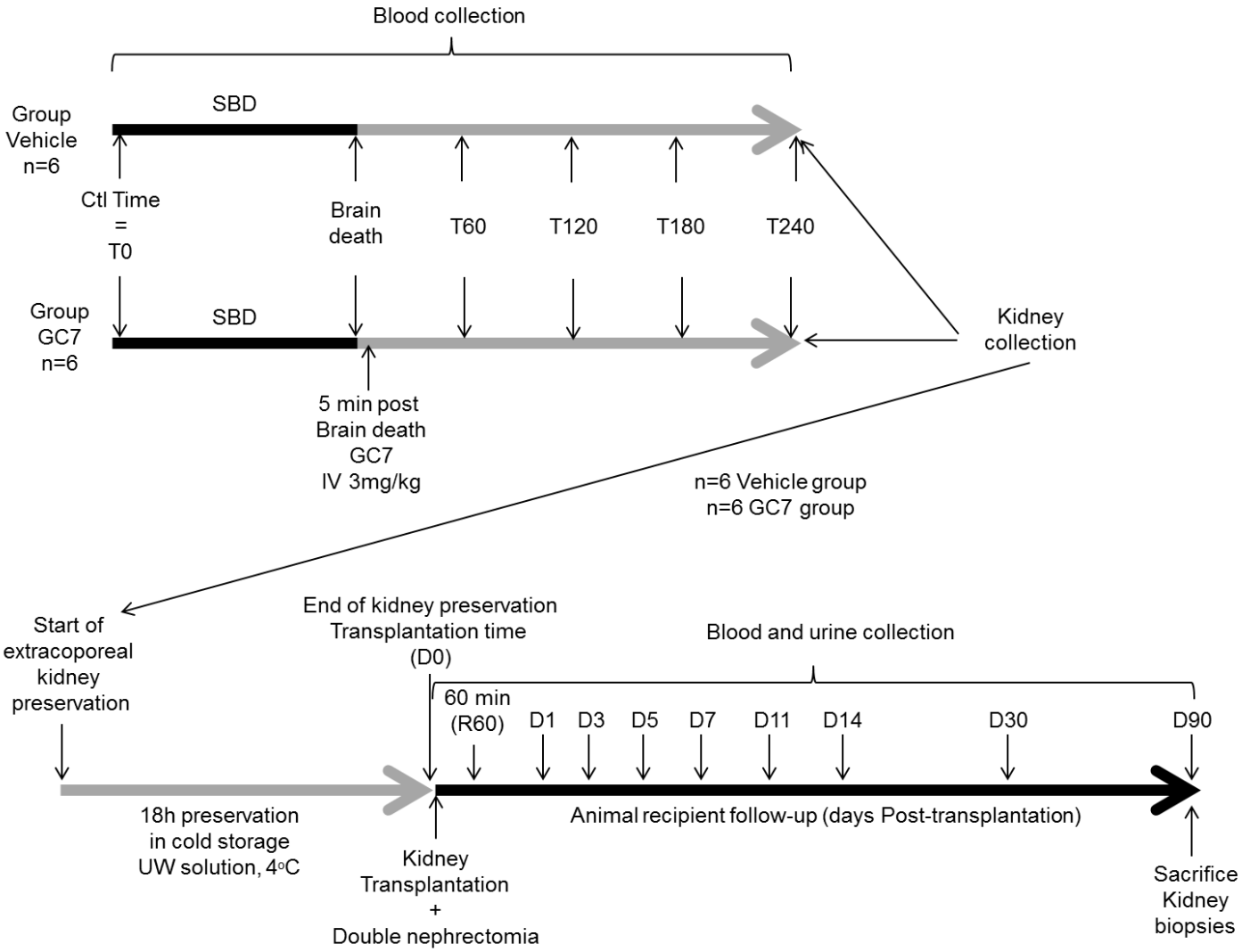

Figure S2: Markers evolution on kidney biopsy at the end of cold storage.

Protein expression level of HO-1 (A), SOD2 (B), EPO (C) detected by Western Blot, and mRNA SOD2 (D) levels at the end of cold storage 18h in UW at 4°C of kidney previously treated with GC7 (GC7-CS) or not (vehicle-CS) during brain death donor management versus Control kidney (CTL) (n= 6 per group). Results are expressed as scatter dot plot, line as mean. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Statistical analysis were performed with Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Dunn's Test.

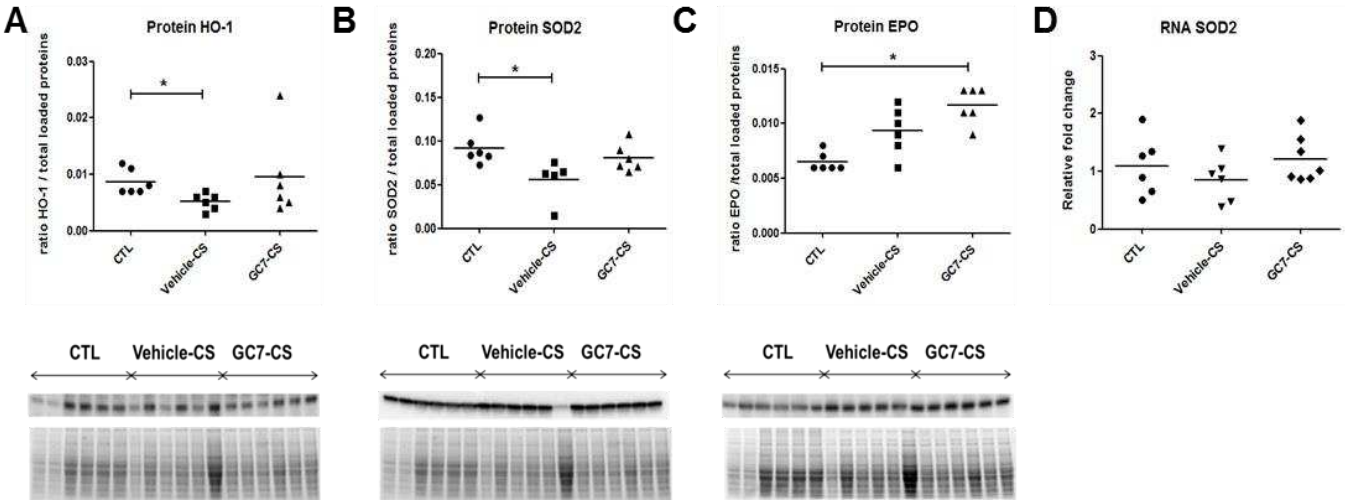

Figure S3: Markers evolution on kidney biopsy at the end of cold storage.

Protein expression level of Nitrotyrosine (A), PGC1a (B), NRF2 (orb13740, Biorbyt) (C), UCP2 (D), SIRT1 (E), phosphorylated SIRT1 / total SIRT1 (F) and SIRT3 (Sirtuine-3 (D22A3, Cell signaling) (G) detected by Western Blot at the end of cold storage 18h in UW at 4°C of kidney previously treated with GC7 (GC7-CS) or not (vehicle-CS) during brain death donor management versus Control kidney (CTL) (n= 6 per group). Results are expressed as scatter dot plot, line as mean. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Statistical analysis were performed with Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Dunn's Test.

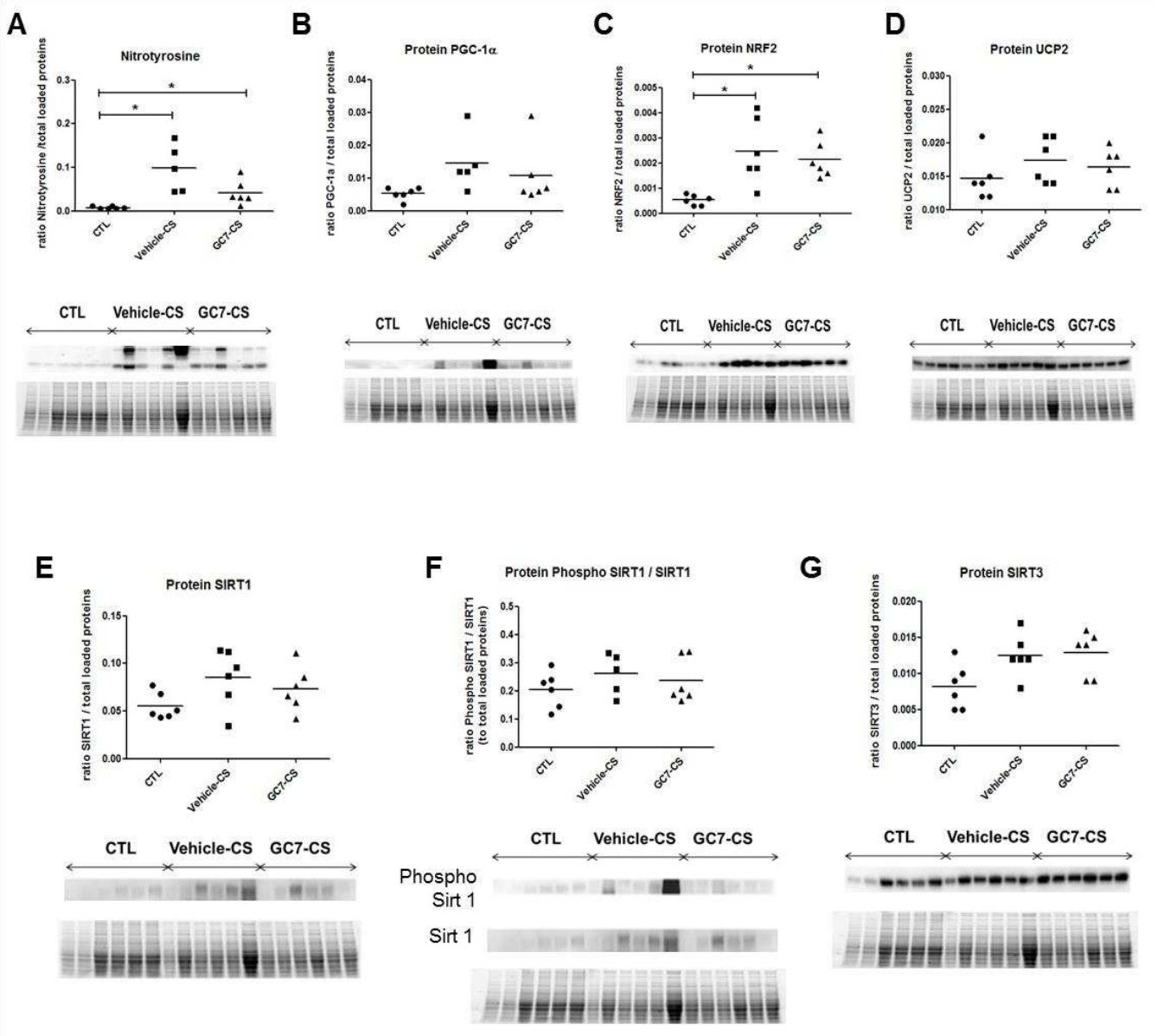

Table S1: Primers used for real-time RT-PCR in porcine renal tissue

Target	Primer Sequences
L19 (RPL19)	Forward primer 5'- AATCGCCAACGCCAACTC -3'
	Reverse primer 5'- CAGCCCATCTTTGATCAGCTT -3'
RPLPO	Forward primer 5'- AGAAACTGTTGCCTCACATCC -3'
	Reverse primer 5'- CCTTATTGGCCAGCAGCA -3'
β-Actin	Forward primer 5'- GATCGTGCGGGACATCAAG -3'
	Reverse primer 5'- GCCATCTCCTGCTCGAAGTC -3'
SDHA	Forward primer 5'- GAGTTCGTGCAGTTCCACCCTA -3'
	Reverse primer 5'- CCTCTCACCCTGGCTGTTGATA -3'
CYA62	Forward primer 5'- AAGACTGAGTGGTTGGATGG -3'
	Reverse primer 5'- AATGGTGATCTTCTTGCTGGT -3'
EPO	Forward primer 5'- TGCACAACTGTGATGCCTGGAC -3'
	Reverse primer 5'- TCCATTCTGTCCCTGCTTGGTAGG -3'
HO-1	Forward primer 5'- ACTCAGCTTTCTGGTGGCAACG -3'
	Reverse primer 5'- CACAGGGTTGCATTCACATGGC -3'
PGC1α	Forward primer 5'- GACTTTGATCCTGCTTCCACCAAG -3'
	Reverse primer 5'- TGCGCAAGCTTCTCTGGACTTC -3'
NRF2	Forward primer 5'- AAAGCTCTGCATATCCCATTCCC -3'
	Reverse primer 5'- TGCAAGCTGAGCCTCATTGAATTG -3'
SOD2	Forward primer 5'- TGAACAACCTGAACGTCGTG -3'
	Reverse primer 5'- AGGCTGCAGAGCTACCTGAG -3'
UCP2	Forward primer 5'- ACCCAATGTCGCTCGTAATGCC -3'
	Reverse primer 5'- TCAGGAGCGTGTCCTTGATGAG -3'
UCP3	Forward primer 5'- TACTTGCCGCCGACTCGGAAATAG -3'
	Reverse primer 5'- ACACGAACGTGTCCTGAAGGTG -3'

Abbreviations: L19 ribosomal protein gene (RPL19), Ribosomal protein large P0 (RPLPO), Succinate dehydrogenase complex, subunit A (SDHA), Cyclophilin A 62 (CyA62), Erythropoietin (EPO), Heme Oxygenase-1 (HO-1), Peroxisome proliferator-activated receptor-Gamma Coactivator-1α (PGC1α), Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2), SuperOxyde Dismutase-2 (SOD2), mitochondrial uncoupling protein (UCP).

Synthèse :

Face aux modifications du profil des DME avec l'augmentation notable de la part des donneurs à critères élargis, les stratégies permettant de limiter les reins prélevés non greffés pour cause de mauvaise qualité du greffon et les non reprises ou reprises retardées de fonction primaire sont essentielles. En plus d'une réanimation hémodynamique précise (gestion de la volémie, opothérapie substitutive en glucocorticoïdes, limitation des amines vasopressives), l'utilisation de molécules modulant certains phénomènes physiopathologiques responsables des lésions et par conséquence d'altération de la fonction du greffon semble intéressante : c'est le concept de préconditionnement.

Nous avons choisi de cibler le phénomène du stress oxydatif en utilisant dans un modèle porcin de DME une molécule inhibitrice de l'hypuzination eIF5A, GC7 (analogue de la spermidine) administrée 5 minutes après le passage en mort encéphalique. En effet, un travail collaboratif précédant a montré que le prétraitement des donneurs (avant l'ischémie chaude et froide) avec le GC7 prévenait les lésions liées à la transplantation rénale porcine, comme le stress oxydatif, l'apoptose et les troubles fonctionnels rénaux.

Nous avons donc évalué ce pré conditionnement dans un modèle de DME avec une induction progressive de la mort encéphalique au vu des données existantes sur l'impact de la cinétique du passage en mort encéphalique et sur la base de nos propres travaux sur modèle porcin. La mort encéphalique induit un stress oxydatif et celui-ci est responsable des lésions des futurs greffons rénaux avec un impact sur leurs reprises de fonction primaire.

Notre travail montre que les greffons pré conditionnés pendant la réanimation du DME présentaient, une fois greffés, une meilleure reprise de fonction primaire (normalisation plus rapide de la créatinémie et meilleur débit de filtration glomérulaire) et des lésions tissulaires moindres (concentration en LDH moindre chez les receveurs de reins

préconditionnés). GC7 a réduit les lésions rénales en agissant sur plusieurs voies cytoprotectrices : diminution du stress oxydatif (diminution des marqueurs tissulaires : aconitase, nitrotyrosine, CellRox) et amélioration de la réponse à ce stress oxydatif (expression plus importante de SOD et HO-1 *via* la voie des sirtuines) et modulation de la balance survie/apoptose via PG1-α et mTOR.

L'autre bénéfice de ce préconditionnement est une amélioration de la fonction du greffon a 3 mois avec moins de lésions de fibrose par rapport au groupe non traité.

Ces résultats intéressants sont à confirmer expérimentalement et la proximité de notre modèle porcin avec l'homme pourrait permettre une transposition rapide en clinique.

2) Article 4:

Tillet S, Giraud S, Kerforne T, Saint-Yves T, Joffrion S, Goujon J-M, et al. Inhibition of coagulation proteases Xa and IIa decreases ischemia-reperfusion injuries in a preclinical renal transplantation model. Transl Res. 2016 Dec;178:95-106.

Rappel des objectifs et hypothèses:

L'ischémie/reperfusion entraîne une activation de la coagulation. Les donneurs décédés après arrêt circulatoire subissent de par leur nature une phase importante d'ischémie chaude suivie de l'ischémie froide inhérente à la conservation. La coagulation va générer une activation endothéliale, des lésions tissulaires et une activation de l'inflammation notamment par l'intermédiaire des récepteurs PARs. Les PARs sont activés par clivage de leur partie N-terminale par la thrombine ou le facteur Xa selon le PARs.

L'hypothèse de ce travail est qu'une inhibition de la thrombine et du facteur Xa permettrait de réduire significativement les lésions d'ischémie/reperfusion pendant une phase d'ischémie chaude prolongée (> 60 min) et durant la conservation statique. Pour tester cette hypothèse nous avons évalué l'effet d'un inhibiteur de synthèse l'EP609 permettant à la fois une inhibition de la thrombine et une inhibition du facteur Xa.

Pour évaluer l'EP609 nous l'avons testé sur un modèle *in vitro* de cellules épithéliales rénales mises en condition d'hypoxie et d'hypothermie mimant la conservation statique en UW puis soumise à une phase de réchauffement avec ré-oxygénation mimant la reperfusion. Puis nous l'avons évalué *in vivo* dans un modèle porcin d'autogreffe de rein mimant une situation de donneur décédé après arrêt circulatoire.

Publication

Synthèse

La molécule EP609 anti-Xa/anti-IIa que nous avons évaluée *in vitro* et *in vivo* dans des conditions mimant respectivement une conservation statique à 4°C suivi d'une reperfusion et un modèle de DDAC, semblerait limiter les lésions d'I/R ainsi générées.

Cet anti-Xa/IIa était comparé à l'héparine non fractionnée qui est la molécule anticoagulante usuellement utilisée en clinique humaine. L'originalité de la molécule EP609 réside dans sa capacité à inhiber à la fois la thrombine et le facteur Xa.

In vivo, des cellules rénales soumises à une séquence d'ischémie froide (imitée expérimentalement par l'incubation en hypoxie dans de l'UW à 4°C pendant 24 heures) suivie d'une phase de reperfusion (imitée expérimentalement par réoxygénation à 37°C dans 20% d'O_2 avec mise en contact d'un plasma calibré) modélisent de manière satisfaisante l'activation de la coagulation secondaire à l'I/R. Ainsi nous avons observé une augmentation de l'expression cellulaire de facteur tissulaire ainsi que de phosphatidylsérine, conditions « pro-coagulantes » permettant une activation des sérines protéases de la cascade de la coagulation aboutissant à la formation de thrombine. Effectivement la mise en contact avec du plasma à 37°C en normoxie a permis de mesurer une génération de thrombine. L'ajout de notre inhibiteur de thrombine et de facteur Xa pendant la phase « d'ischémie froide » a permis d'inhiber la génération de thrombine pendant la phase de « reperfusion ». Cette inhibition a eu pour effet de diminuer significativement l'expression des ARNm de protéines pro inflammatoires (TNF-α, VCAM-1 et ICAM-1) par la non activation des PARs. Ces résultats suggèrent un effet bénéfique de l'utilisation de l'EP609 comme adjuvant aux solutions de conservation en condition statique.

Le modèle préclinique simplifié de DDAC que nous avons utilisé a permis de reproduire *in vivo* les résultats obtenus *in vitro* dans notre modèle cellulaire d'ischémie/reperfusion. La

conservation statique dans une solution UW supplémentée avec l'inhibiteur anti-IIa et anti-Xa, de reins soumis au préalable à une ischémie chaude prolongée, a permis d'obtenir de meilleures reprises de fonction primaire. A 3 mois, les lésions rénales chroniques de fibrose étaient aussi diminuées par rapport au groupe conservé avec de l'héparine non fractionnée.

La validation de notre hypothèse de réduction de lésions aiguës et chroniques d'ischémie/reperfusion par l'inhibition de la voie liant la coagulation à l'inflammation est validée dans notre modèle *in vivo*. La diminution des complexes thrombine-antithrombine dans le groupe traité par rapport au contrôle valide l'effet attendu sur la génération de thrombine. Il est à noter que même si l'effet est moindre, il existe avec de l'héparine non-fractionnée. Cette inhibition entraîne une diminution de l'expression tissulaire des ARNm et des principales protéines pro-inflammatoires et chimio-attractantes (TGF-β, IL-1β, Il-8, MCP-1, PAI-1, iNOS). La conséquence est une diminution significative de l'infiltrat leucocytaire post-transplantation.

Ces travaux *in vitro* et *in vivo* sur l'effet protecteur d'un anticoagulant innovant à l'activité anti-IIA et anti-Xa, valident expérimentalement l'intérêt de moduler la voie de la coagulation-inflammation pendant la conservation. Il serait intéressant de tester ce type de molécule encore plus en amont chez le donneur lui-même, mais la procédure de prélèvement multi-organes nécessiterait des molécules avec un profil de sécurité supérieur, compatible avec le risque hémorragique sous tendant ce type de procédure.

Discussion

La pénurie de greffons rénaux est une problématique persistante malgré l'élargissement du pool de donneurs de par le recours aux donneurs vivants, aux donneurs décédé après mort encéphalique à critères élargis et les donneurs décédés après arrêt circulatoire. Cette situation s'explique par la progression de la maladie rénale chronique, l'extension des indications de greffe rénale et la perte de greffons, non transplantés car de mauvaise qualité ou transplantés mais présentant une non reprise de fonction primaire. La problématique de la qualité des greffons rénaux est de manière évidente liée au terrain du donneur (DME à critère élargis) ou à sa nature (DDAC). L'optimisation de la prise en charge des donneurs pendant la phase de réanimation pourrait être une piste d'amélioration de la qualité des greffons rénaux.

Cette optimisation passe d'abord par la connaissance des phénomènes physiopathologiques en jeu chez le donneur selon sa nature (DME ou DDAC). Actuellement, les connaissances sont assez différentes en fonction du type de donneur et notamment en termes de modélisation.

La littérature sur le DME est assez fournie mais il existe quantité de données disparates, parfois contradictoires avec une transposition chez l'homme infructueuse. L'origine de cette constatation réside peut-être dans le choix des modèles utilisés avec une grande majorité de modèles murins et des inductions rapides de la mort encéphalique, ce qui correspond assez peu à ce qui se passe en clinique.

La littérature sur le DDAC est beaucoup plus pauvre avec assez peu de modélisation et de données fondamentales. Les greffons issus de ces donneurs sont fragiles et selon les prises en charge sont source d'échec de la greffe de par de mauvaises reprises de fonction.

Dans la prise en charge des donneurs décédés après arrêt circulatoire de la catégorie II de Maastricht, *i.e.* non contrôlés, il n'existe pas de consensus nationaux ou internationaux

notamment quant à l'utilisation d'une circulation régionale normothermique. Pourtant les résultats de DDAC bénéficiant d'une CRN sont bien meilleurs dans les séries proposées que ceux des DDAC sans CRN. Physiopathologiquement, il manque des données d'une part pour expliquer les origines mécanistiques de ce « reconditionnement », et d'autre part pour déterminer quelle durée de reconditionnement par CRN est optimale vu la disparité des pratiques internationales.

Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait de mettre en évidence des voies d'amélioration de ce reconditionnement et de diminuer encore la part de greffons non transplantés ou déficients.

Le premier objectif de ce travail de thèse était de mettre au point des modèles porcins de DME et de DDAC reconditionner par CRN avec 2 questions :

- La cinétique de passage en mort encéphalique impacte-t-elle sur les greffons rénaux et si oui comment ;
- Comment la CRN reconditionne les greffons rénaux et quelle en serait la durée optimale sans intervention.

La deuxième partie de notre travail a consisté en s'appuyant sur les données physiopathologiques issues des travaux de la première partie à évaluer l'effet :

- D'une molécule modulant les effets du stress oxydatif chez un modèle porcin de DME,
- D'une molécule anticoagulante (anti-Xa et anti-IIa) dans un modèle cellulaire et de DDAC simplifié en adjuvant dans la solution de conservation.

III. Le donneur décédé après mort encéphalique : modélisation, physiopathologie et préconditionnement innovant.

1. Modélisation et description physiopathologique

La littérature scientifique fait état de données cliniques et précliniques contradictoires avec des différences importantes entre les données obtenues chez l'homme et chez les modèles animaux. Cette différence peut s'expliquer par les limites du choix des modèles utilisés : utilisation de modèles murins et une cinétique de passage en ME très rapide voir instantanée (Barklin, 2009).

Références	Type de ME	Mesures	Résultats ME vs contrôle
(Takada et al., 1998)	Brutale	19 molécules inflammatoires (RT-PCR)	↑
(Pratschke et al., 2000)	Brutale	16 molécules inflammatoires (Immuno-histochimie, RT-PCR)	Histologie et immuno-histochimie :NS TNFα, IL-1β, ICAM-1 : ↑
(Kusaka et al., 2000)	Brutale	16 molécules inflammatoires (Immuno-histochimie, RT-PCR)	Histologie et immuno-histochimie :NS IL-1β, P-selectine, E-selectine : ↑
(Gasser et al., 2002)	Brutale	13 cytokines	Histologie et immuno-histochimie :NS Cytokines sauf IL-1β : ↑
(van der Hoeven et al., 2003)	Brutale	ICAM-1, VCAM-1,marquage : CD45, TrC, CD4, MHCII	ICAM-1, VCAM-1 & infiltrat leucocytaire : ↑
(Schuurs et al., 2004)	Brutale	b-actin, E-selectin, ICAM-1, MCP-1, HO-1, HSP70, KIM-1	↑
(Schuurs et al., 2006)	Progressive	b-actin, E-selectin, ICAM-1, MCP-1, HO-1, HSP70, KIM-1, NFκB	↑ (A partir de 30 min post BD max à 4h)
(Morariu et al., 2008)	Brutale	E- and P-selectin, H2O2, Lésions tubulaire	↑ (A partir de 30 min post BD max à 4h)
(Schaub et al., 2004)	Brutale	ED1, MHCII, P-selectin, HO-1, Hsp-70, TNF-a, MCP-1	↑
(Hoeger et al., 2007)	Brutale	HO-1 , cellules mononuclées	↑ + /- HO1 selon hémodynamique

Tableau 8. Etudes sur modèle murin de DME évaluant l'impact de la mort encéphalique sur l'inflammation (↑ augmentation, NS : non significatif).

Références	Type de ME	Mesures	Résultats ME vs contrôle
(Barklin et al., 2008)	Progressive	TNFα, IL-6, IL-10	NS
(Skrabal et al., 2005)	Brutale	TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-6R, ICAM-1, MCP-1, TGFβ	TNF-α, IL-6R, ICAM-1, MCP-1, TGFβ : NS IL-1β, IL-6 : ↑
(Mangino et al., 2003)	(Chien) Brutale	MPO, TXB2, PGE2, LTC4	NS
(Hvas et al., 2014)	Brutale	COX-1, COX-2, HO-1, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α.	HO-1, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α: NS COX-1, COX-2 : ↑

Tableau 9. Etudes sur modèle de gros animal de DME évaluant l'impact de la mort encéphalique sur l'inflammation (↑ augmentation, NS : non significatif).

Références	Effectifs	Mesures	Résultats ME vs DV
(Koo et al., 1999)	65 ME 29 DV	IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-15, IFN-ϒ, IL-10	IL-10, IFNϒ & TNF-α: ↑
(Nijboer et al., 2004)	27 ME 34 DV	CD45, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin., HO-1, Hsp70, IL-1β , IL-6, IL-8, iNOS, MCP-1, TGF-β	E-selectin, leucocytes, HO-1 and Hsp70 : ↑
(Kim et al., 2000)	9 ME 19 DV 17 Rejet aigus	IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-15, IFN-g, IL-10	IL-10,IFN-g TNF-α : ↑
(Schwarz et al., 2001)	52 ME 20 DV	ICAM-1, VCAM-1 & E-selectin	ICAM-1 & VCAM-1 : ↑
(Kaminska et al., 2007)	12 ME 25 DV 1 Rejet aigu	IFN-ϒ, TGF-β, PDGF-B, IL-2, IL-6, IL-10	IL-2, IL-6 & IL-10 : ↑
(Araki et al., 2006)	19 ME 20 DV	IL-8, IP-10, MCP1, Rantes	IL-8 :↑

Tableau 10. Etudes cliniques évaluant l'impact de la mort encéphalique sur l'inflammation (↑ augmentation, NS : non significatif).

Le modèle murin dans le contexte de la transplantation rénale est très imparfait alors que le modèle porcin est plus satisfaisant anatomiquement et physiologiquement (Giraud et al., 2011). De plus, une autre limite des études précliniques chez le rongeur est la cinétique de passage en ME qui ne correspond pas aux situations cliniques habituelles où les patients mettent plusieurs heures à passer en ME après la survenue de la lésion cérébrale initiale. Cependant, une étude récente sur un modèle murin a comparé l'impact de la cinétique du

passage en ME. Les résultats sont intéressants avec un effet péjoratif de la durée d'induction de la mort cérébrale sur des paramètres biologiques de lésions rénales (Rebolledo et al., 2016). Mais cette étude n'évaluait pas la reprise de fonction des greffons rénaux. Dans ce travail, les auteurs avait mis en évidence une surexpression de gènes codant pour TNF-α et IL-6 dans le groupe à induction « lente » de la ME par rapport au groupe à induction « rapide ». Le même résultat était obtenu sur les mesures des concentrations plasmatiques d'IL-6. Concernant la concentration plasmatique de créatinine, là aussi les valeurs per-réanimation des animaux du groupe à induction lente étaient significativement plus élevées que celles des animaux du groupe à induction rapide. Le seul paramètre hémodynamique renseigné dans cette étude était la pression artérielle moyenne (PAM). Les valeurs moyennes de PAM n'étaient pas significativement différentes entre les 2 groupes.

Ici, dans notre étude préclinique sur un modèle porcin de ME nous avons obtenu des résultats similaires avec un impact péjoratif du passage lent en mort cérébrale sur la reprise de fonction des greffons rénaux. L'originalité de notre travail repose sur l'utilisation d'un modèle porcin de ME, sur la greffe des reins issus de ces donneurs et sur un suivi jusqu'à 3 mois, ce qui permet de compléter les données de reprises de fonction initiales par les données sur les lésions chroniques.

Nos résultats montrent que la reprise de fonction primaire des greffons est nettement moins bonne chez les porcs greffés avec les reins provenant du groupe "lent" que celle des porcs greffés avec les reins provenant du groupe "rapide", ces derniers présentant une créatinémie plasmatique post-greffe bien supérieure la première semaine. Cette différence se retrouve également sur les cinétiques de LDH post-greffe jusqu'à J14.

Les paramètres des donneurs en ME pouvant influencer la reprise de fonction primaire sont, en clinique humaine, les états pathologiques préexistants avec l'âge, les facteurs de comorbidités cardiovasculaires (les donneurs dit à critère élargis) (Troppmann et al., 1995),

l'instabilité hémodynamique du donneur (Giral et al., 2007; O'Brien et al., 1996; Salim et al., 2006; Schnuelle et al., 2001) et la durée d'ischémie froide. Dans le contexte contrôlé de notre étude préclinique les porcs avaient le même âge (14 semaines), étaient dénués de tout état pathologique détectable préexistant à l'expérimentation, ils bénéficiaient des mêmes durées de réanimation et les greffons subissaient la même durée d'ischémie froide en conservation statique. Seule l'hémodynamique lors du passage en ME était initialement plus instable dans le groupe brutale mais les variations subies étaient statistiquement identiques.

La qualité de la réanimation hémodynamique post-ME était identique dans les 2 groupes d'animaux. Les résultats étaient semblables sur les déterminants du transport en oxygène (le débit cardiaque, la saturation en oxygène de l'hémoglobine artérielle et la pression partielle en oxygène). De plus, les lactates sanguins prélevés en artériel dans les 2 groupes suivait la même cinétique de croissance au moment de la mort encéphalique et après 60 minutes de réanimation ce qui traduit une adéquation entre les apports et les besoins en oxygène dans les 2 groupes d'animaux. Une différence de transport en oxygène au cours de la réanimation ne peut donc pas expliquer la différence observée entre les reprises de fonction des 2 groupes. Néanmoins, nous avons observé une augmentation progressive de la concentration plasmatique en LDH dans le groupe progressif qui ne s'explique que par la cinétique du passage en ME, le reste étant expérimentalement identique. Ce marqueur de lésion cellulaire était associé à une tendance à l'augmentation des ASAT qui peuvent être un marqueur de lésion tubulaire rénale (Jochmans et al., 2011) et une dégradation de la fonction rénale avec, malgré une hémodynamique satisfaisante, une augmentation de la créatinine plasmatique. La durée de réanimation choisie a été de 4h en se basant sur le fait que ce délai permettait de stabiliser un état hémodynamique dans 100% des procédures et que cette durée était celle qui présentait un maximum d'expression tissulaire des marqueurs inflammatoires (Schuurs et al., 2006).

Nous avions choisi d'explorer la piste du stress oxydant et la réponse à ce stress. Ce choix se justifiait d'une part car le stress oxydant est associé à la survenue de nombreuses maladies rénales chroniques et à leur aggravation (Tabriziani et al., 2018), et d'autre part car les données issus des travaux de Stiegler et al., mettaient en évidence une activation du stress oxydatif dans les suites du passage en ME (Stiegler et al., 2013). Dans le travail de Stiegler et al., la nitrotyrosine rénale, en immunohistochimie, était augmentée après ME. De plus, le stress oxydant chez le donneur favoriserait les reprises retardées de fonction (Dutkiewicz et al., 2009).

Dans l'étude de Stiegler et al., certains paramètres de réponse au stress oxydatif : la superoxide dismutase 2, la gluthatione synthétase, la peroxisome proliferators-activated receptor alpha, l'oxydative stress responsive 1 et la gluthatione peroxidase 3, ont été analysés, mais uniquement les ARNm de ces marqueurs. Les auteurs n'ont pas retrouvé d'augmentation de l'expression de ces gènes dans les reins de donneurs en mort encéphalique, probablement du fait que la réponse au stress oxydant dans un temps court de réanimation est principalement induite par l'activation des protéines anti-oxydantes. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à 3 marqueurs reflétant l'intensité du stress oxydant au niveau du tissu rénal : 4HNE, l'aconitase et la nitrotyrosine. Pour évaluer la réponse au stress oxydant, nous avons analysé l'expression des protéines anti-oxydantes par Western blot (Sirtuines, PGC1α et NRF2), plus informatives que l'ARNm.

Nos résultats ont mis en évidence que la cinétique d'induction de la mort encéphalique n'influence pas ou peu l'intensité du stress oxydant : les niveaux de 4HNE, de nitrotyrosine et d'aconitase étant surexprimés de la même manière dans les 2 groupes BD. Cependant, la cinétique d'induction de la mort encéphalique semble influencer la réponse au stress oxydant médiée par les Sirtuine 1 et 3 et PG1alpha. Néanmoins, NRF2 est surexprimé de la même manière entre les 2 groupes. Ensuite, nous avons évalué l'expression de mTOR phosphorylé

sur mTOR total. mTOR est un acteur incontournable de nombreux mécanismes cellulaires et notamment de régulation énergétique au sein des cellules tubulaires rénales et dans la génération de fibrose secondaire à une agression induisant ainsi une perte de fonction tardive des greffons (Fantus et al., 2016). Dans les reins explantés du groupe RgBD, l'activation de la protéine de mTOR est significativement diminuée. Une modulation de mTOR par les ROS générés lors du stress oxydatif est appuyée par des données scientifiques mais cette modulation peut aller dans le sens d'une up-regulation via l'AMPK (Chen et al., 2011a), ou dans le sens d'une down-régulation via FoxO3 (Yalcin et al., 2010). D'autre part, certaines publications récentes ont mis en évidence une régulation directe de mTOR par NRF2 (Bendavit et al., 2016) ou une double down-régulation entre mTOR et NRF2 (Kapuy et al., 2018).

Notre hypothèse était que la différence observée sur les reprises de fonction primaire de greffons rénaux en fonction de la cinétique de passage en ME était liée, non pas à une différence d'intensité du stress oxydant mais à une modulation de l'intensité de la réponse anti-oxydante conduisant à une modulation de mTOR via NRF2. Cette différence d'adaptation secondaire à une agression correspond au phénomène d'allostasie, *i.e.* l'adaptation d'un système à de nouvelles conditions environnementales. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un mécanisme d'allostasie chez le donneur est décrit. Cette différence d'adaptation allostatique pourrait trouver son origine dans les phénomènes protecteurs initiés par le shear stress. En effet il a été démontré que le shear stress a un effet protecteur notamment par le biais de l'activation de eNOS (Chatauret et al., 2014), et cet effet ferait intervenir SIRT-1 (Chen et al., 2010; Liu et al., 2015). Or, nous avons mis en évidence une expression plus importante du ratio eNOS phosphorylé/eNOS total dans le groupe à induction rapide (RgBD) de la mort encéphalique. Même si nous ne retrouvons pas de différence significative sur les paramètres hémodynamiques post-ME, les phénomènes

hémodynamiques secondaires à la mort encéphalique étaient plus condensés dans le groupe à induction rapide RgBD (5 minutes) que dans le groupe lent SgBD (90 minutes). Nous pouvons émettre l'hypothèse que les cellules rénales étaient alors soumises à un shear stress plus intense avec une activation de SIRT-1 plus importante pouvant expliquer nos résultats.

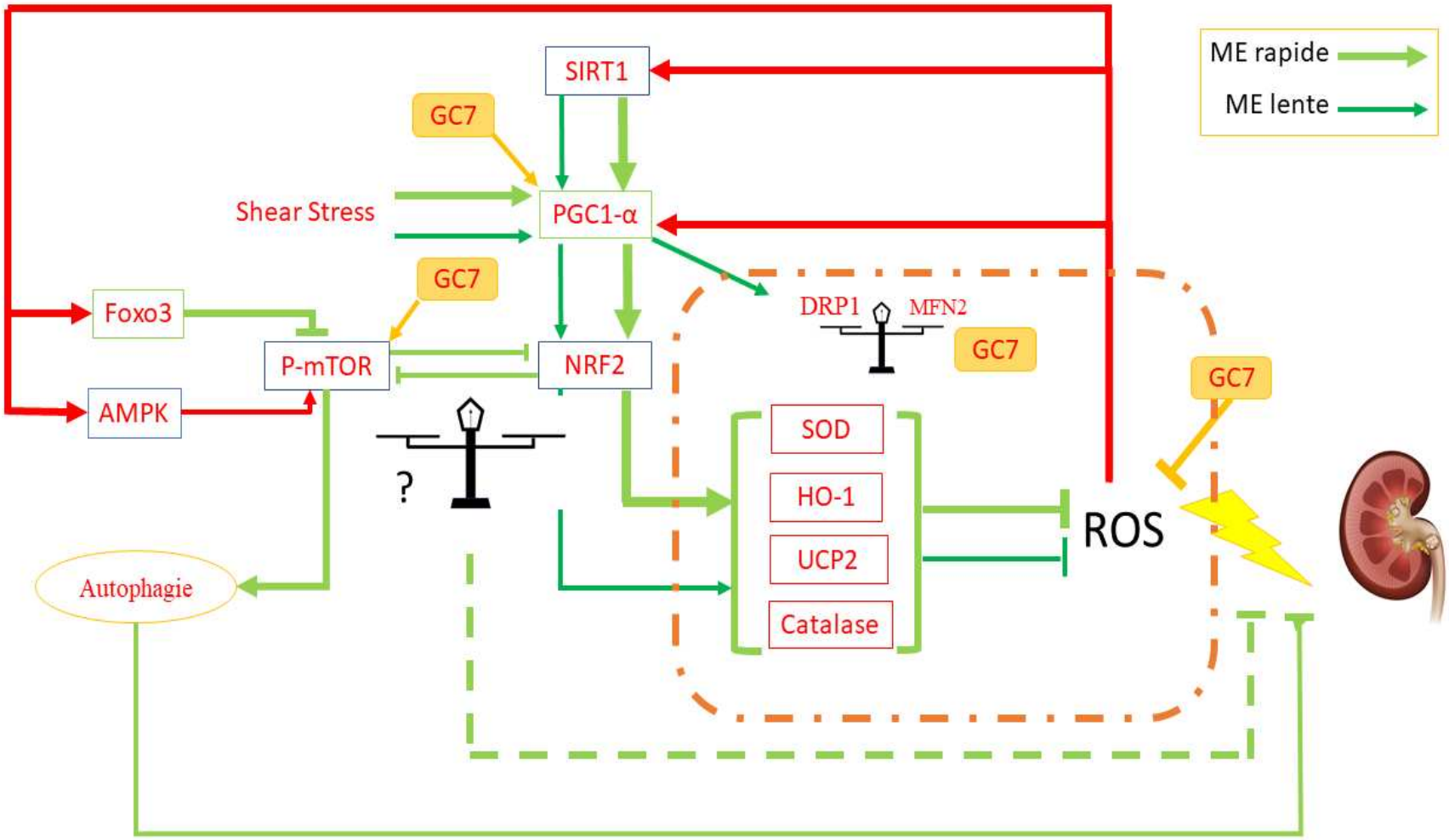

Figure 10. Schéma de synthèse

Le potentiel intérêt de ce travail réside dans le fait qu'il pourrait expliquer, en plus de l'utilisation imparfaite de modèles murins, la divergence des résultats décrits dans la littérature. En effet, souvent l'analyse se base sur l'évaluation d'une intensité d'agression et non pas sur l'intensité de la réponse des systèmes de régulation/réponse à cette même agression.

Ce travail présente des limites : l'extrapolation de ces résultats d'une part chez l'homme et d'autre part sur des reins de donneurs présentant des lésions préexistantes, mTOR étant régulés différemment lors de diverses pathologies rénales (Fantus et al., 2016). De plus, même si ces résultats ont une certaine validité externe car confirmant ceux de Schuur et al., d'autres expérimentations sont nécessaires.

2. Innovation thérapeutique

Parmi les multiples approches visant à améliorer la qualité des greffons nous avons positionné ce travail de thèse dans l'initiation de thérapeutique dès la période de réanimation du donneur. Les résultats obtenus précédemment dans notre modèle porcin de DME ont mis en évidence l'importance du stress oxydant et de la réponse cellulaire à cette agression. Ces données sont confirmées par d'autres études expérimentales (Morariu et al., 2008; Stiegler et al., 2013). Notre choix entre les cibles thérapeutiques possibles (la génération de EROs, NRF2, mTOR) s'est porté sur la génération du stress oxydatif, notre laboratoire ayant collaboré sur un travail évaluant dans plusieurs modèles d'ischémie/reperfusion, l'action d'une molécule analogue de la spermidine avec des résultats intéressants (Melis et al., 2017). Dans notre modèle de DME à induction lente, le préconditionnement par cet analogue de la spermidine par injection intraveineuse directe juste après la validation de la mort a donné les résultats escomptés.

Les animaux traités par GC7 avaient une meilleure reprise de fonction primaire et tardive avec moins de lésion de fibrose.

Nous nous nous situons dans un modèle en normoxie contrairement au modèle d'ischémie/ reperfusion dans lesquels la molécule avait été évaluée. L'effet recherché visait la limitation de la genèse de EROs.

Tout d'abord nous avons bien mis en évidence une inhibition de l'hypuzination eIF5A dans le groupe traité par GC7 par rapport au groupe contrôle.

Cette inhibition a permis une diminution de l'intensité du stress oxydant comme en témoigne la diminution de l'aconitase (une enzyme mitochondriale responsable de la génération d'EROs), de nitrotyrosine et du marquage CellRox dans le tissu rénal des reins issus des animaux traités.

En plus de diminuer l'intensité du stress oxydatif, GC7 pourrait augmenter l'intensité de la réponse au stress oxydatif.

On sait que la production de EROs, comme dans notre modèle de DME (Morariu et al., 2008; Rebolledo et al., 2016; Schuurs et al., 2006), active SIRT1 qui elle-même va activer les protéines anti-EROs PGC1-α, NRF2, HO-1 SOD2. PGC1-α est également stimulée directement par le stress oxydant et active ensuite les protéines anti-ROS comme SIRT1 et 3, UCP, NRF2 (Austin and St-Pierre, 2012; Chen et al., 2011b; Kanzaki et al., 2016) et SOD2. Le stress oxydatif, particulièrement celui causé par les mitochondries, génère un déséquilibre dans la fission-fusion mitochondriale, entraînant une fragmentation mitochondriale qui contribue au dysfonctionnement des organites et des cellules (Wu et al., 2011). DRP1 et DRP1 pS616 sont pro-fission et MFN2, pro-fusion (Mishra and Chan, 2016). La balance DRP1/MFN2, lorsqu'elle est en faveur de MFN2, est protectrice de la mitochondrie et est corrélée à une meilleure récupération des organes (Stallons et al., 2013) . PGC1α active NRF2 et stimule le métabolisme anti-oxydant et la biogénèse mitochondriale, notamment *via* la balance DRP1/MFN2 (Stallons et al., 2013). De plus, il a été démontré que PGC1α induit

l’expression d’UCP2 qui participe aussi à la biogénèse et à la respiration mitochondriale dans les cellules musculaires (Jornayvaz and Shulman, 2010). Dans notre étude, l'expression des NRF2, et des ARN UCP2 et UCP3 a augmenté après le traitement par GC7 (mais pas la protéine). Notre hypothèse est que notre analogue de la spermidine entraîne une expression plus importante de PGC1-α. En effet, le métabolisme des polyamines spermidine/spermine jouerait un rôle dans l'expression de PGC1-α et par conséquent dans la biogénèse mitochondriale et le métabolisme énergétique (Pirinen et al., 2007).

Une de nos autres hypothèses est un effet de GC7 sur la stimulation de l’autophagie par mTOR.

En effet, certaines études ont démontré que le couple spermine/spermidine diminue les lésions d'ischémie/reperfusion dans les cardiomyocytes, par réduction de l'apoptose, augmentation de la viabilité cellulaire et augmentation de l'autophagie par activation des voies de mTOR (Duan et al., 2016).

Une étude précédente a démontré que mTOR contrôlait l'expression des gènes mitochondriaux et la consommation d'oxygène/fonction oxydative, à travers un complexe transcriptionnel Yin-Yang 1 (YY1)-PGC1a, car YY1 est une cible commune du mTOR et du PGC1-α (Cunningham et al., 2007). Ceci corroborerait l’hypothèse du rôle de la spermidine dans l'activation de PGC1-α et de mTOR (Duan et al., 2016). Celles-ci suggèrent que, dans notre étude, GC7 (un analogue de la spermidine), pourrait produire des effets hors cible semblables à ceux de la spermidine, entraînant l'expression de marqueurs de régulation de l'intégrité mitochondriale : expression PGC1-α, NRF2, DRP1, MFN2 et mTOR.

Ainsi, GC7 permet une protection du greffon rénal par diminution de l’intensité du stress oxydant, une augmentation de la réponse à ce stress par activation de l’expression de PGC1-α,

une protection de la mitochondrie par la favorisation de la fusion (DRP1/MFN2) et une stimulation de l'autophagie par mTOR.

IV. Le donneur décédé après arrêt cardiaque : la CRN, durée optimale et mécanismes de reconditionnement, molécule anticoagulante innovante.

1. La CRN, durée optimale et mécanismes de reconditionnement

Il existe deux attitudes pour la prise en charge des donneurs décédés après arrêt circulatoire. Le refroidissement *in situ* réalisé immédiatement après la confirmation du décès ou la mise en place d'une circulation régionale normothermique (CRN). Il n'existe pas de consensus international pour le choix de l'une ou l'autre des techniques, néanmoins les greffons issus des DDAC ayant eu une CRN semblent présenter de meilleures reprises de fonction primaire et durées de vie. Les données cliniques font état d'un bénéfice évident de la CRN avec un taux de reprise de fonction retardée en greffe rénale en France qui est de 9% contre 57 % en Espagne et plus de 70 % dans la plupart des séries anglosaxonnes publiées.

Les mécanismes cellulaires expliquant ces constatations n'ont pas fait l'objet d'études fondamentales et pourtant leur description et leur compréhension permettraient d'améliorer encore la qualité des reins provenant de DDAC.

L'autre question essentielle, est la durée optimale du reconditionnement par CRN. En effet, celle-ci n'est pas bien définie. Il est admis qu'il faut soumettre les reins à au moins 1 heure de reperfusion mais les procédures internationales loin d'être consensuelles sont très disparates (Ortega-Deballon et al., 2015). Cette durée varie de 2h de CRN en Angleterre (Oniscu et al., 2014), 3h en Suisse , 4h en Espagne et en France (Barrou et al., 2016) jusqu'à 6h en Italie (Geraci and Sepe, 2011). Nous avons donc essayé d'apporter des éléments de réponse à ces questions en nous basant sur un modèle porcin de DDAC pris en charge par CRN.

Le première aspect de la mise en place de la CRN est la restauration d'une hémodynamique stable. En effet dans ce modèle très contrôlé de CRN, le débit de pompe, la pression artérielle

moyenne, la pression partielle en oxygène, la saturation artérielle en oxygène la pression partielle en dioxyde de carbone et la concentration en tampon bicarbonate sont restés stables lors de chacune des procédures. Par contre, le déterminant majeur du transport en oxygène que nous mesurions sans le modifier était la concentration en hémoglobine. Celle-ci par divers mécanisme avait tendance à diminuer de manière significative à 6h de CRN entraînant une altération du transport en oxygène. Néanmoins le rapport lactate/pyruvate suivait une cinétique favorable durant les procédures avec une augmentation initialement marquée de la fin de la phase d'arrêt circulatoire à 2h de CRN puis se normalisait. Ceci traduit le déséquilibre entre apport et besoin en oxygène induit par l'arrêt circulatoire et le rééquilibre obtenu par l'utilisation de la CRN (Corbucci et al., 1992; Yoshihara et al., 2015). L'autre bénéfice de la restauration d'une hémodynamique par la CRN est l'activation de la NO-synthase constitutive en réponse au shear stress avec une synthèse bénéfique de NO limitant le no reflow post-reperfusion (Chatauret et al., 2014; Stojanovic et al., 1996; Vos et al., 2004). De par la phase d'ischémie chaude prolongée, inévitable dans le cadre du DDAC, nous nous sommes intéressés à l'éventuelle voie de reconditionnement passant par HIF1-α.

Alors que HIF1-α n'est pas surexprimé à la fin des 30 min d'arrêt circulatoire, nous avons mis en évidence une surexpression à partir de 2h de CRN et un maintien de celle-ci. Or, HIF-1α est acteur majeur de la réponse à l'hypoxie et son activation va permettre d'initier l'expression d'éléments adaptatifs à la l'hypoxie (Conde et al., 2012; Nangaku et al., 2013; Schley et al., 2011). Dans notre modèle nous avons observé une activation des voies de l'érythropoïèse, de l'angiogénèse et de la protection cellulaire initiées par HIF-1α via l'expression d'EPO, VEGF, HO-1 et de Glut-1. Dans le contexte de l'ischémie/reperfusion rénale lors d'un processus de greffe, la synthèse de ces protéines est corrélée à une meilleure reprise de fonction primaire et une meilleure survie du greffon (Hu et al., 2012; Lemos et al., 2003; van Rijt et al., 2014; Wagner et al., 2003) .

L'ischémie chaude induit une libération de facteur tissulaire, et une activation de la coagulation avec une génération de thrombine. La thrombine ainsi que le facteur Xa permettent l'activation des PAR qui une fois activés, vont entraîner une synthèse de cytokines et de molécules d'adhérences aux cellules inflammatoires.

Pendant la procédure de CRN, on notait une activation plaquettaire reflétée par l'augmentation du CD40 ligand à 1h et 2h de CRN. Le CD40 ligand active la sécrétion de facteur tissulaire soluble par les monocytes (Lindmark et al., 2000). Le facteur tissulaire présente une cinétique en 2 pics avec un premier à 1h lié au facteur tissulaire relargué lors des lésions endothéliales faisant suite à l'arrêt circulatoire et le deuxième correspondant au relargage de CD40 ligand.

Par ailleurs, la CRN a permis de restaurer les niveaux tissulaires de thrombomoduline qui est un facteur modulant l'activation endothéliale de la coagulation. Celle-ci avait d'abord été down-régulée par l'hypoxémie pendant l'arrêt circulatoire (Ogawa et al., 1992). Cette normalisation de la thrombomoduline est probablement secondaire à la restauration d'un shear stress (Rossi et al., 2010).

La phase d'arrêt circulatoire a activé entre autres les facteurs VII et X avec comme conséquence, l'activation des PARs et notamment de PAR2. Cette activation apparaît à partir de 2h de CRN et est significative à partir de 6h. L'activation de PAR2 va entraîner l'up-régulation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, IL-8) et de molécules d'adhérence (MCP-1) avec comme conséquence, une augmentation de l'infiltrat leucocytaire dans les reins ayant étaient prélevée après 6h de CRN.

Lorsque nous avons comparé les résultats des allogreffes rénales en fonction de la présence ou non d'un reconditionnement par CRN et de sa durée, nous avons confirmé que la CRN fait mieux qu'un prélèvement immédiat en termes de reprise de fonction et en termes de lésions

tissulaires précoces (infiltrat leucocytaire, perte de bordure en brosse) et chroniques (fibrose). La durée optimale sans intervention semble être 4h car même si les paramètres de fonction post-greffe sont identiques, il y a plus de lésions histologiques chez les greffons ayant eu 6h de CRN, une activation de l'endothélium avec l'expression de cytokines pro-inflammatoires, une altération du transport en oxygène par anémie et il n'y a plus de majoration des voies de reconditionnement de HIF-1α, de sécrétion de IL-10 ou de thrombomoduline.

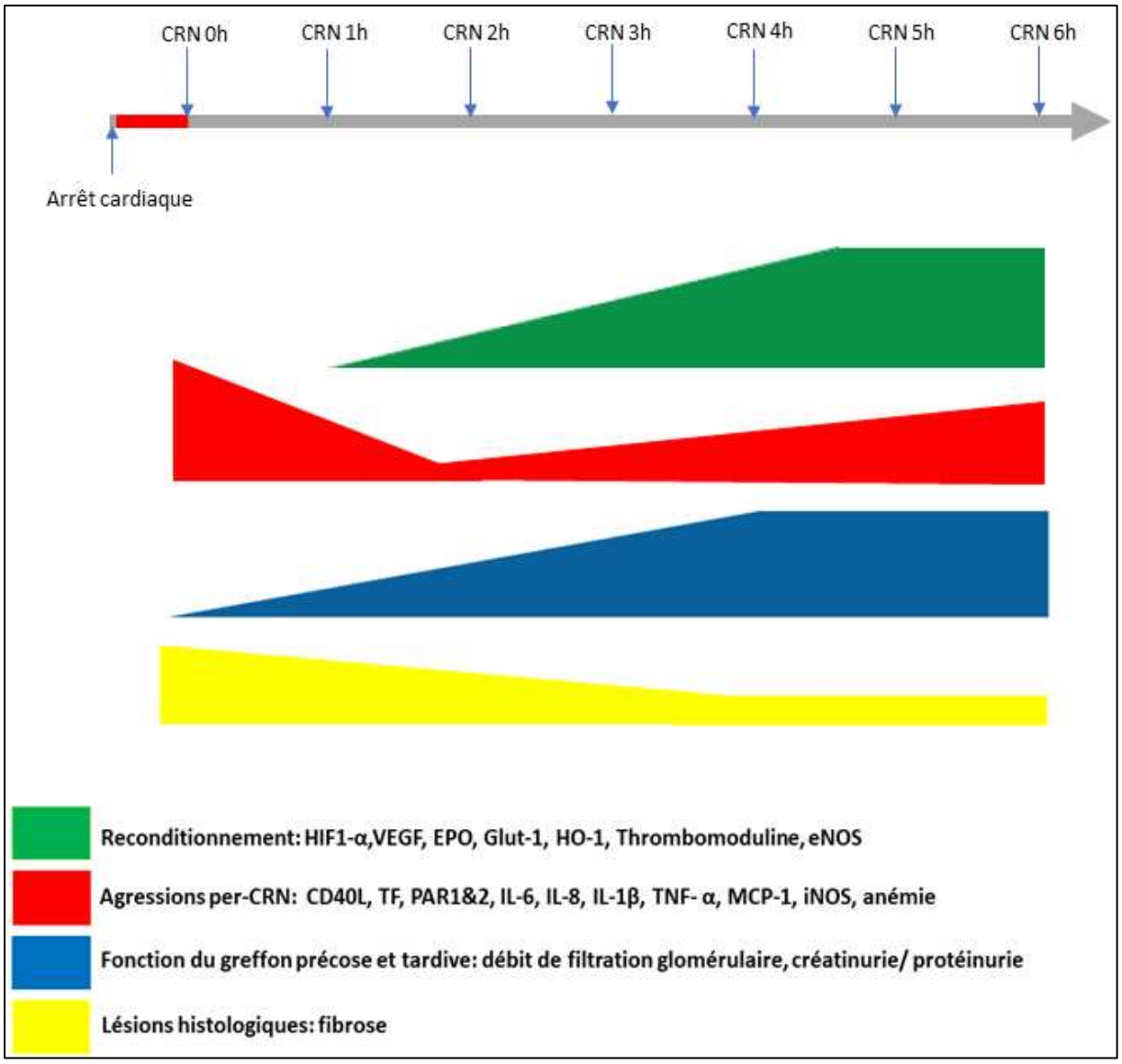

Figure 13. Schéma de synthèse de l'activation des voies de reconditionnements et de l'intensité des mécanismes lésionnels pendant la perfusion des reins par la CRN en fonction du temps.

2. Inhibition de la coagulation

Dans notre modélisation préclinique de donneur DCD nous avons mis en évidence que parmi les mécanismes générant des lésions sur les futurs greffons rénaux, l'activation de la coagulation jouait éventuellement un rôle important. Nous avons choisi d'évaluer l'effet de l'ajout d'une molécule anti-Xa et anti-IIa dans une solution de conservation de type extracellulaire (UW) lors de la conservation statique de rein ayant subi une séquence d'ischémie chaude de 60 minutes.

Nous n'avons pas utilisé le modèle plus complexe de DCD avec CRN car dans le respect des règles de bonne pratique de l'expérimentation animale et notamment les 3R il n'était pas justifié d'utiliser un tel modèle pour la question posée, le nombre d'animaux potentiellement nécessaires étant très conséquent (Parlement européen et Conseil, 2010).

Le choix d'une molécule ayant un effet inhibiteur anti-IIa et anti-Xa direct était basé sur des résultats préliminaires encourageants obtenu par notre équipe avec le fondaparinux (anti-Xa) (Tillet et al., 2016) et le megalatran (anti-IIa direct) (Favreau et al., 2010; Giraud et al., 2009).

La molécule EP609 anti-Xa/anti-IIa que nous avons évaluée *in vitro* et *in vivo* dans des conditions mimant respectivement une conservation statique à 4°C suivi d'une reperfusion, et un modèle *in vivo* de DCD semblerait limiter les lésions d'ischémie/reperfusion ainsi générées.

In vivo, des cellules endothéliales soumises à une séquence d'ischémie froide (imitée expérimentalement par l'incubation en hypoxie dans une solution d'UW à 4°C pendant 24 heures) suivie d'une phase de reperfusion (imitée expérimentalement par réoxygénation à 37°C dans 20%d'O_2) modélisaient de manière satisfaisante l'activation de la coagulation secondaire à l'ischémie/reperfusion. Les cellules endothéliales d'aorte humaine (Human

aortic endothelial cell= HAEC) utilisées surexprimaient de la phosphatidylsérine et du facteur tissulaire reproduisant des caractéristiques favorables à l'activation de la cascade de la coagulation activant *in fine* la prothrombine en thrombine. Cette hypothèse s'est vérifiée avec une génération de thrombine après mise en contact de notre modèle d'endothélium « activé » par une ischémie avec un plasma à 37°C dans des conditions de normoxie. Les cellules qui avaient été mises en « conservation » hypoxique et hypothermique avecl'EP609 n'ont pas engendré de génération de thrombine lorsqu'elles ont été mises en contact avec du plasma lors de la « reperfusion ».

Cette inhibition a eu pour effet de diminuer significativement l'expression en ARNm de protéines pro-inflammatoires (TNFα, VCAM-1 et ICAM-1). Notre hypothèse est que l'inhibition du FXa et de la thrombine n'entraîne pas l'activation des PARs. Les PARs sont des acteurs importants de l'activation pro-inflammatoire de l'endothélium suite à l'activation de la coagulation (Borensztajn et al., 2009; Chambers and Laurent, 2002; Scotton et al., 2009). Ces résultats suggèrent un effet bénéfique de l'utilisation de l'EP609 comme adjuvant aux solutions de conservation en condition statique.

La deuxième étape de ce travail a consisté à évaluer cette molécule *in vitro* dans un modèle porcin simplifié de DCD. Le modèle consistait à clamper le pédicule rénale dans la cavité abdominale de l'animal sous anesthésie générale et procéder ensuite à la néphrectomie. Le rein était ensuite mis en conservation statique à 4°C dans une solution d'UW pendant 24h avant d'être greffé au même animal après néphrectomie controlatérale (Hauet et al., 2000).

Les animaux étaient suivis pendant 3 mois avant sacrifice pour évaluer les reprises de fonction primaire des greffons, leur fonction à distance de la greffe et les lésions chroniques à 3 mois.

Les greffons étaient conservés dans une solution supplémentée ou non en EP609.

L’effet anticoagulant était validé par la diminution dans le groupe d’animaux greffés avec des reins conservés avec EP609 de la concentration en complexes thrombine-antithrombine reflétant la quantité de thrombine générée.

Les effets *in vivo* de la molécule ont été d’améliorer les reprises de fonction primaire, de diminuer l’activation pro-inflammatoire de l’endothélium avec une diminution de l’expression de molécules d’adhérence (MCP-1), des cytokines pro-inflammatoires (IL-8, TGF-β et IL-1β) et des protéines pro-fibrosantes (MMP-2). Par conséquence, les greffons présentaient également moins d’infiltrats par des cellules inflammatoires (marquage HES et SWC3a en immuno-histochimie) précocement et à 3 mois.

Ces expériences *in vitro* et *in vivo* de l’effet protecteur d’un anticoagulant innovant à l’activité anti-IIA et anti-Xa valident expérimentalement l’intérêt de moduler la voie de la coagulation-inflammation pendant la conservation.

Conclusion et perspectives

Les résultats de ce travail ne permettront pas directement d'optimiser les greffons durant la réanimation du donneur de rein décédé mais ils ouvrent des pistes de prise en charge intéressantes.

Concernant le DME, les données sur l'impact de la cinétique de passage en mort encéphalique permettent de choisir le modèle le plus adapté aux futures questions scientifiques posées. L'application du concept d'allostasie à la réponse au stress oxydant généré lors du passage en mort encéphalique est originale et innovante. La compréhension plus fine des mécanismes supposés de cette allostasie va nécessiter d'une part d'autres expérimentations pour détailler les voies initiées par les sirtuines et PGC1α et leurs modulations avec les voies régulées par le shear stress et d'autre part de confirmer ces résultats chez l'homme et notamment l'hypothèse de la balance NRF2/P-mTOR.

Expérimentalement, la mise au point de modèles porcins à critères élargis est un vrai défis mais indispensable pour creuser cette hypothèse car comme nous l'avons vu, mTOR a un rôle central dans de nombreux phénomènes physiopathologiques rénaux avec selon les pathologies et le type d'agression, un rôle protecteur ou au contraire pro-lésionnel. Il n'est en effet pas garanti que cette balance NRF2/p-mTOR soit reproductible d'une part chez l'homme et d'autre part en cas de conditions de donneur à critères élargis. En ce sens, le laboratoire a mis au point des porcs « hypercholestérolémiques » chez qui une modélisation de donneur décédé (DME ou DDAC) reste à réaliser.

Si cette approche par le rapport NRF2/ P-mTOR se confirme, deux exploitations sont envisageables. D'une part la mise au point d'un biomarqueur utilisable pendant la phase de réanimation du donneur. Les difficultés techniques sont l'accès à des cellules rénales du donneur sans mettre en péril le prélèvement et des analyses dont les résultats peuvent être

accessibles dans des délais raisonnables pour disposer d'une qualification des reins compatible avec le processus d'évaluation et d'attribution des organes. L'utilisation de matériel cellulaire urinaire est l'une de ces approches déjà exploitées en cancérologie (Noel et al., 2015).

D'autre part, mTOR et NRF2 pourraient être utilisé comme cible thérapeutique. L'utilisation d'inhibiteur de mTOR chez le donneur a déjà fait l'objet de plusieurs études expérimentales chez le rat par la même équipe avec des résultats intéressants mais les donneurs n'étaient pas décédés (Cicora et al., 2010, 2012). Les agents pharmacologiques activant NRF2 ont été utilisés dans le cerveau et un peu plus dans notre organe cible le rein avec des résultats intéressants mais pas en préconditionnement chez le donneur de rein DME (Murphy et al., 2018; Saito, 2013).

Concernant le DDAC, les données que nous avons obtenues permettent de répondre aux questions soulevées par la CRN, i.e. comment cela fonctionne et combien de temps les reins doivent être reconditionnés. La durée de reconditionnement est de manière intuitive probablement modulable par l'utilisation de thérapeutiques supplémentaires per-CRN. L'un des adjuvants évidents est l'adjonction d'un transporteur d'oxygène soit comme cela se fait actuellement en clinique par transfusion sanguine, soit en utilisant un transporteur de synthèse avec potentiellement d'autres effets thérapeutiques comme l'hémoglobine de vers marins (Glorion et al., 2017; Rodriguez-Brotons et al., 2016). Comme nous l'avons montré l'une des voies pro-lésionnelles pendant la CRN est l'initiation de la coagulation avec l'activation de l'inflammation *via* les PARs. La modulation de l'activation des PARs par inhibition des facteurs Xa et IIa a montré son efficacité lors de la conservation et sur un modèle cellulaire. Utiliser des agents de ce type pendant la procédure de CRN pourrait être évalué mais il faut que ces agents bien qu'efficaces offrent une sécurité de procédure chirurgicale ne mettant pas en péril le prélèvement lui-même.

Bibliographie

ABM (2016). Le rapport médical et scientifique de l'Agence de la biomédecine. Le rapport médical et scientifique du prélèvement et de la greffe en France. 2016.

ABM (2017). Le rapport médical et scientifique de l'Agence de la biomédecine. Le rapport médical et scientifique du prélèvement et de la greffe en France. 2017.

Ad Hoc Committee of the Harvard Medical Schoo (1968). A definition of irreversible coma. Report of the Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School to Examine the Definition of Brain Death. JAMA *205*, 337–340.

Allain, G., Kerforne, T., Thuret, R., Delpech, P.-O., Saint-Yves, T., Pinsard, M., Hauet, T., Giraud, S., Jayle, C., and Barrou, B. (2014). Development of a preclinical model of donation after circulatory determination of death for translational application. Transplant. Res. *3*, 13.

Anaya-Prado, R., and Delgado-Vázquez, J.A. (2008). Scientific basis of organ preservation. Curr. Opin. Organ Transplant. *13*, 129–134.

Araki, M., Fahmy, N., Zhou, L., Kumon, H., Krishnamurthi, V., Goldfarb, D., Modlin, C., Flechner, S., Novick, A.C., and Fairchild, R.L. (2006). Expression of IL-8 during reperfusion of renal allografts is dependent on ischemic time. Transplantation *81*, 783–788.

Arrêté du 2 décembre 1996 (1996). Arrêté du 2 décembre 1996, pris en application du décret N° 96-1041 du 2 décembre 1996 relatif au constat de la mort préalable au prélèvement d'organes, de tissus et de cellules à des fins thérapeutiques ou scientifiques.

Austin, S., and St-Pierre, J. (2012). PGC1α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. J. Cell Sci. *125*, 4963–4971.

Babior, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. Am. J. Med. *109*, 33–44.

Ball, I.M., Sibbald, R., and Truog, R.D. (2018). Voluntary Euthanasia - Implications for Organ Donation. N. Engl. J. Med. *379*, 909–911.

Barklin, A. (2009). Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. Acta Anaesthesiol. Scand. *53*, 425–435.

Barklin, A., Larsson, A., Vestergaard, C., Kjaergaard, A., Wogensen, L., Schmitz, O., and Tønnesen, E. (2008). Insulin alters cytokine content in two pivotal organs after brain death: a porcine model. Acta Anaesthesiol. Scand. *52*, 628–634.

Barrou, B., Chatauret, N., Hauet, T., Thuret, R., Kleinclauss, F., Timsit, M.-O., Codas, R., Matillon, X., and Badet, L. (2016). [Ischemia-reperfusion. Preservation solution and hypothermic machine perfusion]. Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol. *26*, 964–976.

Beauger, D., Gentile, S., Jacquelinet, C., Dussol, B., and Briançon, S. (2015). [Comparison of two national quality of life surveys for patients with end stage renal disease between 2005-2007 and 2011: indicators slightly decreased]. Nephrol. Ther. *11*, 88–96.

Bendavit, G., Aboulkassim, T., Hilmi, K., Shah, S., and Batist, G. (2016). Nrf2 Transcription Factor Can Directly Regulate mTOR: LINKING CYTOPROTECTIVE GENE EXPRESSION TO A MAJOR METABOLIC REGULATOR THAT GENERATES REDOX ACTIVITY. J. Biol. Chem. *291*, 25476–25488.

Blotière, P.-O., Tuppin, P., Weill, A., Ricordeau, P., and Allemand, H. (2010). [The cost of dialysis and kidney transplantation in France in 2007, impact of an increase of peritoneal dialysis and transplantation]. Nephrol. Ther. *6*, 240–247.

Bollen, J., Ten Hoopen, R., Ysebaert, D., van Mook, W., and van Heurn, E. (2016). Legal and ethical aspects of organ donation after euthanasia in Belgium and the Netherlands. J. Med. Ethics *42*, 486–489.

Bollen, J.A.M., Shaw, D., de Wert, G., Ten Hoopen, R., Ysebaert, D., van Heurn, E., and van Mook, W.N.K.A. (2018). Euthanasia through living organ donation: Ethical, legal, and medical challenges. J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.

Bond, M., Pitt, M., Akoh, J., Moxham, T., Hoyle, M., and Anderson, R. (2009). The effectiveness and cost-effectiveness of methods of storing donated kidneys from deceased donors: a systematic review and economic model. Health Technol. Assess. Winch. Engl. *13*, iii–iv, xi–xiv, 1–156.

Bonventre, J.V., and Weinberg, J.M. (2003). Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *14*, 2199–2210.

Borensztajn, K., Peppelenbosch, M.P., and Spek, C.A. (2009). Coagulation factor Xa signaling: the link between coagulation and inflammatory bowel disease? Trends Pharmacol. Sci. *30*, 8–16.

Boros, P., and Bromberg, J.S. (2006). New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *6*, 652–658.

Cassie, S., Masterson, M.F., Polukoshko, A., Viskovic, M.M., and Tibbles, L.A. (2004). Ischemia/reperfusion induces the recruitment of leukocytes from whole blood under flow conditions. Free Radic. Biol. Med. *36*, 1102–1111.

Chambers, R.C., and Laurent, G.J. (2002). Coagulation cascade proteases and tissue fibrosis. Biochem. Soc. Trans. *30*, 194–200.

Chatauret, N., Coudroy, R., Delpech, P.O., Vandebrouck, C., Hosni, S., Scepi, M., and Hauet, T. (2014). Mechanistic analysis of nonoxygenated hypothermic machine perfusion's protection on warm ischemic kidney uncovers greater eNOS phosphorylation and vasodilation. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *14*, 2500–2514.

Chen, L., Xu, B., Liu, L., Luo, Y., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Han, X., Kontos, C.D., and Huang, S. (2011a). Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. Free Radic. Biol. Med. *50*, 624–632.

Chen, S.-D., Yang, D.-I., Lin, T.-K., Shaw, F.-Z., Liou, C.-W., and Chuang, Y.-C. (2011b). Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. Int. J. Mol. Sci. *12*, 7199–7215.

Chen, Z., Peng, I.-C., Cui, X., Li, Y.-S., Chien, S., and Shyy, J.Y.-J. (2010). Shear stress, SIRT1, and vascular homeostasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 10268–10273.

Chertow, G.M., Milford, E.L., Mackenzie, H.S., and Brenner, B.M. (1996). Antigen-independent determinants of cadaveric kidney transplant failure. JAMA *276*, 1732–1736.

Cicora, F., Lausada, N., Vasquez, D.N., Cicora, P., Zalazar, G., Gonzalez, P., Palti, G., and Raimondi, C. (2010). Sirolimus in kidney transplant donors and clinical and histologic improvement in recipients: rat model. Transplant. Proc. *42*, 365–370.

Cicora, F., Roberti, J., Vasquez, D., Guerrieri, D., Lausada, N., Cicora, P., Palti, G., Chuluyan, E., Gonzalez, P., Stringa, P., et al. (2012). Preconditioning donor with a combination of tacrolimus and rapamacyn to decrease ischaemia-reperfusion injury in a rat syngenic kidney transplantation model. Clin. Exp. Immunol. *167*, 169–177.

Circulaire D.G.S. n° 96-733 du 04 décembre 1996 (1996). Circulaire D.G.S. n° 96-733 du 04 décembre 1996, relative au constat de la mort préalable au prélèvement d'organes, de tissus et de cellules à des fins thérapeutiques ou scientifiques défini par le décret n° 96-1041 du 2 décembre 1996.

Cockcroft, D.W., and Gault, M.H. (1976). Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron *16*, 31–41.

Conde, E., Alegre, L., Blanco-Sánchez, I., Sáenz-Morales, D., Aguado-Fraile, E., Ponte, B., Ramos, E., Sáiz, A., Jiménez, C., Ordoñez, A., et al. (2012). Hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 alpha) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival. PloS One *7*, e33258.

Corbucci, G.G., Menichetti, A., Cogliatti, A., Nicoli, P., Arduini, A., Damonti, W., Marchionni, A., and Calvani, M. (1992). Metabolic aspects of acute cerebral hypoxia during extracorporeal circulation and their modification induced by acetyl-carnitine treatment. Int. J. Clin. Pharmacol. Res. *12*, 89–98.

Coughlin, S.R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. Nature *407*, 258–264.

Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. Nature *450*, 736–740.

Décret n° 96-1041 du 2 décembre 1996 (1996). Décret n° 96-1041 du 2 décembre 1996, relatif au constat de la mort préalable au prélèvement d'organes, de tissus et de cellules à des fins thérapeutiques ou Scientifiques et modifiant le code de la santé publique (deuxième partie : décret en Conseil d'État).

Delsuc, C., Faure, A., Berthiller, J., Dorez, D., Matillon, X., Meas-Yedid, V., Floccard, B., Marcotte, G., Labeye, V., Rabeyrin, M., et al. (2018). Uncontrolled donation after circulatory

death: comparison of two kidney preservation protocols on graft outcomes. BMC Nephrol. *19*, 3.

Demiselle, J., Augusto, J.-F., Videcoq, M., Legeard, E., Dubé, L., Templier, F., Renaudin, K., Sayegh, J., Karam, G., Blancho, G., et al. (2016). Transplantation of kidneys from uncontrolled donation after circulatory determination of death: comparison with brain death donors with or without extended criteria and impact of normothermic regional perfusion. Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *29*, 432–442.

Duan, Q., Yang, W., Jiang, D., Tao, K., Dong, A., and Cheng, H. (2016). Spermine ameliorates ischemia/reperfusion injury in cardiomyocytes via regulation of autophagy. Am. J. Transl. Res. *8*, 3976–3985.

Dugina, T.N., Kiseleva, E.V., Chistov, I.V., Umarova, B.A., and Strukova, S.M. (2002). Receptors of the PAR family as a link between blood coagulation and inflammation. Biochem. Biokhimiia *67*, 65–74.

Dupas, B., Gayet-Delacroix, M., Villers, D., Antonioli, D., Veccherini, M.F., and Soulillou, J.P. (1998). Diagnosis of brain death using two-phase spiral CT. AJNR Am. J. Neuroradiol. *19*, 641–647.

Dutkiewicz, G., Domanski, L., Binczak-Kuleta, A., Pawlik, A., Safranow, K., Dziedziejko, V., Wisniewska, M., Ciechanowicz, A., and Ciechanowski, K. (2009). Lack of association of polymorphisms 239+34A/C in the SOD1 gene and 47C/T in the SOD2 gene with delayed graft function and acute and chronic rejection of kidney allografts. Transplant. Proc. *41*, 3701–3703.

Eggers, P.W. (1988). Effect of transplantation on the Medicare end-stage renal disease program. N. Engl. J. Med. *318*, 223–229.

Eltzschig, H.K., and Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. Nat. Med. *17*, 1391–1401.

Fantus, D., Rogers, N.M., Grahammer, F., Huber, T.B., and Thomson, A.W. (2016). Roles of mTOR complexes in the kidney: implications for renal disease and transplantation. Nat. Rev. Nephrol. *12*, 587–609.

Farney, A.C., Singh, R.P., Hines, M.H., Rogers, J., Hartmann, E.L., Reeves-Daniel, A., Gautreaux, M.D., Iskandar, S.S., Adams, P.L., and Stratta, R.J. (2008). Experience in renal and extrarenal transplantation with donation after cardiac death donors with selective use of extracorporeal support. J. Am. Coll. Surg. *206*, 1028–1037; discussion 1037.

Favreau, F., Thuillier, R., Cau, J., Milin, S., Manguy, E., Mauco, G., Zhu, X., Lerman, L.O., and Hauet, T. (2010). Anti-thrombin therapy during warm ischemia and cold preservation prevents chronic kidney graft fibrosis in a DCD model. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *10*, 30–39.

Flinn, R.J., Yan, Y., Goswami, S., Parker, P.J., and Backer, J.M. (2010). The late endosome is essential for mTORC1 signaling. Mol. Biol. Cell *21*, 833–841.

Fouque, D., and Laville, M. (2009). Low protein diets for chronic kidney disease in non diabetic adults. Cochrane Database Syst. Rev. CD001892.

Fournier, M.-J., Coudert, L., Mellaoui, S., Adjibade, P., Gareau, C., Côté, M.-F., Sonenberg, N., Gaudreault, R.C., and Mazroui, R. (2013). Inactivation of the mTORC1-eukaryotic translation initiation factor 4E pathway alters stress granule formation. Mol. Cell. Biol. *33*, 2285–2301.

Frangogiannis, N.G. (2007). Chemokines in ischemia and reperfusion. Thromb. Haemost. *97*, 738–747.

Friguet, B. (2006). Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. FEBS Lett. *580*, 2910–2916.

Froissart, M., Rossert, J., Jacquot, C., Paillard, M., and Houillier, P. (2005). Predictive performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations for estimating renal function. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *16*, 763–773.

Fuller, T.F., Freise, C.E., Serkova, N., Niemann, C.U., Olson, J.L., and Feng, S. (2003). Sirolimus delays recovery of rat kidney transplants after ischemia-reperfusion injury. Transplantation *76*, 1594–1599.

Gasser, M., Waaga, A.M., Kist-Van Holthe, J.E., Lenhard, S.M., Laskowski, I., Shaw, G.D., Hancock, W.W., and Tilney, N.L. (2002). Normalization of brain death-induced injury to rat renal allografts by recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *13*, 1937–1945.

Geraci, P.M., and Sepe, V. (2011). Non-heart-beating organ donation in Italy. Minerva Anestesiol. *77*, 613–623.

Giacomoni, A., Di Sandro, S., Lauterio, A., Mangoni, I., Mihaylov, P., Concone, G., Tripepi, M., Poli, C., Cusumano, C., and De Carlis, L. (2013). Initial experience with robot-assisted nephrectomy for living-donor kidney transplantation: feasibility and technical notes. Transplant. Proc. *45*, 2627–2631.

Giral, M., Bertola, J.P., Foucher, Y., Villers, D., Bironneau, E., Blanloeil, Y., Karam, G., Daguin, P., Lerat, L., and Soulillou, J.P. (2007). Effect of brain-dead donor resuscitation on delayed graft function: results of a monocentric analysis. Transplantation *83*, 1174–1181.

Giraud, S., Thuillier, R., Belliard, A., Hebrard, W., Nadeau, C., Milin, S., Goujon, J.-M., Manguy, E., Mauco, G., Hauet, T., et al. (2009). Direct thrombin inhibitor prevents delayed graft function in a porcine model of renal transplantation. Transplantation *87*, 1636–1644.

Giraud, S., Favreau, F., Chatauret, N., Thuillier, R., Maiga, S., and Hauet, T. (2011). Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model. J. Biomed. Biotechnol. *2011*, 532127.

Glorion, M., Polard, V., Favereau, F., Hauet, T., Zal, F., Fadel, E., and Sage, E. (2017). Prevention of ischemia-reperfusion lung injury during static cold preservation by supplementation of standard preservation solution with HEMO2life® in pig lung transplantation model. Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol. 1–8.

Goeptar, A.R., te Koppele, J.M., van Maanen, J.M., Zoetemelk, C.E., and Vermeulen, N.P. (1992). One-electron reductive bioactivation of 2,3,5,6-tetramethylbenzoquinone by cytochrome P450. Biochem. Pharmacol. *43*, 343–352.

Gómez, V., Galeano, C., Diez, V., Bueno, C., Díaz, F., and Burgos, F.J. (2012). Economic impact of the introduction of machine perfusion preservation in a kidney transplantation program in the expanded donor era: cost-effectiveness assessment. Transplant. Proc. *44*, 2521–2524.

Gonçalves, G.M., Cenedeze, M.A., Feitoza, C.Q., Wang, P.M.H., Bertocchi, A.P.F., Damião, M.J., Pinheiro, H.S., Antunes Teixeira, V.P., dos Reis, M.A., Pacheco-Silva, A., et al. (2006). The role of heme oxygenase 1 in rapamycin-induced renal dysfunction after ischemia and reperfusion injury. Kidney Int. *70*, 1742–1749.

Gonçalves, G.M., Cenedeze, M.A., Feitoza, C.Q., de Paula, C.B., Marques, G.D., Pinheiro, H.S., de Paula Antunes Teixeira, V., Antônia dos Reis, M., Pacheco-Silva, A., and Câmara, N.O.S. (2007). The role of immunosuppressive drugs in aggravating renal ischemia and reperfusion injury. Transplant. Proc. *39*, 417–420.

Gridelli, B., and Remuzzi, G. (2000). Strategies for making more organs available for transplantation. N. Engl. J. Med. *343*, 404–410.

Grune, T. (2002). Oxidants and antioxidative defense. Hum. Exp. Toxicol. *21*, 61–62.

Gu, C., Xing, Y., Jiang, L., Chen, M., Xu, M., Yin, Y., Li, C., Yang, Z., Yu, L., and Ma, H. (2013). Impaired cardiac SIRT1 activity by carbonyl stress contributes to aging-related ischemic intolerance. PloS One *8*, e74050.

Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. Annu. Rev. Nutr. *16*, 33–50.

Hariharan, S., McBride, M.A., Bennett, L.E., and Cohen, E.P. (1997). Risk factors for renal allograft survival from older cadaver donors. Transplantation *64*, 1748–1754.

Hauet, T., and Eugene, M. (2008). A new approach in organ preservation: potential role of new polymers. Kidney Int. *74*, 998–1003.

Hauet, T., Baumert, H., Amor, I.B., Gibelin, H., Tallineau, C., Eugene, M., Tillement, J.P., and Carretier, M. (2000). Pharmacological limitation of damage to renal medulla after cold storage and transplantation by trimetazidine. J. Pharmacol. Exp. Ther. *292*, 254–260.

Hicks, M., Hing, A., Gao, L., Ryan, J., and Macdonald, P.S. (2006). Organ preservation. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *333*, 331–374.

Hoeger, S., Gottmann, U., Liu, Z., Schnuelle, P., Birck, R., Braun, C., van der Woude, F.J., and Yard, B.A. (2007). Dopamine treatment in brain-dead rats mediates anti-inflammatory effects: the role of hemodynamic stabilization and D-receptor stimulation. Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *20*, 790–799.

van der Hoeven, J.A.B., Molema, G., Ter Horst, G.J., Freund, R.L., Wiersema, J., van Schilfgaarde, R., Leuvenink, H.G.D., and Ploeg, R.J. (2003). Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. Kidney Int. *64*, 1874–1882.

Hostetter, T.H., Olson, J.L., Rennke, H.G., Venkatachalam, M.A., and Brenner, B.M. (1981). Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. Am. J. Physiol. *241*, F85-93.

Hou, F.F., Zhang, X., Zhang, G.H., Xie, D., Chen, P.Y., Zhang, W.R., Jiang, J.P., Liang, M., Wang, G.B., Liu, Z.R., et al. (2006). Efficacy and safety of benazepril for advanced chronic renal insufficiency. N. Engl. J. Med. *354*, 131–140.

Hu, L., Yang, C., Zhao, T., Xu, M., Tang, Q., Yang, B., Rong, R., and Zhu, T. (2012). Erythropoietin ameliorates renal ischemia and reperfusion injury via inhibiting tubulointerstitial inflammation. J. Surg. Res. *176*, 260–266.

Huang, E., Poommipanit, N., Sampaio, M.S., Kuo, H.-T., Reddy, P., Gritsch, H.A., Pham, P.-T., Wilkinson, A., Danovitch, G., and Bunnapradist, S. (2010). Intermediate-term outcomes associated with kidney transplantation in recipients 80 years and older: an analysis of the OPTN/UNOS database. Transplantation *90*, 974–979.

Hvas, C.L., Nørregaard, R., Nielsen, T.K., Barklin, A., and Tønnesen, E. (2014). Brain death increases COX-1 and COX-2 expression in the renal medulla in a pig model. Acta Anaesthesiol. Scand. *58*, 243–250.

Inman, S.R., Davis, N.A., Olson, K.M., Lukaszek, V.A., McKinley, M.R., and Seminerio, J.L. (2003). Rapamycin preserves renal function compared with cyclosporine A after ischemia/reperfusion injury. Urology *62*, 750–754.

Jain, S., Bicknell, G.R., Whiting, P.H., and Nicholson, M.L. (2001). Rapamycin reduces expression of fibrosis-associated genes in an experimental model of renal ischaemia reperfusion injury. Transplant. Proc. *33*, 556–558.

Jamieson, R.W., and Friend, P.J. (2008). Organ reperfusion and preservation. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *13*, 221–235.

Jang, H.R., Ko, G.J., Wasowska, B.A., and Rabb, H. (2009). The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. J. Mol. Med. Berl. Ger. *87*, 859–864.

Jensen, C.E., Sørensen, P., and Petersen, K.D. (2014). In Denmark kidney transplantation is more cost-effective than dialysis. Dan. Med. J. *61*, A4796.

Jochmans, I., Lerut, E., van Pelt, J., Monbaliu, D., and Pirenne, J. (2011). Circulating AST, H-FABP, and NGAL are early and accurate biomarkers of graft injury and dysfunction in a preclinical model of kidney transplantation. Ann. Surg. *254*, 784–791; discussion 791-792.

Jolicoeur, E.M., Qi, S., Xu, D., Dumont, L., Daloze, P., and Chen, H. (2003). Combination therapy of mycophenolate mofetil and rapamycin in prevention of chronic renal allograft rejection in the rat. Transplantation *75*, 54–59.

Jornayvaz, F.R., and Shulman, G.I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. Essays Biochem. *47*, 69–84.

Kaló, Z., Járay, J., and Nagy, J. (2001). Economic evaluation of kidney transplantation versus hemodialysis in patients with end-stage renal disease in Hungary. Prog. Transplant. Aliso Viejo Calif *11*, 188–193.

Kaminska, D., Tyran, B., Mazanowska, O., Rabczynski, J., Szyber, P., Patrzalek, D., Chudoba, P., Polak, W.G., and Klinger, M. (2007). Cytokine gene expression in kidney

allograft biopsies after donor brain death and ischemia-reperfusion injury using in situ reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. Transplantation *84*, 1118–1124.

Kanzaki, H., Shinohara, F., Kanako, I., Yamaguchi, Y., Fukaya, S., Miyamoto, Y., Wada, S., and Nakamura, Y. (2016). Molecular regulatory mechanisms of osteoclastogenesis through cytoprotective enzymes. Redox Biol. *8*, 186–191.

Kapuy, O., Papp, D., Vellai, T., Bánhegyi, G., and Korcsmáros, T. (2018). Systems-Level Feedbacks of NRF2 Controlling Autophagy upon Oxidative Stress Response. Antioxid. Basel Switz. *7*.

Kehrer, J.P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology *149*, 43–50.

Kerforne, T., Favreau, F., Thuillier, R., Hauet, T., and Pinsard, M. (2016). [Toward a customized preservation for each kidney graft?]. Nephrol. Ther. *12*, 437–442.

Keyer, K., Gort, A.S., and Imlay, J.A. (1995). Superoxide and the production of oxidative DNA damage. J. Bacteriol. *177*, 6782–6790.

Kezic, A., Thaiss, F., Becker, J.U., Tsui, T.Y., and Bajcetic, M. (2013). Effects of everolimus on oxidative stress in kidney model of ischemia/reperfusion injury. Am. J. Nephrol. *37*, 291–301.

Kim, D., Nguyen, M.D., Dobbin, M.M., Fischer, A., Sananbenesi, F., Rodgers, J.T., Delalle, I., Baur, J.A., Sui, G., Armour, S.M., et al. (2007). SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. EMBO J. *26*, 3169–3179.

Kim, Y.S., Lim, C.S., Kim, S., Lee, J.S., Lee, S., Kim, S.T., Kim, H.J., and Chae, D.W. (2000). Cadaveric renal allograft at the time of implantation has the similar immunological features with the rejecting allograft. Transplantation *70*, 1080–1085.

Koch, M., Mengel, M., Poehnert, D., and Nashan, B. (2007). Effects of everolimus on cellular and humoral immune processes leading to chronic allograft nephropathy in a rat model with sensitized recipients. Transplantation *83*, 498–505.

Koo, D.D., Welsh, K.I., McLaren, A.J., Roake, J.A., Morris, P.J., and Fuggle, S.V. (1999). Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. Kidney Int. *56*, 1551–1559.

Kootstra, G., Daemen, J.H., and Oomen, A.P. (1995). Categories of non-heart-beating donors. Transplant. Proc. *27*, 2893–2894.

Krupiczojc, M.A., Scotton, C.J., and Chambers, R.C. (2008). Coagulation signalling following tissue injury: focus on the role of factor Xa. Int. J. Biochem. Cell Biol. *40*, 1228–1237.

Kusaka, M., Pratschke, J., Wilhelm, M.J., Ziai, F., Zandi-Nejad, K., Mackenzie, H.S., Hancock, W.W., and Tilney, N.L. (2000). Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death. Transplantation *69*, 405–410.

Kwak, M.-K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., and Kensler, T.W. (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. J. Biol. Chem. *278*, 8135–8145.

Lemos, F.B.C., Ijzermans, J.N.M., Zondervan, P.E., Peeters, A.M.A., van den Engel, S., Mol, W.M., Weimar, W., and Baan, C.C. (2003). Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *14*, 3278–3287.

Levey, A.S., Bosch, J.P., Lewis, J.B., Greene, T., Rogers, N., and Roth, D. (1999). A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann. Intern. Med. *130*, 461–470.

Levey, A.S., Eckardt, K.-U., Tsukamoto, Y., Levin, A., Coresh, J., Rossert, J., De Zeeuw, D., Hostetter, T.H., Lameire, N., and Eknoyan, G. (2005). Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney Int. *67*, 2089–2100.

Levey, A.S., Stevens, L.A., Schmid, C.H., Zhang, Y.L., Castro, A.F., Feldman, H.I., Kusek, J.W., Eggers, P., Van Lente, F., Greene, T., et al. (2009). A new equation to estimate glomerular filtration rate. Ann. Intern. Med. *150*, 604–612.

Levey, A.S., Inker, L.A., and Coresh, J. (2014). GFR estimation: from physiology to public health. Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found. *63*, 820–834.

Li, C., and Jackson, R.M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *282*, C227-241.

Li, J., Ren, J., Liu, X., Jiang, L., He, W., Yuan, W., Yang, J., and Dai, C. (2015). Rictor/mTORC2 signaling mediates TGFβ1-induced fibroblast activation and kidney fibrosis. Kidney Int. *88*, 515–527.

Lieberthal, W., Fuhro, R., Andry, C.C., Rennke, H., Abernathy, V.E., Koh, J.S., Valeri, R., and Levine, J.S. (2001). Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. Am. J. Physiol. Renal Physiol. *281*, F693-706.

Lindmark, E., Tenno, T., and Siegbahn, A. (2000). Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *20*, 2322–2328.

Liu, J., Bi, X., Chen, T., Zhang, Q., Wang, S.-X., Chiu, J.-J., Liu, G.-S., Zhang, Y., Bu, P., and Jiang, F. (2015). Shear stress regulates endothelial cell autophagy via redox regulation and Sirt1 expression. Cell Death Dis. *6*, e1827.

Locke, J.E., Segev, D.L., Warren, D.S., Dominici, F., Simpkins, C.E., and Montgomery, R.A. (2007). Outcomes of kidneys from donors after cardiac death: implications for allocation and preservation. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *7*, 1797–1807.

Loubeau, P.R., Loubeau, J.M., and Jantzen, R. (2001). The economics of kidney transplantation versus hemodialysis. Prog. Transplant. Aliso Viejo Calif *11*, 291–297.

Loverre, A., Ditonno, P., Crovace, A., Gesualdo, L., Ranieri, E., Pontrelli, P., Stallone, G., Infante, B., Schena, A., Di Paolo, S., et al. (2004). Ischemia-reperfusion induces glomerular and tubular activation of proinflammatory and antiapoptotic pathways: differential modulation by rapamycin. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *15*, 2675–2686.

Lubec, G. (1996). The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res. *44*, 324–346.

Lui, S.L., Chan, K.W., Tsang, R., Yung, S., Lai, K.N., and Chan, T.M. (2006). Effect of rapamycin on renal ischemia-reperfusion injury in mice. Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *19*, 834–839.

Luo, L., Sun, Z., and Luo, G. (2013). Rapamycin is less fibrogenic than Cyclosporin A as demonstrated in a rat model of chronic allograft nephropathy. J. Surg. Res. *179*, e255-263.

Lutz, J., Zou, H., Liu, S., Antus, B., and Heemann, U. (2003). Apoptosis and treatment of chronic allograft nephropathy with everolimus. Transplantation *76*, 508–515.

Macfarlane, S.R., Seatter, M.J., Kanke, T., Hunter, G.D., and Plevin, R. (2001). Proteinase-activated receptors. Pharmacol. Rev. *53*, 245–282.

Mangino, M.J., Kosieradzki, M., Gilligan, B., Woo, H., and Southard, J.H. (2003). The effects of donor brain death on renal function and arachidonic acid metabolism in a large animal model of hypothermic preservation injury. Transplantation *75*, 1640–1647.

Matillon, X., Danjou, F., Petruzzo, P., Thaunat, O., Rimmele, T., Delsuc, C., Faure, A., Rabeyrin, M., Meas Yedid, V., Hanf, W., et al. (2017). Hypothermic pulsatile preservation of kidneys from uncontrolled deceased donors after cardiac arrest - a retrospective study. Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *30*, 1284–1291.

McCord, J.M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. Am. J. Med. *108*, 652–659.

McDonald, S.P., and Russ, G.R. (2002). Survival of recipients of cadaveric kidney transplants compared with those receiving dialysis treatment in Australia and New Zealand, 1991-2001. Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc. *17*, 2212–2219.

McTaggart, R.A., Tomlanovich, S., Bostrom, A., Roberts, J.P., and Feng, S. (2004). Comparison of outcomes after delayed graft function: sirolimus-based versus other calcineurin-inhibitor sparing induction immunosuppression regimens. Transplantation *78*, 475–480.

Melis, N., Rubera, I., Cougnon, M., Giraud, S., Mograbi, B., Belaid, A., Pisani, D.F., Huber, S.M., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., et al. (2017). Targeting eIF5A Hypusination Prevents Anoxic Cell Death through Mitochondrial Silencing and Improves Kidney Transplant Outcome. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *28*, 811–822.

Metzger, R.A., Delmonico, F.L., Feng, S., Port, F.K., Wynn, J.J., and Merion, R.M. (2003). Expanded criteria donors for kidney transplantation. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *3 Suppl 4*, 114–125.

Michan, S., and Sinclair, D. (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. Biochem. J. *404*, 1–13.

Mishra, P., and Chan, D.C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. J. Cell Biol. *212*, 379–387.

Mollaret, P., and Goulon, M. (1959). [The depassed coma (preliminary memoir)]. Rev. Neurol. (Paris) *101*, 3–15.

Monn, M.F., Gramm, A.R., Bahler, C.D., Yang, D.Y., and Sundaram, C.P. (2014). Economic and utilization analysis of robot-assisted versus laparoscopic live donor nephrectomy. J. Endourol. *28*, 780–783.

Morariu, A.M., Schuurs, T.A., Leuvenink, H.G.D., van Oeveren, W., Rakhorst, G., and Ploeg, R.J. (2008). Early events in kidney donation: progression of endothelial activation, oxidative stress and tubular injury after brain death. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *8*, 933–941.

Murphy, K.E., Llewellyn, K., Wakser, S., Pontasch, J., Samanich, N., Flemer, M., Hensley, K., Kim, D.-S., and Park, J.J. (2018). Mini-GAGR, an intranasally applied polysaccharide, activates the neuronal Nrf2-mediated antioxidant defense system. J. Biol. Chem.

Nagaraja, P., Roberts, G.W., Stephens, M., Horvath, S., Kaposztas, Z., Chavez, R., and Asderakis, A. (2015). Impact of expanded criteria variables on outcomes of kidney transplantation from donors after cardiac death. Transplantation *99*, 226–231.

Nakagawa, S., Nishihara, K., Inui, K., and Masuda, S. (2012). Involvement of autophagy in the pharmacological effects of the mTOR inhibitor everolimus in acute kidney injury. Eur. J. Pharmacol. *696*, 143–154.

Nangaku, M., Rosenberger, C., Heyman, S.N., and Eckardt, K.-U. (2013). Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. *40*, 148–157.

Niemann, C.U., Feiner, J., Swain, S., Bunting, S., Friedman, M., Crutchfield, M., Broglio, K., Hirose, R., Roberts, J.P., and Malinoski, D. (2015). Therapeutic Hypothermia in Deceased Organ Donors and Kidney-Graft Function. N. Engl. J. Med. *373*, 405–414.

Nijboer, W.N., Schuurs, T.A., van der Hoeven, J.A.B., Fekken, S., Wiersema-Buist, J., Leuvenink, H.G.D., Hofker, S., Homan van der Heide, J.J., van Son, W.J., and Ploeg, R.J. (2004). Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys. Transplantation *78*, 978–986.

Noel, N., Couteau, J., Maillet, G., Gobet, F., D'Aloisio, F., Minier, C., and Pfister, C. (2015). TP53 and FGFR3 Gene Mutation Assessment in Urine: Pilot Study for Bladder Cancer Diagnosis. Anticancer Res. *35*, 4915–4921.

Nyberg, S.L., Matas, A.J., Kremers, W.K., Thostenson, J.D., Larson, T.S., Prieto, M., Ishitani, M.B., Sterioff, S., and Stegall, M.D. (2003). Improved scoring system to assess adult donors

for cadaver renal transplantation. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *3*, 715–721.

O'Brien, E.A., Bour, S.A., Marshall, R.L., Ahsan, N., and Yang, H.C. (1996). Effect of use of vasopressors in organ donors on immediate function of renal allografts. J. Transpl. Coord. Off. Publ. North Am. Transpl. Coord. Organ. NATCO *6*, 215–216.

O'Brien, P.J., Molino, M., Kahn, M., and Brass, L.F. (2001). Protease activated receptors: theme and variations. Oncogene *20*, 1570–1581.

Ogawa, S., Koga, S., Kuwabara, K., Brett, J., Morrow, B., Morris, S.A., Bilezikian, J.P., Silverstein, S.C., and Stern, D. (1992). Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. Am. J. Physiol. *262*, C546-554.

Oniscu, G.C., Randle, L.V., Muiesan, P., Butler, A.J., Currie, I.S., Perera, M.T.P.R., Forsythe, J.L., and Watson, C.J.E. (2014). In situ normothermic regional perfusion for controlled donation after circulatory death--the United Kingdom experience. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *14*, 2846–2854.

OPTN (2018). Organ Procurement and Transplantation Network.

Orandi, B.J., Luo, X., Massie, A.B., Garonzik-Wang, J.M., Lonze, B.E., Ahmed, R., Van Arendonk, K.J., Stegall, M.D., Jordan, S.C., Oberholzer, J., et al. (2016). Survival Benefit with Kidney Transplants from HLA-Incompatible Live Donors. N. Engl. J. Med. *374*, 940–950.

Ortega-Deballon, I., Hornby, L., and Shemie, S.D. (2015). Protocols for uncontrolled donation after circulatory death: a systematic review of international guidelines, practices and transplant outcomes. Crit. Care Lond. Engl. *19*, 268.

Parlement européen et Conseil (2010). Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010. https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022990561&categorieLien=id.

Pessione, F., Cohen, S., Durand, D., Hourmant, M., Kessler, M., Legendre, C., Mourad, G., Noël, C., Peraldi, M.-N., Pouteil-Noble, C., et al. (2003). Multivariate analysis of donor risk factors for graft survival in kidney transplantation. Transplantation *75*, 361–367.

Peyssonnaux, C. (2008). [Hypoxia-inducible transcription factors (HIF): key regulators of iron metabolism?]. Med. Sci. MS *24*, 137–138.

Pinsard, M., Kerforne, T., and Mimoz, O. (2013). Consequences de la mort encephalique et reanimation du donneur d organes.

Pirinen, E., Kuulasmaa, T., Pietilä, M., Heikkinen, S., Tusa, M., Itkonen, P., Boman, S., Skommer, J., Virkamäki, A., Hohtola, E., et al. (2007). Enhanced polyamine catabolism alters homeostatic control of white adipose tissue mass, energy expenditure, and glucose metabolism. Mol. Cell. Biol. *27*, 4953–4967.

Pratschke, J., Wilhelm, M.J., Kusaka, M., Beato, F., Milford, E.L., Hancock, W.W., and Tilney, N.L. (2000). Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors. Ann. Surg. *232*, 263–271.

Prozorovski, T., Schulze-Topphoff, U., Glumm, R., Baumgart, J., Schröter, F., Ninnemann, O., Siegert, E., Bendix, I., Brüstle, O., Nitsch, R., et al. (2008). Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. Nat. Cell Biol. *10*, 385–394.

Radak, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Ohno, H., and Atalay, M. (2013). Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. Antioxid. Redox Signal. *18*, 1208–1246.

Rao, P.S., Merion, R.M., Ashby, V.B., Port, F.K., Wolfe, R.A., and Kayler, L.K. (2007). Renal transplantation in elderly patients older than 70 years of age: results from the Scientific Registry of Transplant Recipients. Transplantation *83*, 1069–1074.

Rapport R.E.I.N. 2016 Rapport R.E.I.N. registre français des traitements de supplénace del'insuffisance rénale chronique. Paris, Agence de la Biomédecine, 2016. https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/rapportrein2016.pdf.

Ratner, L.E., Ciseck, L.J., Moore, R.G., Cigarroa, F.G., Kaufman, H.S., and Kavoussi, L.R. (1995). Laparoscopic live donor nephrectomy. Transplantation *60*, 1047–1049.

Rebolledo, R.A., Hoeksma, D., Hottenrott, C.M.V., Bodar, Y.J.L., Ottens, P.J., Wiersema-Buist, J., and Leuvenink, H.G.D. (2016). Slow induction of brain death leads to decreased renal function and increased hepatic apoptosis in rats. J. Transl. Med. *14*, 141.

Riewald, M., and Ruf, W. (2002). Orchestration of coagulation protease signaling by tissue factor. Trends Cardiovasc. Med. *12*, 149–154.

van Rijt, W.G., van Goor, H., Ploeg, R.J., and Leuvenink, H.G.D. (2014). Erythropoietin-mediated protection in kidney transplantation: nonerythropoietic EPO derivatives improve function without increasing risk of cardiovascular events. Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *27*, 241–248.

Rodriguez-Brotons, A., Bietiger, W., Peronet, C., Langlois, A., Magisson, J., Mura, C., Sookhareea, C., Polard, V., Jeandidier, N., Zal, F., et al. (2016). Comparison of Perfluorodecalin and HEMOXCell as Oxygen Carriers for Islet Oxygenation in an In Vitro Model of Encapsulation. Tissue Eng. Part A *22*, 1327–1336.

Roodnat, J.I., van Riemsdijk, I.C., Mulder, P.G.H., Doxiadis, I., Claas, F.H.J., IJzermans, J.N.M., van Gelder, T., and Weimar, W. (2003). The superior results of living-donor renal transplantation are not completely caused by selection or short cold ischemia time: a single-center, multivariate analysis. Transplantation *75*, 2014–2018.

Rossi, J., Rouleau, L., Tardif, J.-C., and Leask, R.L. (2010). Effect of simvastatin on Kruppel-like factor2, endothelial nitric oxide synthase and thrombomodulin expression in endothelial cells under shear stress. Life Sci. *87*, 92–99.

Ruf, W., and Riewald, M. (2003). Tissue factor-dependent coagulation protease signaling in acute lung injury. Crit. Care Med. *31*, S231-237.

Saito, H. (2013). Toxico-pharmacological perspective of the Nrf2-Keap1 defense system against oxidative stress in kidney diseases. Biochem. Pharmacol. *85*, 865–872.

Salim, A., Martin, M., Brown, C., Rhee, P., Demetriades, D., and Belzberg, H. (2006). The effect of a protocol of aggressive donor management: Implications for the national organ donor shortage. J. Trauma *61*, 429–433; discussion 433-435.

Schaub, M., Ploetz, C.J., Gerbaulet, D., Fang, L., Kranich, P., Stadlbauer, T.H.W., Goettman, U., Yard, B.A., Braun, C., Schnuelle, P., et al. (2004). Effect of dopamine on inflammatory status in kidneys of brain-dead rats. Transplantation *77*, 1333–1340.

Schley, G., Klanke, B., Schödel, J., Forstreuter, F., Shukla, D., Kurtz, A., Amann, K., Wiesener, M.S., Rosen, S., Eckardt, K.-U., et al. (2011). Hypoxia-inducible transcription factors stabilization in the thick ascending limb protects against ischemic acute kidney injury. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *22*, 2004–2015.

Schnuelle, P., Berger, S., de Boer, J., Persijn, G., and van der Woude, F.J. (2001). Effects of catecholamine application to brain-dead donors on graft survival in solid organ transplantation. Transplantation *72*, 455–463.

Schuurs, T.A., Gerbens, F., van der Hoeven, J.A.B., Ottens, P.J., Kooi, K.A., Leuvenink, H.G.D., Hofstra, R.M.W., and Ploeg, R.J. (2004). Distinct transcriptional changes in donor kidneys upon brain death induction in rats: insights in the processes of brain death. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *4*, 1972–1981.

Schuurs, T.A., Morariu, A.M., Ottens, P.J., 't Hart, N.A., Popma, S.H., Leuvenink, H.G.D., and Ploeg, R.J. (2006). Time-dependent changes in donor brain death related processes. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *6*, 2903–2911.

Schwarz, C., Regele, H., Steininger, R., Hansmann, C., Mayer, G., and Oberbauer, R. (2001). The contribution of adhesion molecule expression in donor kidney biopsies to early allograft dysfunction. Transplantation *71*, 1666–1670.

Scotton, C.J., Krupiczojc, M.A., Königshoff, M., Mercer, P.F., Lee, Y.C.G., Kaminski, N., Morser, J., Post, J.M., Maher, T.M., Nicholson, A.G., et al. (2009). Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. J. Clin. Invest. *119*, 2550–2563.

Sevastos, J., Kennedy, S.E., Davis, D.R., Sam, M., Peake, P.W., Charlesworth, J.A., Mackman, N., and Erlich, J.H. (2007). Tissue factor deficiency and PAR-1 deficiency are protective against renal ischemia reperfusion injury. Blood *109*, 577–583.

Shockcor, N.M., Sultan, S., Alvarez-Casas, J., Brazio, P.S., Phelan, M., LaMattina, J.C., and Barth, R.N. (2018). Minimally invasive donor nephrectomy: current state of the art. Langenbecks Arch. Surg.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. Eur. J. Biochem. *215*, 213–219.

Skrabal, C.A., Thompson, L.O., Potapov, E.V., Southard, R.E., Joyce, D.L., Youker, K.A., Noon, G.P., and Loebe, M. (2005). Organ-specific regulation of pro-inflammatory molecules in heart, lung, and kidney following brain death. J. Surg. Res. *123*, 118–125.

Smith, K.D., Wrenshall, L.E., Nicosia, R.F., Pichler, R., Marsh, C.L., Alpers, C.E., Polissar, N., and Davis, C.L. (2003). Delayed graft function and cast nephropathy associated with tacrolimus plus rapamycin use. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *14*, 1037–1045.

Stallons, L.J., Funk, J.A., and Schnellmann, R.G. (2013). Mitochondrial Homeostasis in Acute Organ Failure. Curr. Pathobiol. Rep. *1*.

Stiegler, P., Sereinigg, M., Puntschart, A., Bradatsch, A., Seifert-Held, T., Wiederstein-Grasser, I., Leber, B., Stadelmeyer, E., Dandachi, N., Zelzer, S., et al. (2013). Oxidative stress and apoptosis in a pig model of brain death (BD) and living donation (LD). J. Transl. Med. *11*, 244.

Stojanovic, T., Gröne, H.J., Gieseler, R.K., Klanke, B., Schlemminger, R., Tsikas, D., and Gröne, E.F. (1996). Enhanced renal allograft rejection by inhibitors of nitric oxide synthase: a nonimmunologic influence on alloreactivity. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *74*, 496–512.

Strande, J.L., Hsu, A., Su, J., Fu, X., Gross, G.J., and Baker, J.E. (2007). SCH 79797, a selective PAR1 antagonist, limits myocardial ischemia/reperfusion injury in rat hearts. Basic Res. Cardiol. *102*, 350–358.

Suzuki, H., Motley, E.D., Eguchi, K., Hinoki, A., Shirai, H., Watts, V., Stemmle, L.N., Fields, T.A., and Eguchi, S. (2009). Distinct roles of protease-activated receptors in signal transduction regulation of endothelial nitric oxide synthase. Hypertens. Dallas Tex 1979 *53*, 182–188.

Tabriziani, H., Lipkowitz, M.S., and Vuong, N. (2018). Chronic kidney disease, kidney transplantation and oxidative stress: a new look to successful kidney transplantation. Clin. Kidney J. *11*, 130–135.

Takada, M., Nadeau, K.C., Hancock, W.W., Mackenzie, H.S., Shaw, G.D., Waaga, A.M., Chandraker, A., Sayegh, M.H., and Tilney, N.L. (1998). Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. Transplantation *65*, 1533–1542.

Territo, A., Mottrie, A., Abaza, R., Rogers, C., Menon, M., Bhandari, M., Ahlawat, R., and Breda, A. (2017). Robotic kidney transplantation: current status and future perspectives. Minerva Urol. E Nefrol. Ital. J. Urol. Nephrol. *69*, 5–13.

Tillet, S., Giraud, S., Kerforne, T., Saint-Yves, T., Joffrion, S., Goujon, J.-M., Cau, J., Mauco, G., Petitou, M., and Hauet, T. (2016). Inhibition of coagulation proteases Xa and IIa decreases ischemia-reperfusion injuries in a preclinical renal transplantation model. Transl. Res. J. Lab. Clin. Med. *178*, 95-106.e1.

Tonelli, M., Wiebe, N., Knoll, G., Bello, A., Browne, S., Jadhav, D., Klarenbach, S., and Gill, J. (2011). Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *11*, 2093–2109.

Troppmann, C., Gillingham, K.J., Benedetti, E., Almond, P.S., Gruessner, R.W., Najarian, J.S., and Matas, A.J. (1995). Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. Transplantation *59*, 962–968.

Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. *552*, 335–344.

Valero, R., Cabrer, C., Oppenheimer, F., Trias, E., Sánchez-Ibáñez, J., De Cabo, F.M., Navarro, A., Paredes, D., Alcaraz, A., Gutiérrez, R., et al. (2000). Normothermic recirculation reduces primary graft dysfunction of kidneys obtained from non-heart-beating donors. Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *13*, 303–310.

Viklický, O., Zou, H., Müller, V., Lacha, J., Szabó, A., and Heemann, U. (2000). SDZ-RAD prevents manifestation of chronic rejection in rat renal allografts. Transplantation *69*, 497–502.

Viklický, O., Bohmová, R., Ouyang, N., Honsová, E., Lodererová, A., Mandys, V., Vítko, S., Lutz, J., and Heemann, U.W. (2004). Effect of sirolimus on renal ischaemia/reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats. Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *17*, 432–441.

Vos, I.H.C., Joles, J.A., and Rabelink, T.J. (2004). The role of nitric oxide in renal transplantation. Semin. Nephrol. *24*, 379–388.

Wagner, M., Cadetg, P., Ruf, R., Mazzucchelli, L., Ferrari, P., and Redaelli, C.A. (2003). Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. Kidney Int. *63*, 1564–1573.

Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W., and Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 2040–2045.

Wang, W., Koka, V., and Lan, H.Y. (2005). Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. Nephrol. Carlton Vic *10*, 48–56.

Wardman, P., and Candeias, L.P. (1996). Fenton chemistry: an introduction. Radiat. Res. *145*, 523–531.

Wolfe, R.A., Ashby, V.B., Milford, E.L., Ojo, A.O., Ettenger, R.E., Agodoa, L.Y., Held, P.J., and Port, F.K. (1999). Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. N. Engl. J. Med. *341*, 1725–1730.

Wu, S., Zhou, F., Zhang, Z., and Xing, D. (2011). Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins. FEBS J. *278*, 941–954.

Yadav, R.B., Burgos, P., Parker, A.W., Iadevaia, V., Proud, C.G., Allen, R.A., O'Connell, J.P., Jeshtadi, A., Stubbs, C.D., and Botchway, S.W. (2013). mTOR direct interactions with Rheb-GTPase and raptor: sub-cellular localization using fluorescence lifetime imaging. BMC Cell Biol. *14*, 3.

Yalcin, S., Marinkovic, D., Mungamuri, S.K., Zhang, X., Tong, W., Sellers, R., and Ghaffari, S. (2010). ROS-mediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3(-/-) mice. EMBO J. *29*, 4118–4131.

Yang, B., Jain, S., Pawluczyk, I.Z.A., Imtiaz, S., Bowley, L., Ashra, S.Y., and Nicholson, M.L. (2005). Inflammation and caspase activation in long-term renal ischemia/reperfusion injury and immunosuppression in rats. Kidney Int. *68*, 2050–2067.

Yang, Y., Fu, W., Chen, J., Olashaw, N., Zhang, X., Nicosia, S.V., Bhalla, K., and Bai, W. (2007). SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. Nat. Cell Biol. *9*, 1253–1262.

Yokoyama, Y., Beckman, J.S., Beckman, T.K., Wheat, J.K., Cash, T.G., Freeman, B.A., and Parks, D.A. (1990). Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. Am. J. Physiol. *258*, G564-570.

Yoshihara, H.A.I., Bastiaansen, J.A.M., Berthonneche, C., Comment, A., and Schwitter, J. (2015). An intact small animal model of myocardial ischemia-reperfusion: Characterization of metabolic changes by hyperpolarized 13C MR spectroscopy. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. *309*, H2058-2066.

Young, I.S., and Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. J. Clin. Pathol. *54*, 176–186.

Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. Cell *144*, 757–768.