

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2021

N° 79

MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES

Spécialité Biologie Médicale

TENANT LIEU DE THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

M. Hugo ALARCAN, né le 08/10/1993 à Niort (79)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 24 SEPTEMBRE 2021

« EVALUATION DU CONTENU METABOLOMIQUE DU LIQUIDE DE PERFUSION ET
DE L'EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE TRANSPORTEURS TUBULAIRES
LORS DE LA CONSERVATION DE GREFFONS RENAUX SUR MACHINE A
PERFUSION HYPOTHERMIQUE »

JURY

Président : Pr Patrick Emond, pharmacien, PU-PH, Faculté de pharmacie - Tours

Membres :

Pr Hélène Blasco, pharmacien, PU-PH, Faculté de médecine - Tours

Pr Pierre Marquet, médecin, PU-PH, Faculté de médecine - Limoges

Dr Chantal Barin-Le Guellec, pharmacien, MCU-PH, Faculté de médecine - Tours

ANNEE : 2021 - 2022

Directrice : Pr Véronique MAUPOIL

Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS

Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN

ENSEIGNANTS

12 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUDESOCQUE-DELAJE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

7 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAUDAU	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistiques & ÉPIDÉMIOLOGIE
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHÉMATIQUES
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

37 MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUVIN-PLY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAJE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
LOUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

2 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
RESPAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

2 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

1 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

HILALI	Soukaïna	PHARMACOGNOSIE
--------	----------	----------------

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date : 24/08/2021

L' tudiant

M ALARCAN Hugo

Le Doyen de la Faculté

Professeur Véronique Maupoil

Remerciements :

*

Je tiens à remercier tout d'abord le professeur Patrick Emond pour me faire l'honneur de présider ce jury, ainsi que pour avoir accepté d'être le codirecteur de ma thèse d'exercice et de juger ce travail en apportant son expertise biologique et scientifique.

J'adresse tous mes remerciements au professeur Pierre Marquet pour avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie également de m'avoir accueilli au sein de votre unité de recherche pour réaliser ce projet, où nous avons pu bénéficier de vos conseils et de votre soutien. Je vous suis pareillement reconnaissant de m'avoir permis d'effectuer mon inter-CHU au sein de votre service hospitalier où j'ai pu découvrir la pharmacologie et m'initier à la validation du NGS en pharmacogénétique.

Un grand merci également au Professeur Hélène Blasco pour avoir accepté de juger ce travail et m'avoir initié aux outils statistiques utilisés ici. Je te remercie également d'avoir accepté de m'encadrer pour ma thèse universitaire et pour tous les projets scientifiques auxquels tu m'associes.

Mes plus grands remerciements vont au Dr Chantal Barin-Le Guellec. Tout d'abord, merci de m'avoir confié la réalisation de ce projet et d'en avoir assuré la direction. Mais je te remercie surtout de m'avoir encadré tout au long de cette maquette d'internat et d'avoir confirmé mon souhait de me spécialiser en pharmacogénétique. Merci encore de m'avoir donné toutes ces opportunités et fais découvrir le monde de la recherche. Tu as déployé beaucoup d'énergie pour mon année recherche et m'assurer une place post-internat avant ton départ au Canada et je t'en suis infiniment reconnaissant.

**

Mes remerciements vont également aux membres de l'équipe Inserm 1248 de Limoges, qui ont pu m'aider de près ou de loin à la réalisation de ce projet, et notamment Hélène, François-Ludovic, Lionel, Roland, Jean-Baptiste ou bien encore Florent. Et je remercie bien sûr Quentin avec qui nous avons travaillé ensemble sur toute la durée de ce projet (et travaillons encore).

Je remercie également le professeur Christian Andres pour m'avoir permis d'intégrer le service de biochimie, en tant qu'interne et prochainement en tant qu'assistant hospitalo-universitaire.

Merci à toi, Charlotte, de partager avec moi la validation de la pharmacogénétique, pour tes conseils en biologie moléculaire et les responsabilités que tu me donnes, mais aussi pour ces moments de discussion avec Jean-Baptiste, que je remercie également. J'en profite pour remercier également tout le personnel du service de biochimie et particulièrement les techniciens des secteurs de biologie moléculaire et d'HPLC à qui j'en demande beaucoup.

Je remercie également les internes que j'ai pu côtoyer au sein de mon internat, dont certains sont devenus de vrais amis. Je remercie notamment Coralie, Wayne-Corentin, Brice, Olivier, Camille, Joévin, Anne, Yannis, Alexandre, Clément, les deux Thomas, Lisa, Romane, Pierre mais également tous les autres. Et bien sûr Gauvin, même si tu as fait de notre précieux fils un voyou pendant mon séjour à Limoges.

Enfin, même si ce n'est pas l'endroit le plus adéquat, mais parce que je ne les remercie jamais assez, merci à mes parents et à ma sœur pour leur soutien moral constant.

Et merci à toute autre personne lisant ce document, en vous souhaitant une bonne lecture.

Table des matières :

I. Introduction :	1
1. Lésions d'ischémie-reperfusion	1
2. Conservation des greffons par machine à perfusion	2
3. Potentiel de la métabolomique	3
4. Ischémie et transporteurs tubulaires proximaux	6
5. Objectifs du travail	12
II. Matériel et méthodes	13
1. Sélection des patients et prélèvement des échantillons	13
2. Réactifs	14
3. Détermination du contenu métabolique des liquides de perfusion	14
4. Expression transcriptionnelle des transporteurs tubulaires	15
5. Analyse statistique	16
III. Résultats	19
1. Données démographiques des couples donneurs-receveurs	19
2. Détermination des profils métabolomiques et de l'expression des transporteurs	21
3. Impact de la durée de perfusion	23
4. Corrélation entre expression des transporteurs et profils métabolomiques	27
5. Reprise de la fonction du greffon	28
IV. Discussion	31
1. Maintien d'une activité métabolique lors de la conservation sur HMP	31
2. Modifications liées à la durée de perfusion	32
3. Faible corrélation entre transporteurs et métabolites	33
4. Mauvaise prédiction de la reprise de fonction du greffon	35
V. Conclusion	37
VI. Bibliographie	38

Liste des figures :

Figure 1 : Principe de la conservation des greffons par HMP.	3
Figure 2 : Métabolites significativement corrélés à la durée de perfusion dans l'étude de Bon et al.	5
Figure 3 : Principaux mécanismes de réabsorption et sécrétion via les transporteurs à travers la cellule tubulaire proximale.	7
Figure 4: Impact de l'altération des transporteurs tubulaires sur l'élimination de leurs substrats.	9
Figure 5 : Métabolites dont les valeurs diffèrent significativement en fonction de la durée de perfusion des greffons, d'après l'analyse univariée.	24
Figure 6: Analyse multivariée des profils métabolomiques des liquides de perfusion, en fonction de la durée de perfusion des greffons.	26
Figure 7: Analyse multivariée de l'expression transcriptionnelle des transporteurs en fonction de la durée de perfusion.	27
Figure 8 : CIM de la relation entre transporteurs et métabolites par régression PLS.	28
Figure 9 : Evaluation des profils métabolomiques des liquides de perfusion en tant que biomarqueur prédictif de la reprise de fonction du greffon.	29
Figure 10 : Evaluation de l'expression transcriptionnelle des transporteurs tubulaires en tant que biomarqueur prédictif de la reprise de fonction du greffon.	30

Liste des tableaux :

Tableau I : Caractéristiques des donneurs, receveurs et des conditions de perfusion.	20
Tableau II: Contenu métabolomique des perfusats et du KPS-1® initial.	22

Liste des abréviations :

ABC : ATP Binding Cassette

ADNc : ADN complémentaire

AFA : Alcool Formolé Acétique

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BCRP : Breast Cancer Resistance Protein

CGD : Chronic Graft Dysfunction

CHR : Centre Hospitalier Régional

CHRU : Centre Hospitalier Régional
Universitaire

CIM : Clustered Image Map

Ct : Cycle treshold

CV : Cross-Validation

DGF : Delayed Graft Function

ECD : extended criteria donors

FDR : False discovery rate

GLUT : Transporteur de Glucose

HMP : Hypothermic Machine Perfusion

HTA : Hypertension artérielle

IRC : Insuffisance rénale chronique

IR : Ischemia-Reperfusion

IRI : Ischemia-Reperfusion Injury

LC-MS/MS : Chromatographie en phase
liquide couplée à la spectrométrie de masse
en tandem

MATE : Multidrug And Toxin compound
Extrusion

MRM : Multi Reaction Monitoring

MRP : Multidrug Resistance associated
Protein

NaDC: Co-transporteur Na^+ /Di-
tricarboxylate

NBCe1 : electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$
cotransporter 1

NHE3 : Na^+/H^+ exchanger 3

OAT: Organic Anion Transporteur

OCT : Organic Cation Transporter

OCTN : Organic Zwitterion/Cation
Protein

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCA : Principal Component Analysis

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEPT : Peptide Transporter

P-gp : P glycoprotein

PLS : Partial Least Squares

PLS-DA : PLS Discriminant Analysis

PNF : Primary non function

RF : Random Forest

RIN : RNA Integrity Number

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire

ROS : Reactive Oxygen Species

SCS : Static Cold Storage

SGLT : cotransporteur Na^+ /glucose

SLC : Solute Carriers

SPME : Solid Phase Microextraction

TEA : Tétréthylammonium

TLDA : Taqman® Low-Density Array

VIP : Variable Importance in Projection

I. Introduction :

La transplantation rénale est un traitement de choix pour les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique (IRC) terminale. Selon les prévisions de l'organisation mondiale de la santé (OMS), le taux de décès liés aux pathologies rénales va continuer de croître pour atteindre 27 morts pour 100 000 personnes d'ici 2060 (1). Une pénurie d'organes est observée en France : chaque année, le nombre de nouveaux inscrits sur liste d'attente d'une greffe rénale (5545 en 2019) est supérieur au nombre de greffes réalisées (3643 cette même année) entraînant une augmentation croissante du nombre de candidats à une transplantation rénale (8642 au 1^{er} janvier 2020) (2). En conséquence de l'augmentation de l'incidence des pathologies rénales, l'écart entre la demande d'organes et le nombre limité de donneurs va continuer d'augmenter, renforçant encore la pénurie actuelle.

Pour lutter contre cette pénurie, les centres hospitaliers se voient contraints d'élargir les critères d'acceptabilité des organes, en admettant le prélèvement d'organes issus de donneurs décédés après arrêt cardiaque ou de donneurs dits à critères élargis (*extended criteria donors*, ECD). Rentrent dans cette dernière catégorie les donneurs présentant des facteurs associés à un risque accru de perte du greffon : donneurs âgés de plus de 60 ans, ou donneurs de 50 à 59 ans et présentant au moins deux des trois critères suivants : antécédent d'hypertension artérielle (HTA), décès par accident vasculaire cérébral, créatininémie > 1,5 mg/dL. Malheureusement, les reins issus de tels donneurs sont plus sensibles à l'un des facteurs majeurs impliqués dans la qualité de reprise de fonction du greffon en post-transplantation : les lésions d'ischémie-reperfusion (*Ischemia-Reperfusion (IR) Injury (IRI)*) (3).

1. Lésions d'ischémie-reperfusion

Entre le moment du prélèvement chez le donneur et la réimplantation chez le receveur, les organes sont conservés dans un liquide de conservation et subissent alors une période d'ischémie appelée ischémie froide. Préalablement à cela, au moment du prélèvement, le clampage des artères rénales entraîne une période d'ischémie chaude, pouvant durer quelques minutes. Durant ces deux périodes d'ischémie, des lésions vont être initiées, qui seront aggravées lors de la reperfusion du greffon ; on parle alors de lésions d'ischémie-reperfusion.

Chacune des périodes d'ischémie et de reperfusion est caractérisée par l'apparition de phénomènes physio-pathologiques différents au sein du greffon. Pendant la phase d'ischémie, les cellules endothéliales et tubulaires sont les premières à souffrir du manque d'oxygène. L'hypoxie résultante entraîne en effet une déviation du métabolisme aérobie vers un métabolisme anaérobie, menant à une déplétion en adénosine triphosphate (ATP), à la formation de radicaux superoxydes, ainsi qu'à une déstabilisation des membranes mitochondriales et cellulaires. Dans un tel contexte, la restauration de la circulation au cours de la reperfusion entraîne la production d'espèces oxygénées réactives (*reactive oxygen species*, ROS), responsables de dommages oxydatifs ainsi que d'une exacerbation de la réaction inflammatoire. Ces phénomènes vont éventuellement mener à une mort cellulaire par nécrose ou apoptose. Les composants cytoplasmiques libérés par la mort des cellules peuvent être à l'origine d'une réaction inflammatoire ainsi que de l'activation des réponses immunitaires innée et adaptative. À moyen terme, les mécanismes de réparation ainsi que les phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse pourront être responsables de l'apparition d'une fibrose interstitielle (4–6).

L'IRI peut donc avoir des conséquences préjudiciables sur la survie du greffon, à court ou à long terme, via l'induction d'une non fonction primaire (*Primary Non Function* (PNF)), d'un retard à la reprise de fonction (*Delayed Graft Function* (DGF)), d'un rejet aigu de greffe, ou bien encore d'une dysfonction chronique du greffon (*Chronic Graft Dysfunction* (CGD)), via une fibrose interstitielle progressive (7).

2. Conservation des greffons rénaux par machine à perfusion

Afin de limiter le risque accru de retard à la reprise de fonction des greffons issus de donneurs à critères ECD, il est préconisé de conserver ces organes via une machine à perfusion hypothermique (*Hypothermic machine perfusion*, HPM) (**Figure 1**). Par rapport à la conservation statique, la conservation sur machine à perfusion des reins issus de donneurs ECD est en effet associée à une réduction significative du risque de reprise retardée de fonction du greffon rénal, ainsi qu'à une amélioration de la survie à 3 ans (8). Cependant, les mécanismes cellulaires opérant au cours de la conservation des organes dans cet environnement *ex vivo*, hypoxique et hypothermique restent mal connus. De plus, il n'existe actuellement pas de biomarqueur fiable et reproductible permettant d'évaluer la qualité du greffon au cours de cette période préimplantatoire. Ainsi, la décision de réaliser ou non la transplantation de greffons conservés via les machines à perfusion repose actuellement au

Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Tours sur les paramètres mesurés par la machine, et en particulier l'indice de résistance. Certaines équipes se basent également sur l'évaluation anatomopathologique d'une biopsie préimplantatoire mais il s'agit d'un examen invasif, opérateur-dépendant et qui reste peu corrélé à la reprise de fonction du greffon. La découverte de biomarqueurs non invasifs des lésions subies par le greffon pendant sa conservation sur machine à perfusion, permettant l'évaluation pré-implantatoire de leur qualité, contribuerait à une meilleure sélection des greffons transplantables et à une meilleure prise en charge des patients après transplantation.

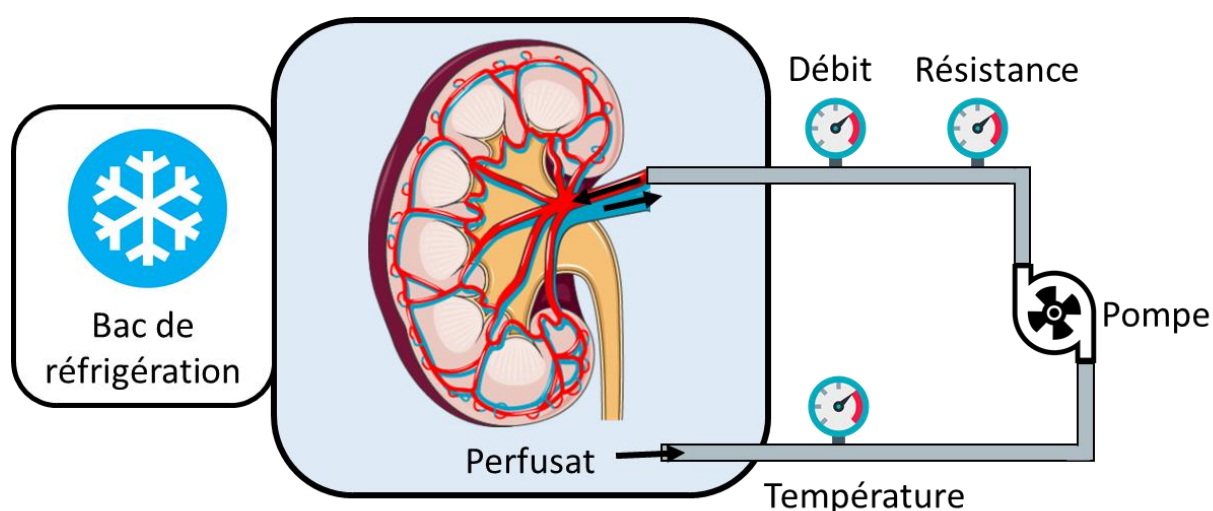


Figure 1 : Principe de la conservation des greffons par HMP.

L'HMP permet la perfusion hypothermique des greffons rénaux. Le greffon est immergé partiellement dans le perfusat. La pompe permet de faire circuler le liquide de conservation à travers la tubulure jusqu'au rein. Le perfusat pénètre alors dans le rein par l'artère rénale connectée à la tubulure, circule dans l'organe puis ressort par la veine rénale. Le bac de réfrigération permet le maintien du greffon et du liquide de conservation en dessous de 4°C. Le débit, la température et l'indice de résistance sont mesurés tout au long de la conservation de l'organe. Les illustrations ont été conçues en utilisant Servier Medical Art par Servier sous licence CC BY 3.0 (<https://smart.servier.com>).

3. Potentiel de la métabolomique

Une des approches pouvant permettre non seulement une meilleure compréhension des phénomènes induits par l'ischémie lors de la conservation des greffons par HMP, mais aussi la découverte de biomarqueurs prédictifs de la reprise de fonction du greffon est la détermination du contenu métabolique du liquide de perfusion (9). En effet, la métabolomique consiste à analyser l'ensemble des métabolites présents dans un milieu, ce qui permet de décrire un état physiopathologique et d'en déduire les mécanismes impliqués les plus pertinents. Très peu d'études ont été menées en ce sens concernant la conservations de reins

sur HMP et leurs résultats, bien que prometteurs, sont peu reproductibles et nécessitent d'être confirmés (10).

En 2014, Nath *et al.* ont déterminé par résonnance magnétique nucléaire (RMN) du proton les profils métaboliques de liquides de perfusion de reins humains et porcins conservés sur HMP. Les mesures ont été effectuées 45 min et 4 heures après le début de la conservation (11). En plus de démontrer que le porc représente un bon modèle animal, ils ont également observé des variations de concentrations de certains métabolites entre les différents temps de perfusion. Ils ont notamment pu mettre en évidence une diminution des niveaux de glutathion, ainsi qu'une augmentation du lactate, d'acides aminés (glycine, glutamate, alanine), de 3-hydroxy-butyrate et de purines (inosine, hypoxanthine) après 4 heures de perfusion. Dans un modèle d'auto-transplantation chez le porc, après détermination répétée des profils métaboliques (également par RMN) sur une période plus étendue (de 5 min à 22 h), Bon *et al.* ont retrouvé de façon similaire une diminution des concentrations de glutathion au cours de la perfusion, ainsi qu'une élévation des concentrations de lactate, de glycine, glutamate et alanine, mais également de valine et de triméthylamine-N-oxide (**Figure 2**) (12). De plus, les valeurs de certains métabolites à 12 heures de conservation étaient corrélées avec la créatininémie 3 mois après la transplantation, de façon négative (glutathion) ou positive (valine, alanine, glutamate, glycine).

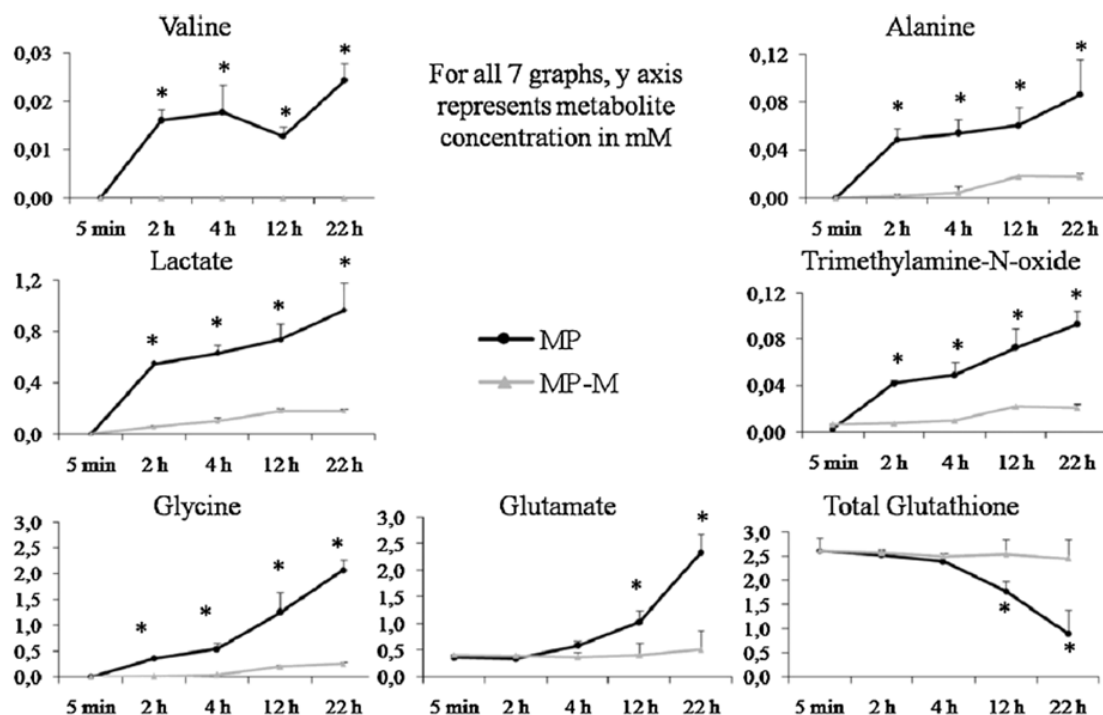


Figure 2 : Métabolites significativement corrélés à la durée de perfusion dans l'étude de Bon *et al* (12).

Les concentrations (en mM) représentées en ordonnée ont été déterminées par RMN et les différents temps de perfusion (5 min, 2h, 4h, 12h, et 22h) sont représentés en abscisse. Les traits noirs et gris représentent les conditions avec ou sans supplémentation du KPS-1® par du Mélagatran, respectivement.

*Résultat significatif ($p < 0,05$)

Chez l'homme, une étude similaire a été réalisée par Guy *et al.* en 2015 à partir d'une cohorte de 26 greffons humains conservés sur HMP, et de la détermination des profils métabolomiques des liquides de perfusion, toujours par RMN, à 45 min et 4 h de conservation (13). Une diminution des concentrations de glutathion, mais aussi de valine (également diminuée entre 2 et 12 h dans l'étude de Bon *et al.*, d'après la **Figure 2**) a été retrouvé ainsi qu'une augmentation de 16 métabolites (comme le lactate, des acide aminés ou des intermédiaires du cycle de Krebs) entre les différents temps. Ces profils ont également été comparés à la composition initiale du liquide de perfusion (KPS-1®), montrant que 22 métabolites retrouvés, absents des constituants listés dans le KPS-1®, ont été relargués par les greffons au cours de la conservation. De plus, une diminution du gluconate, du glucose et de l'inosine, ainsi qu'une augmentation de leucine ont été retrouvées chez les patients ayant eu une DGF comparé à ceux ayant eu une IGF, suggérant l'intérêt de ces métabolites en tant que biomarqueurs potentiels de la reprise de fonction du greffon.

Ces études confirment un impact de l'ischémie sur le métabolisme rénal et montrent que la métabolomique peut permettre de découvrir de potentiels biomarqueurs prédictifs de la

reprise d'activité du greffon en post-transplantation. Elles révèlent néanmoins que les métabolites identifiés varient en fonction du modèle utilisé (espèce, temps de prélèvement des liquides) et que la conduite d'autres études est nécessaire pour renforcer ces hypothèses.

Un grand nombre de biomarqueurs potentiels mis en lumière par ces études sont physiologiquement réabsorbés ou sécrétés par des transporteurs membranaires spécifiques localisés principalement au niveau des tubules contournés proximaux. L'impact de l'ischémie sur les variations de concentration des métabolites et la reprise de fonction du greffon, outre les modifications du métabolisme intracellulaire, pourraient également être en partie due à des variations d'activité de ces transporteurs, comme nous l'avons récemment suggéré dans une revue de la littérature (14).

4. Ischémie et transporteurs tubulaires proximaux

Le tubule contourné proximal joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie globale, par la réabsorption de composants vitaux pour l'organisme, ainsi que par la sécrétion de composés endogènes ou exogènes en excès, de substances toxiques (notamment les toxines urémiques) ou bien encore de nombreux médicaments ou leurs métabolites. Les cellules tubulaires proximales présentent un pôle basolatéral constitué d'une membrane basale, en contact avec la circulation systémique, ainsi qu'un pôle apical présentant une bordure en brosse constituée de microvillosités dirigées vers la lumière tubulaire. Le transfert bidirectionnel de substances au niveau des cellules tubulaires fait intervenir de multiples transporteurs membranaires, appartenant principalement à deux familles : les *Solute Carriers* (SLC) et les *ATP Binding Cassette* (ABC). Les principaux mécanismes de réabsorption et de sécrétion transporteur-dépendant survenant au niveau des cellules tubulaires proximales sont décrits dans la **Figure 3**. Brièvement, le gradient de Na^+ généré par la pompe Na^+/K^+ -ATPase est essentiel à la réabsorption de nombreux composés tels que le phosphate, le glucose ou encore des acides aminés via des cotransporteurs Na^+ -dépendants. Certains transporteurs sont également impliqués dans le maintien de l'équilibre acido-basique par échanges d'ions H^+ ou HCO_3^- . Les substances toxiques, endogènes ou exogènes, sont majoritairement éliminées par deux voies différentes, selon qu'elles sont anioniques ou cationiques, via l'action coordonnée de transporteurs spécifiques qui captent ces molécules depuis la circulation systémique au niveau basolatéral et les relarguent dans les urines au niveau apical.

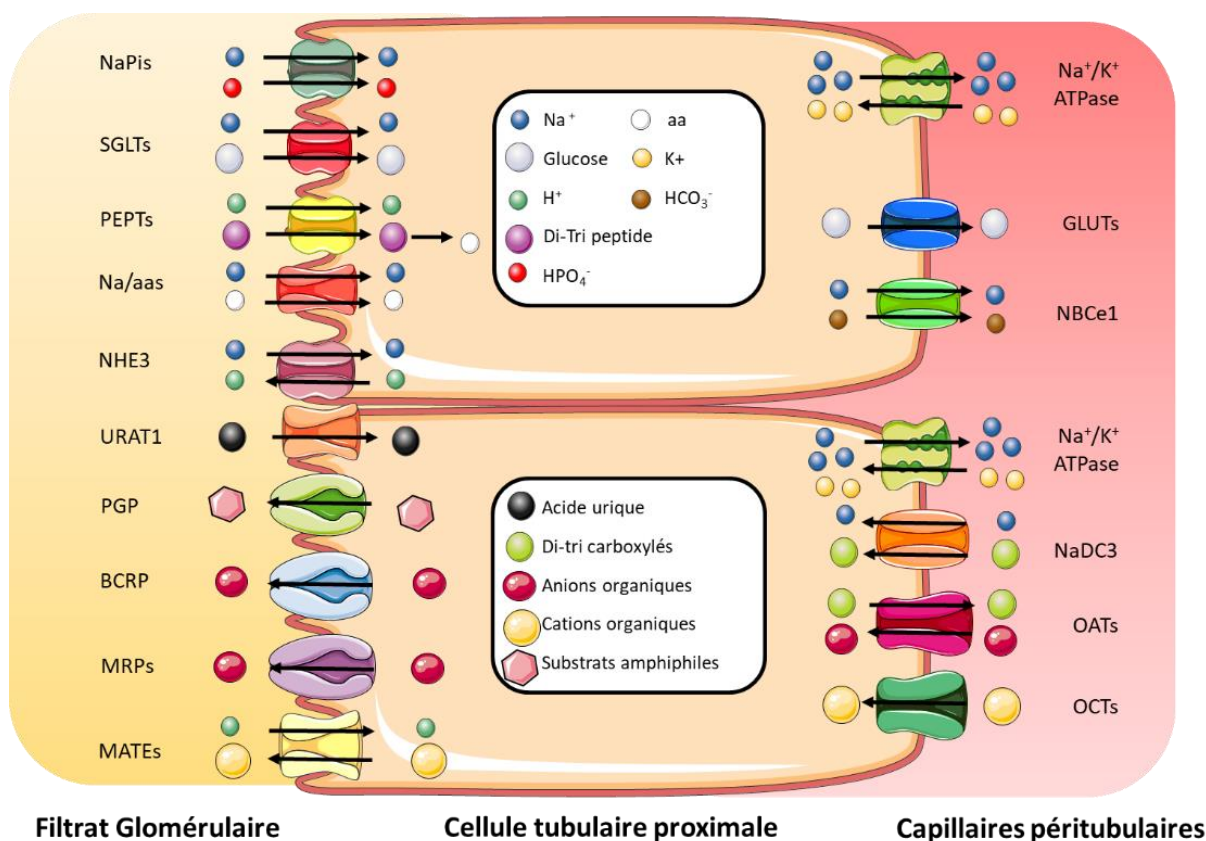


Figure 3 : Principaux mécanismes de réabsorption et sécrétion via les transporteurs à travers la cellule tubulaire proximale.

Réabsorption de composés vitaux : La pompe Na^+/K^+ -ATPase au niveau basolatéral génère un gradient de réabsorption du sodium au niveau apical, permettant le cotransport de nombreuses substances. Ce phénomène permet la réabsorption du phosphate au niveau apical grâce aux co-transporteurs NaPi-IIa et NaPi-IIc (15–17), du glucose via les co-transporteurs $\text{Na}^+/\text{glucose}$ (SGLT1 et SGLT2) apicaux et les transporteurs de glucose (GLUT1 et GLUT2) basolatéraux (18,19), des acides aminés via de nombreux co-transporteurs $\text{Na}^+/\text{acides aminés}$ (20). Na^+/H^+ échangeur 3 (NHE3), apical et l'électrogénic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporteur 1 (NBCe1), basolatéral, participent à l'équilibre acidobasique (21–23). Les di et tripeptides sont réabsorbés par des Peptide Transporters (PEPT1 et PEPT2) via un cotransport avec les ions H^+ (24), et l'acide urique est réabsorbé par l'urate transporter 1 (URAT1). **Élimination des anions organiques :** Ils sont captés via les Organic Anion Transporters (OAT1 et OAT3) basolatéraux en échange de molécules di ou tricarboxylées (l' α -cétoglutarate, le succinate et le citrate, intermédiaires du cycle de Krebs), eux-mêmes entrés dans la cellule grâce au co-transporteur $\text{Na}^+/\text{Di-tricarboxylate}$ (NaDC3) basolatéral ou au co-transporteur NaDC1 apical (25). Ils vont ensuite être sécrétés via les transporteurs d'efflux de la famille ABC Multidrug Resistance associated Proteins (MRP2, MRP4) et la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) apicaux (26). **Élimination des cations organiques :** Ils sont captés au niveau basolatéral via les Organic Cation Transporters (OCT1 et OCT2) et les Organic zwitterion/cation Transporters (OCTN1, OCTN2), puis éliminés par les Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE1 et MATE2) via une activité H^+ -dépendante (27). La P glycoprotéine (P-gp), apicale, contribue également à la sécrétion de substrats endogènes ou exogènes variés, tels que des stéroïdes, des peptides cycliques ou linéaires ou divers médicaments dont certains agents anticancéreux (28). Les illustrations ont été conçues en utilisant Servier Medical Art par Servier sous licence CC BY 3.0 (<https://smart.servier.com>).

La fonction des transporteurs tubulaires rénaux est donc essentielle aux échanges de substrats nécessaires au métabolisme et à la viabilité de l'organe lui-même, ainsi qu'à la régulation de l'homéostasie métabolique globale et à la clairance rénale de divers substrats,

qu'ils soient endogènes ou exogènes. Ainsi, toute altération de fonction des transporteurs au cours de la transplantation rénale se traduira potentiellement par une dysfonction de l'organe et donc des risques pour le patient receveur.

a. Impact des lésions d'IR sur le système de transport tubulaire rénal

Les tubules contournés proximaux sont particulièrement sensibles aux lésions d'ischémie-reperfusion et celles-ci vont être responsables d'altérations structurales et fonctionnelles touchant la cellule tubulaire rénale. Parmi les principales altérations existent une perte de polarité et une dégradation de la bordure en brosse (29), un remodelage du cytosquelette d'actine (30) et une déplétion intracellulaire en ATP en lien avec la perturbation des fonctions mitochondriales (6). Ces phénomènes altèrent la capacité des cellules tubulaires proximales à assurer les échanges transcellulaires bidirectionnels. En effet, sans ATP, la pompe Na^+/K^+ -ATPase ne peut pas fonctionner (5). L'altération de la réabsorption du Na^+ sera à l'origine d'une rupture du gradient de concentration qui permet l'entrée de Na^+ dans la cellule au niveau apical. En conséquence directe, la fonction de nombreux co-transporteurs liés au Na^+ sera altérée, comme par exemple celle du co-transporteur $\text{Na}^+/\text{Di-tricarboxylate 3}$ (NaDC3) entraînant une diminution de l'entrée des intermédiaires du cycle de Krebs dans la cellule rénale, ainsi que celle d'autres co-transporteurs qui permettent normalement la réabsorption de nombreux composés (31,32). Une diminution de l'activité des transporteurs tubulaires rénaux pourra également mener à une accumulation systémique de métabolites endogènes en excès, de toxines urémiques ou de médicaments (dans le cas d'une altération des transporteurs basolatéraux), ou à leur accumulation intra-rénale (dans le cas d'une altération des transporteurs apicaux) (**Figure 4**).

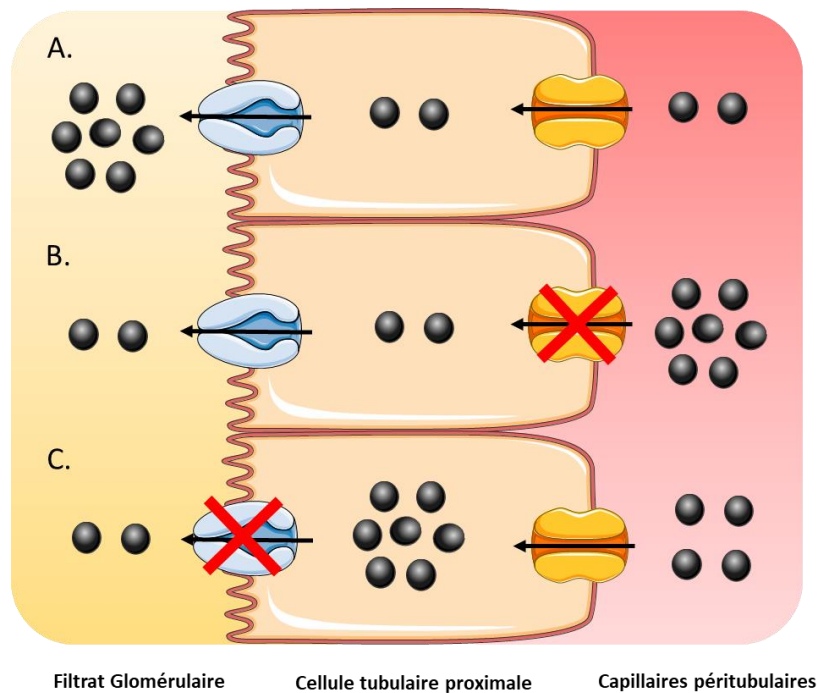


Figure 4: Impact de l'altération des transporteurs tubulaires sur l'élimination de leurs substrats.

A. Activité physiologique des transporteurs apicaux et basolatéraux. B. Activité diminuée des transporteurs basolatéraux, accumulation systémique du substrat. C. Activité diminuée des transporteurs apicaux, accumulation intra-rénale du substrat.

b. Impact de l'IR sur la fonction ou l'expression des transporteurs tubulaires rénaux

Impact sur les transporteurs SLCs :

Divers travaux expérimentaux ont évalué les conséquences de l'IR sur la réabsorption de composés dépendant du gradient de concentration du Na^+ . Par exemple, chez des rats soumis à différents temps d'ischémie (30, 40 et 60 min) et de reperfusion (1 et 5 jours), Kwon *et al.* ont observé une diminution d'expression protéique des transporteurs Na^+/H^+ exchanger 3 (NHE3), NaPi-IIa et de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, se traduisant par une augmentation de l'excrétion urinaire de Na^+ . Cette excrétion s'est normalisée au bout de 5 jours (après 30 min d'ischémie), malgré une restauration incomplète de l'expression des transporteurs. Ce phénomène était exacerbé après 60 minutes d'ischémie, sans restauration de l'excrétion au bout de 5 jours (33). Une autre étude a également montré que l'ischémie rénale chez le rat était associée à une diminution de la réabsorption du glucose, en lien avec une baisse de l'expression du co-transporteurs $\text{Na}^+/\text{glucose}$ 2 (SGLT2) au niveau apical (34).

Des résultats similaires ont été obtenus pour les transporteurs SLCs impliqués dans la clairance des médicaments et les processus de détoxification. Concernant le transport des

anions organiques, Matsuzaki *et al.* ont montré que l'induction d'ischémie par clampage bilatéral des artères rénales chez le rat, suivie de différents temps de reperfusion (6, 12, 24 ou 48 h), était associée à l'augmentation des concentrations sériques d'indoxyl-sulfate, une toxine urémique, en lien avec une diminution de l'expression transcriptionnelle et protéique des *Organic Anion Transporters 1 et 3* (OAT1 et OAT3) (35). Schneider *et al.* ont quant à eux observé une diminution de la clairance de l'acide para-aminohippurique (PAH), substrat majeur des OAT1-3, de façon parallèle à la baisse d'expression transcriptionnelle et protéique de ces deux transporteurs en réponse à l'ischémie. Les niveaux d'expression transcriptionnelle de ces transporteurs étaient corrigés après 72 heures de reperfusion, accompagnés d'une restauration partielle de la clairance du PAH (32). Dans un modèle cellulaire *in vitro* (2 heures d'ischémie suivie de 48 h de reperfusion), Sauviant *et al.* ont montré une baisse de captation rénale de la fluorescéine, suggérant également une altération de fonction des transporteurs d'anions organiques (36). Concernant les cations organiques, la clairance du tétraéthylammonium (TEA) était diminuée chez des rats ayant subi un clampage des artères rénales (30 min) suivi de 48 heures de reperfusion, de façon parallèle à la diminution du transporteur apical *Multidrug and Toxic Compound Extrusion 1* (MATE1) et de l'*Organic Cation Transporter 2* (OCT2) au niveau basolatéral (37).

Bien que très informatifs, la plupart de ces modèles animaux, induisant uniquement une ischémie chaude, ne reflètent pas parfaitement les processus associés à l'IR survenant chez l'homme au cours de la transplantation, et notamment ceux qui résultent de la longue conservation du greffon à +4°C. De plus, il existe des différences significatives entre l'homme et les rongeurs en termes de spécificité de substrats, de distribution et d'abondance des transporteurs tubulaires rénaux (38).

Peu d'études ont évalué l'impact de l'IR sur les transporteurs tubulaires rénaux chez l'homme. Dans une cohorte de patients transplantés rénaux, Corrigan *et al.* ont montré que la clairance du PAH était diminuée pendant au moins 7 jours après la transplantation, de façon indépendante du flux plasmatique rénal, suggérant, bien que leur expression n'ait pas été évaluée dans cette étude, une dysfonction des transporteurs tubulaires impliqués dans la sécrétion de cette molécule (39). Suite à ces résultats, Kwon *et al.* ont effectivement observé, par analyse immunohistochimique, des anomalies de localisation cellulaire du transporteur OAT1 (avec notamment une perte de distribution basolatérale ainsi que la formation d'agrégats cytoplasmiques) sur des biopsies de greffons rénaux prélevées 1h après la

reperfusion. Ce phénomène était par ailleurs associé à la diminution de clairance du PAH (40).

Impact sur les transporteurs ABCs :

Les informations sur l'impact de l'IR sur les transporteurs ABCs sont quant à elles très limitées. Dans un modèle murin d'IR, les niveaux d'expression transcriptionnelle révèlent que certains gènes semblent être sur-exprimés (up-régulés) alors que d'autres sont sous-exprimés (down-régulés), sans corrélation avec les niveaux d'expression protéique, suggérant l'intervention de facteurs post-transcriptionnels (41). Les niveaux d'expression des transporteurs étudiés étaient normalisés 14 jours après l'ischémie. Ces résultats suggèrent une régulation temporelle des transporteurs tubulaires rénaux, qui pourrait correspondre à une réponse adaptative permettant le maintien de l'homéostasie face à l'ischémie. Une autre étude a également montré une augmentation du niveau d'expression transcriptionnelle de la P glycoprotein (P-gp), sans modification de l'expression protéique (35). Actuellement, la littérature ne recense que très peu d'études sur l'impact de l'IR sur les transporteurs ABCs.

c. Conséquences de la modulation des transporteurs rénaux en post-transplantation

Considérant ce qui a été décrit plus haut, on comprend qu'une altération des transporteurs tubulaires rénaux puisse avoir des conséquences délétères sur la survie du greffon mais aussi sur la reprise de fonction (9). Par exemple, les fortes concentrations de Na^+ urinaire résultant du mauvais fonctionnement de la pompe Na^+/K^+ -ATPase sont responsables, par un mécanisme de contre-régulation appelé « feedback tubulo-glomérulaire », d'une diminution du débit de filtration glomérulaire, pouvant concourir à l'insuffisance rénale (42).

De plus, comme précédemment évoqué, une accumulation de composés toxiques, anioniques ou cationiques, peut survenir de façon parallèle à la diminution d'expression des transporteurs qui les prennent normalement en charge, amplifiant les effets délétères chez le patient. Ainsi, l'administration de PAH et d'acide indole-acétique chez des rats ayant subi une néphrectomie subtotale accélère la perte de fonction rénale, la sclérose glomérulaire et les lésions tubulo-interstitielles (43). De même, l'accumulation des toxines urémiques chez les patients en IRC peut mener à diverses complications telles qu'une sénescence endothéliale (44), une athérogénèse (45), des maladies cardio-vasculaires (46,47) ou une augmentation de mortalité toute cause confondue (46,48).

Outre l'accumulation de toxines urémiques, une altération de l'activité de ces transporteurs peut également modifier la pharmacocinétique des médicaments utilisés en transplantation rénale, et des phénomènes d'interactions médicament-médicament, médicament-métabolite ou encore médicament-toxine urémique peuvent survenir, pouvant potentiellement influencer le devenir du greffon (49).

Si l'on voit que l'ischémie chaude (puisque principalement évaluée *ex vivo* ou *in vivo*) est à l'origine d'une modulation de l'expression des transporteurs et peut avoir un impact sur la reprise de fonction du greffon et la pharmacocinétique des médicaments administrés chez le receveur, aucune étude n'a en revanche évalué son impact sur les greffons rénaux lorsque ceux-ci sont conservés dans les machines de perfusion (ischémie froide).

5. Objectifs du travail

L'objectif principal de notre travail est donc d'améliorer la compréhension des mécanismes lésionnels survenant pendant la phase de conservation des organes sur HMP, un environnement *ex vivo*, hypoxique et hypothermique, par une analyse du profil métabolomique des liquides de perfusion de greffons humains conservés sur machine à perfusion, ainsi que par la détermination de l'expression transcriptionnelle de transporteurs tubulaires à partir de la biopsie préimplantatoire. Ces deux paramètres seront ensuite mis en lien afin d'envisager de nouveaux outils d'évaluation de la qualité des greffons rénaux conservés par HMP, prédictifs de la reprise de fonction rénale.

II. Matériel et méthodes

1. Sélection des patients et prélèvement des échantillons

Nous avons mis en place une étude prospective au cours de laquelle 38 couples donneurs-receveurs ont été inclus sur une période de 29 mois (projet de recherche clinique RENALIFE, numéro ClinicalTrials.gov : NCT03024229) au sein du CHRU de Tours et du Centre Hospitalier Régional (CHR) d'Orléans. Les patients inclus répondaient aux critères de sélection suivants : donneur âgé d'au moins 18 ans, décédé en état de mort encéphalique et présentant les critères élargis du prélèvement rénal tels que définis précédemment et receveur ayant exprimé sa non-opposition. Les critères de non-inclusion étaient : deuxième greffon issu du même donneur et attribué au même centre, doubles greffes.

Immédiatement après le prélèvement chez le receveur, les greffons ont été placés sur HMP Lifeport® *Kidney Transporter 1.0* (Organ Recovery System, Chicago, IL). Le liquide de conservation utilisé était le KPS-1® (Organ Recovery System), dont la composition théorique est disponible en **Annexe 1**. Les paramètres de la machine à perfusion, à savoir la température, le débit et l'indice de résistance, ont été recueillis de façon continue pendant toute la durée de conservation des organes. Une fois le receveur prêt pour la réimplantation, le rein a été débranché de l'HMP et un échantillon de liquide de perfusion a été collecté puis centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes avant d'être conservé à -20°C. Au même moment, une biopsie préimplantatoire a été prélevée à l'aide d'un pistolet 16 Gauge dirigé de manière à prélever des cellules au sein de la corticale rénale. Cette biopsie a ensuite été divisée en deux fragments : le premier fixé par du Bouin (acide picrique, acide acétique, formol) ou de l'AFA (Alcool Formolé Acétique) en fonction la date d'inclusion (modification des procédures du service d'anatomo-pathologie), puis inclus en paraffine afin de réaliser l'évaluation anatomopathologique selon la classification de Banff (version révisée de 2013) ; le second fragment a été conservé à 20°C en l'état (état frais). Chaque receveur a bénéficié d'un suivi clinico-biologique, incluant notamment une évaluation journalière de la fonction rénale durant les 7 premiers jours, ainsi qu'un recueil des événements cliniques survenant durant l'ensemble de la période de suivi, soit 3 mois après la transplantation. Le critère de jugement principal de l'étude RENALIFE était l'IGF définie par une créatinémie à J7 < 250 µM sans nécessité de dialyse et la DGF, caractérisée par une nécessité de dialyse dans les 7 jours.

2. Réactifs

Pour la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), la colonne Discovery HS F5-3 (150 x 2.1 mm d.i., 3 μ m) (#567503-U), l'acide 2-Isopropylmalique (#333115), l'acide α -cetoglutarique (#75890), le D-gluconate de sodium (#G9005), le D-Mannitol (#M4125), le D-Ribose (#R7500), la L-Carnitine (#8.40092), le gluconate de magnésium hydrate (#G9130), le PAH (#A1422) et la Taurine (#T0625) ont été achetés chez Sigma-Aldrich, la créatinine (27910) chez Fluka et le package LC-MS/MS « *Method Package for Cell Culture Profiling Ver.2* » a été obtenu auprès de Shimadzu.

Pour les analyses d'expression transcriptionnelle, les cartes *Taqman*® *Low Density Array* (TLDA) (gènes et sondes sélectionnés listés en **Annexe 2**) ont été commandées chez Thermofisher.

3. Détermination du contenu métabolique des liquides de perfusion

a. Analyse métabolomique par LC-MS/MS

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse en tandem LC-MS/MS-8060 (Shimadzu) et du package LC-MS/MS « *Method Package for Cell Culture Profiling Ver.2* » (Shimadzu), permettant l'analyse simultanée de 125 composés. D'autres composés, absents de ce package, ont pu être inclus dans l'analyse après injection de ces substances pures et détermination des transitions correspondantes. Brièvement, 100 μ L de liquide de conservation du greffon ont été ajoutés à 200 μ L d'acétonitrile et 20 μ L d'étalon interne (acide 2-Isopropylmalique à 0,5 mmol/L). Après centrifugation à température ambiante pendant 15 minutes à 15 000 g, le surnageant a été dilué au 1/10^e dans de l'eau ultrapure puis mis en vial avant injection de 3 μ L dans le système analytique.

La séparation chromatographique des composés a été réalisée avec une colonne *Discovery HS F5-3* (150 x 2,1 mm d.i., 3 μ m) thermostatée à 40°C, à un débit de 350 μ L/min selon le gradient linéaire de phases mobiles suivant : 0-1,4 min : 100% de A ; 1,4-3,5 min : passage de 0 à 25% de B ; 3,5-7,5 min ; passage de 25 à 35% de B ; 7,5 à 10,3 min : passage de 35 à 95% de B ; 10,3-13,7 : maintien de 95% B ; 13,7-13,8 min : retour à 0% B ; 13,8-17 min : stabilisation à 0% B, où A est une solution à 0,1% d'acide formique dans de l'eau et B une solution à 0,1% d'acide formique dans de l'acétonitrile. Après ionisation par *electrospray*,

la détection des composés a été réalisée en utilisant le mode *scheduled* MRM (Multi Reaction Monitoring) alternativement en modes positif et négatif. L'identification des composés était basée sur leur temps de rétention relatif ainsi que sur le suivi d'une transition pour la quantification et d'au moins une transition pour la confirmation. Pour chaque transition analysée, seuls les pics chromatographiques bien définis ont été pris en compte. Chaque échantillon de liquide de conservation des greffons a été analysé en duplicat. Des contrôles qualité ont été préparés en mélangeant un volume égal de chaque échantillon puis ont été injectés trois fois dans chaque série. Les métabolites présentant un coefficient de variation > 30 % dans les contrôles qualités n'ont pas été retenus pour l'analyse. Le KPS-1® natif a également été injecté afin de déterminer sa composition métabolique initiale. Les données ont été normalisées en divisant l'aire de chaque composé par celle l'étalon interne.

b. Analyse de métabolites supplémentaires

L'automate COBAS® 6000 (Roche Diagnostics, Meylan, France) a été utilisé pour déterminer les concentrations de sodium, potassium, calcium, phosphate, chlorure, bicarbonate, urée, créatinine et glucose, selon des méthodes utilisées en routine clinique et accréditées par le Cofrac (Comité français d'accréditation). Les composés quantifiés dans les liquides ont ensuite été ajoutés aux métabolites déterminés par LC-MS/MS pour les analyses statistiques.

4. Expression transcriptionnelle des transporteurs tubulaires

Les acides ribonucléiques (ARN) ont été extraits à partir de l'intégralité des demi-biopsies conservées en l'état à -20°C, à l'aide du kit *Nucleospin® RNA/Protein kit* (Macherey-Nagel), incluant une étape de DNase, selon les instructions du fournisseur. Ces ARNs ont ensuite été quantifiés au Qubit 4.0 (ThermoFisher) par fluorimétrie avec le kit *Qubit RNA HS Assay* (ThermoFisher). L'intégrité des ARNs a ensuite été évaluée par la mesure du *RNA Integrity Number* (RIN) sur le Bioanalyzer 21 000 (Agilent) avec le kit *Agilent RNA 6000 Pico* ou *Agilent RNA 6000 Nano*, en fonction de leur concentration. Deux cents nanogrammes d'ARN ont ensuite été rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) avec le kit *High capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermoFisher), conformément aux instructions du fournisseur. La technologie TLDA a été retenue pour réaliser les RT-qPCR. Dans la conformation de TLDA choisie ici (48:1), la carte contient 8 réservoirs permettant chacun la réalisation multiplexée de 48 RT-qPCR spécifiques. Nous avons choisis d'inclure 40 transporteurs (dont certains avec deux couples amorces-sondes différents) et 4 gènes de

ménage candidats (en plus du gène *GAPDH*, déjà inclus dans la carte) : *NME4*, *CHFR*, *C16ORF72* et *NASP* choisis selon une étude récente visant à déterminer des gènes de ménage adaptés à l'analyse transcriptomique non-ciblée de biopsies tissulaires provenant de transplantation rénale (50). Pour chaque échantillon, un mix contenant 1 µg d'ADNc dilué dans de l'eau *nuclease free* (qsp 55µL) et 55 µL de *TaqMan® Universal Master Mix II* (ThermoFisher) a été préparé. Cent µL de mix ont été ajoutés dans chaque puits d'une carte TLDA analysée après double centrifugation (1200g, 1 min) et scellage à l'aide du *Polymerase Chain Reaction (PCR) Quant-Studio 12K with mix-UNG Amperase* selon les conditions suivantes : incubation à 50°C pendant 2 min, puis 95°C pendant 10 min suivie de 40 cycles d'hybridation à 95°C pendant 15 s et d'élongation à 60°C pendant 1 min. Les *cycles threshold* (Ct) indéterminés ou > 35 ont été remplacés par la valeur 35. L'expression transcriptionnelle des transporteurs tubulaires rénaux a ensuite été analysée par la méthode comparative des $2^{-\Delta Ct}$ avec $\Delta Ct = Ct(\text{gène transporteur}) - Ct(\text{moyenne des gènes de ménage})$ (51). Les $2^{-\Delta Ct}$ ont été normalisés par transformation logarithmique (log2). Les gènes de ménage finaux retenus pour le calcul du $2^{-\Delta Ct}$ (*NME4*, *CHFR* et *C16ORF72*) ont été sélectionnés à l'aide des logiciels *Genorm* (52) et *Normfinder* (53).

5. Analyse statistique

Le projet avait plusieurs objectifs :

- déterminer l'impact de l'ischémie sur le contenu métabolomique des liquides de conservation et sur l'expression transcriptionnelle des transporteurs tubulaires rénaux,
- explorer la relation entre les profils métabolomiques et l'expression des transporteurs pendant la conservation des greffons par HMP,
- trouver de nouveaux biomarqueurs d'évaluation de la qualité des greffons rénaux conservés sur machine à perfusion, prédictifs de la reprise de fonction rénale par comparaison des patients IGF aux non-IGF.

Pour le premier objectif, 3 groupes ont été constitués en fonction de la durée de perfusion des greffons sur HMP : < 12 heures (groupe 1), entre 12 et 20 h (groupe 2), > 20 h (groupe 3). Les intensités ou concentrations (pour les analytes mesurés sur Cobas® 6000) des métabolites ont d'abord subis un *preprocessing* afin que leur distribution globale soient rapprochée d'une loi normale: normalisation par la somme, transformation logarithmique et

autoscaling (qui permet de donner le même poids à chaque variable), en accord avec les approches standards d'une analyse de métabolomique (54). Une approche en deux étapes a été utilisée pour les analyses statistiques : analyse univariée suivie de multivariée.

a. Analyses univariées

Des tests non paramétriques de Wilcoxon (pour la comparaison de deux groupes) ou de Kruskal-Wallis (pour la comparaison de trois groupes) ont été utilisés pour les variables quantitatives. Des tests exacts de Fisher ont été utilisés pour les variables qualitatives. Chaque test était considéré comme significatif pour une *p-value* inférieure à 0.05. Les *p-value* ont été ajustées après correction pour tests multiples par la méthode de Benjamini-Hochberg, le *False Discovery Rate* (FDR). Les *volcano plots* ont été réalisés à l'aide de la plateforme computationnelle MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

b. Analyses Multivariées

Pour la comparaison des différents groupes basés sur la durée de perfusion ou la reprise de fonction du greffon, les analyses multivariées ont d'abord été réalisées de façon non supervisée par *Principal Component Analysis* (PCA), afin de voir si des groupes se dessinent, permettant ainsi de générer des hypothèses et de détecter la présence d'échantillons aberrants (*outliers*). Puis, différentes approches supervisées de *machine learning* ont été utilisées : *Partial Least Squares* (PLS) *Discriminant Analysis* (PLS-DA) et *Random Forest* (RF) ou PLS seule.

La PLS-DA est une méthode de régression visant à prédire les valeurs prises par une variable Y catégorielle (variables à prédire dans notre étude : IGF ou non IGF et groupes constitués en fonction de la durée de perfusion) à partir d'une série de variables X (variables prédictives : métabolites ou transporteurs). Les métabolites sont exprimés en VIP (*Variable Importance in Projection*) et ceux ayant un $VIP > 0,8$ sont considérés comme statistiquement discriminants. Pour tester les performances du modèle, une méthode de validation croisée, *Cross-validation* (CV) dite des *10-fold* a été réalisée qui consiste à diviser l'échantillon en 10 sous-échantillons, à en sélectionner un comme ensemble de validation pendant que les 9 autres constituent l'ensemble d'apprentissage, à calculer les performances de validation, puis à répéter l'opération en sélectionnant un autre échantillon de validation. Les performances sont évaluées à l'aide des paramètres R^2 , représentant la somme des carrés de la variable Y capturée par le modèle, le Q^2 qui correspond au R^2 issus des données de *Cross-validation* et

l'*accuracy* qui correspond au % d'échantillons correctement prédits par le modèle. Un $R^2 \geq 0.6$ et un $Q^2 \geq 0.5$ reflètent un modèle performant. La significativité du modèle est déterminée par un test de permutations consistant à réattribuer la variable à prédire Y de façon aléatoire et relancer le modèle afin d'observer si la performance du modèle original est différente de celles obtenues lors des permutations.

Le RF ou algorithme des « Forêt aléatoire » est un autre outil de *machine learning* qui consiste à effectuer un apprentissage en parallèle sur de multiples arbres de décision construits aléatoirement et entraînés sur des sous-ensembles de données différents. Chaque arbre de décision est construit d'une fraction de l'échantillon d'apprentissage (le « *in bag* ») et vise à prédire la classe prise par le reste de l'échantillon (le « *out bag* »). Les performances du modèle sont évaluées par le *out-of bag error rate*, correspondant au pourcentage d'erreur de prédiction du modèle. Cet outil est particulièrement adapté aux données présentant un nombre d'échantillons réduit. Son utilisation n'étant pas possible pour un nombre de groupes supérieur à 2, seule la reprise de fonction (IGF vs non-IGF) a été évaluée par cet outil.

Les analyses de PLS-DA et de RF ont également été réalisées à l'aide de la plateforme computationnelle MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

La PLS est une méthode de régression similaire à la PLS-DA mais avec une variable Y quantitative. Cet outil a été utilisé pour estimer un lien entre métabolites (variable à expliquer) et transporteurs (variable explicative). Afin de réduire le nombre de variables et de sélectionner les transporteurs les plus discriminants, le modèle a été relancé plusieurs fois en filtrant à chaque fois les transporteurs ayant une valeur de VIP < 0.8. Cette analyse a été réalisée avec le package *MixOmics* (version 1.6.3) du logiciel R (version 4.0.2).

Des analyses d'identification de voies biologiques (*Pathway analysis*) ont également été réalisées à l'aide de MetaboAnalyst 5.0.

III. Résultats

1. Données démographiques des couples donneurs-receveurs

Trente-huit couples donneurs-receveurs ont été inclus entre le 16/03/2017 et le 20/08/2019. Tous les donneurs étaient en état de mort encéphalique et présentaient les critères élargis du prélèvement rénal. Les greffons ont été perfusés pendant une durée médiane de 832 minutes (étendue : 176-1603) et ont subi une période d'ischémie froide médiane de 1020 minutes (278-1695). Vingt-neuf patients (76 %) ont eu une reprise immédiate de fonction rénale (IGF). Cinq patients (13%) ont eu une reprise retardée de fonction du greffon (DGF). Aucune perte de greffon n'a été observée mais 2 rejets (5 %) ont été diagnostiqués à 1 mois et 3 mois post-greffe respectivement. Un patient est décédé d'un infarctus du myocarde un mois après la greffe. Au vu du faible nombre de patients en DGF, nous avons décidé de comparer les patients IGF aux non-IGF (n=9) afin de renforcer la puissance statistique de notre analyse. Le résumé des données démographiques est présenté en **Tableau I**.

Tableau I : Caractéristiques des donneurs, receveurs et des conditions de perfusion.

	Tous (n=38)	IGF (n=29)	non-IGF (n=9)	P	Manquant (n, (%))
Donneur :					
Age donneur (années) :	67,5 (61,75-75)	65 (60,5-75)	70 (67-77)	0,28	
Sexe donneur (n, (%)) :					
F	21 (55,3%)	14 (48,3%)	7 (77,8%)	0,15	
M	17 (44,8)	15 (51,7 %)	2 (22,2)		
Etat de mort encéphalique (n, (%)) :	38 (100%)	29 (100,0%)	9 (100,0%)	1	
Critère élargis (n, (%)) :	38 (100%)	29 (100,0%)	9 (100,0%)	1	
Receveur :					
Age receveur (années) :	65,5 (57-72)	65 (56,5-69)	72 (61-73)	0,20	
Sexe receveur (n, (%)) :					
F	13 (34,2%)	11 (37,9%)	2 (22,2%)	0,46	
M	25 (65,8 %)	18 (62,1 %)	7 (77,8 %)		
Ethnie (n, (%)) :				0,89	1 (2,6%)
Caucasien	30 (78,9%)	22 (75,9%)	8 (88,9 %)		
Afro-américain	2 (5,3%)	1 (3,4%)	1 (11,1 %)		
Autres	4 (10,5%)	4 (13,8%)	0 (0,0 %)		
Pathologie rénale :					
Diabète	9 (23,7 %)	6 (20,7%)	3 (33,3 %)		
HTA	14 (36,8%)	9 (31,0%)	5 (55,6%)		
Glomérulaire	2 (5,3%)	1 (3,4%)	1 (11,1 %)		
Tubulointerstitielle	3 (7,9%)	1 (3,4%)	2 (22,2%)		
Polykistose	6 (15,8%)	5 (17,2%)	1 (11,1 %)		
Autre	16 (42,1%)	13 (44,8%)	3 (33,3 %)		
Nombre de transplantation (n, (%)) :				1	
1	35 (92,1%)	26 (89,7%)	9 (100,0%)		
>1	3 (7,9%)	3 (10,3%)	0 (0,0%)		
Dialyse avant transplantation (n, (%)) :	34 (89,5%)	25 (86,2%)	9 (100,0%)	0,55	
Traitement d'induction (n, (%)) :					
Thymoglobulines	11 (28,9%)	10 (34,5%)	1 (11,1%)		
Anti-IL2R	27 (71,0%)	19 (65,5%)	8 (88,9%)		
Traitement d'entretien (n, (%)) :					
MMF-Corticoïdes-CNI	32 (84,2%)	24 (82,8%)	8 (88,9%)		
MMF-Corticoïdes	3 (7,9%)	2 (6,9%)	1 (11,1%)		
Corticoïdes-CNI-mTOR	2 (5,3%)	2 (6,9%)	0 (0,0%)		
Corticoïdes-CNI	1 (2,6%)	1 (3,4%)	0 (0,0%)		
Classification de Banff (n, (%)) :				0,50	10 (26,3)
Normal	17 (44,7%)	12 (41,4%)	5 (55,6%)		
Lésions tubulaires	10 (26,3%)	9 (31,0%)	1 (11,1%)		
FIAT-1	1 (2,6%)	1 (3,4%)	0 (0,0%)		
Rejet de greffe (n, (%)) :					
Total	2 (5,3%)	1 (3,4%)	1 (11,1%)	1	
Humoral	2 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1	
Cellulaire	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
Mort (n, (%)) :	1 (2,6%)	1 (3,4%)	0 (0,0%)	1	
Conditions de perfusion					
Durée de perfusion (min) :	831,5 (622,75-1031,25)	911 (603-1146)	675 (646-882)	0,45	
Durée d'ischémie froide (min) :	1020 (810-1231,5)	1046 (812,5-1287)	875 (810-1065)	0,29	
Température initiale (°C) :	2,8 (2,3-5,8)	2,85 (2,15-6,625)	2,5 (2,25-3,1)	0,58	3 (7,9%)
Température finale (°C) :	2,6 (2,2-4,2)	2,75 (2,275-4,925)	2,5 (2,1-2,85)	0,35	3 (7,9%)
Baisse température (°C) :	0,1 (-0,4-1,3)	0,15 (-0,425-1,625)	0,1 (-0,45-1,05)	0,68	3 (7,9%)
Résistance initiale (mmHg/ml/min) :	0,45 (0,3-0,8)	0,5 (0,2-0,8)	0,4 (0,3-0,95)	0,49	2 (6,4%)
Résistance finale (mmHg/ml/min) :	0,2 (0,1-0,2)	0,2 (0,1-0,2)	0,2 (0,2-0,3)	0,26	3 (7,9%)
Baisse résistance (mmHg/ml/min) :	0,2 (0,1-0,6)	0,15 (0,075-0,6)	0,2 (0,1-0,65)	0,52	3 (7,9%)
Débit initial (ml/min) :	60 (31-91)	57,5 (34,5-113)	60 (26-82,5)	0,41	3 (7,9%)
Débit final (ml/min) :	111 (82-136)	117 (91-147,75)	97 (73-113,5)	0,16	3 (7,9%)
Augmentation débit (ml/min) :	43 (4-82)	51,5 (-2,5-97,5)	42 (20,5-74,5)	0,99	3 (7,9%)

Données reportées comme : « Médiane (Quartiles) » ou « n, (%) », avec les p-values des tests de Fisher ou de Wilcoxon.

* significatif : p < 0.05

2. Détermination des profils métabolomiques et de l'expression des transporteurs

a. Profils métabolomiques des liquides de perfusion.

Soixante-six métabolites ont été identifiés par LC-MS/MS dans les 35 liquides de perfusion disponibles pour l'analyse. Ces métabolites étaient présents dans chaque échantillon, à quelques exceptions près (**Tableau II**). A ce chiffre s'ajoutent les analytes mesurés par le COBAS 6000®, soit un total de 72 métabolites disponibles pour l'analyse statistique (**Tableau II**). Parmi eux, 29 étaient déjà présents dans le KPS-1® natif (**Tableau II**). Par comparaison aux échantillons prélevés en fin de perfusion, les concentrations de certains de ces analytes initialement présents ont augmentées (comme l'inosine, la guanosine, la xanthosine, la 5-Méthyl-adénosine, le tryptophane et la riboflavine) tandis que d'autres ont au contraire diminuées (acide gluconique, méthionine sulfoxide, glucosamine, glutathion oxydé, adénine, acide 2-kétoisovalérique, acide 3Méthyl-2-oxovalérique, D-ribose, et déoxycytidine monophosphate). Quarante-trois métabolites ont été retrouvés exclusivement dans les échantillons et non dans le KPS-1® natif, témoignant de leur relargage par les greffons durant la conservation. Selon l'analyse de voies biologique, ces métabolites appartiennent majoritairement au groupe du métabolisme des acides aminés (**Annexe 3**).

Tableau II: Contenu métabolomique des perfusats et du KPS-1® initial.

<i>Perfusats uniquement</i>	<i>DéTECTÉS dans le KPS-1 et les perfusats</i>		
	<i>Augmenté</i>	<i>Inchangé</i>	<i>Diminué</i>
O-Phosphoéthanolamine	Inosine	Sodium #	Acide gluconique #
Cystine	Guanosine	Potassium #	Méthionine sulfoxide
Acide aspartique	Xanthosine	Calcium #	Glucosamine
Sérine	Tryptophane	Phosphates	Glutathion oxydé
4-Hydroxyproline	Riboflavine	Glucose #	Adénine #
Cystathionine	5-Méthylthioadenosine	Glutathion #	Acide 2-kétoisovalérique
Glycine		Hexose #	Acide 3-Méthyl-2-oxovalérique
Thréonine		Acide pipécolique	Gluconate de sodium #
Acid glutamique		Thymine	D-Ribose #
Alanine		Thymidine	Déoxycytidine monophosphate
Ornithine		Biotin	
Proline		D-Mannitol	
2-Aminoéthanol		Acide 4-Pyridoxique	
Lysine			
Histidine			
Acide lactique			
Arginine			
Uracile			
Acide urique			
Choline			
5-Glutamylcystéine			
Xanthine			
Hypoxanthine			
Valine			
Uridine			
Méthionine			
Niacinamide			
Tyrosine			
Adénosine			
Pyridoxal*			
Acide 4-aminobenzoïque **			
Isoleucine			
Leucine			
Phénylalanine			
Kynurénine**			
Alpha-céto-glutarate			
Créatinine			
L-Carnitine			
PAH**			
Taurine			
1-Méthylhistidine			
Acide anthranillique**			
Urée			

* Présent seulement chez quelques patients

** Indéfecté chez quelques patients

listé dans les composés du KPS1®

b. Expression transcriptionnelle des transporteurs

Trente-quatre biopsies étaient disponibles pour l'extraction d'ARN. Deux ont été exclues car la quantité d'ARN obtenue était trop faible. Après analyse globale par PCA, six autres biopsies, considérées comme *outliers*, ont dû être exclues car elles contenaient une zone importante de médullaire rénale, selon les comptes rendus anatomopathologiques. Les valeurs moyennes de RIN obtenues pour les 26 biopsies retenues étaient de 5,4 +/- 2,4 (échelle de score allant de 0 à 10). Tous les transporteurs étudiés ont pu être identifiés dans les biopsies. Une corrélation importante a été retrouvée entre les $\log_2(2^{-\Delta C_t})$ de la plupart des transporteurs, justifiant l'utilisation de méthodes multivariées comme la PLS-DA, adaptées aux variables fortement corrélées entre elles (**Annexe 4**).

3. Impact de la durée de perfusion

a. Profils métabolomiques et durée de perfusion.

D'après les résultats de l'analyse univariée, les valeurs de 31 métabolites varient de façon significative ($FDR < 0.05$) entre les groupes constitués selon la durée de perfusion des greffons (**Figure 5**). Ces métabolites appartiennent à des voies métaboliques variées telles que les acides aminés et dérivés (leucine, cystine, glutathion), les purines (inosine, guanosine), les intermédiaires du cycle de Krebs et lactate (alpha-cétoglutarate, acide lactique). Vingt-trois métabolites ont vu leur concentration augmenter avec la durée de perfusion, contrairement à huit autres dont les valeurs ont diminué.

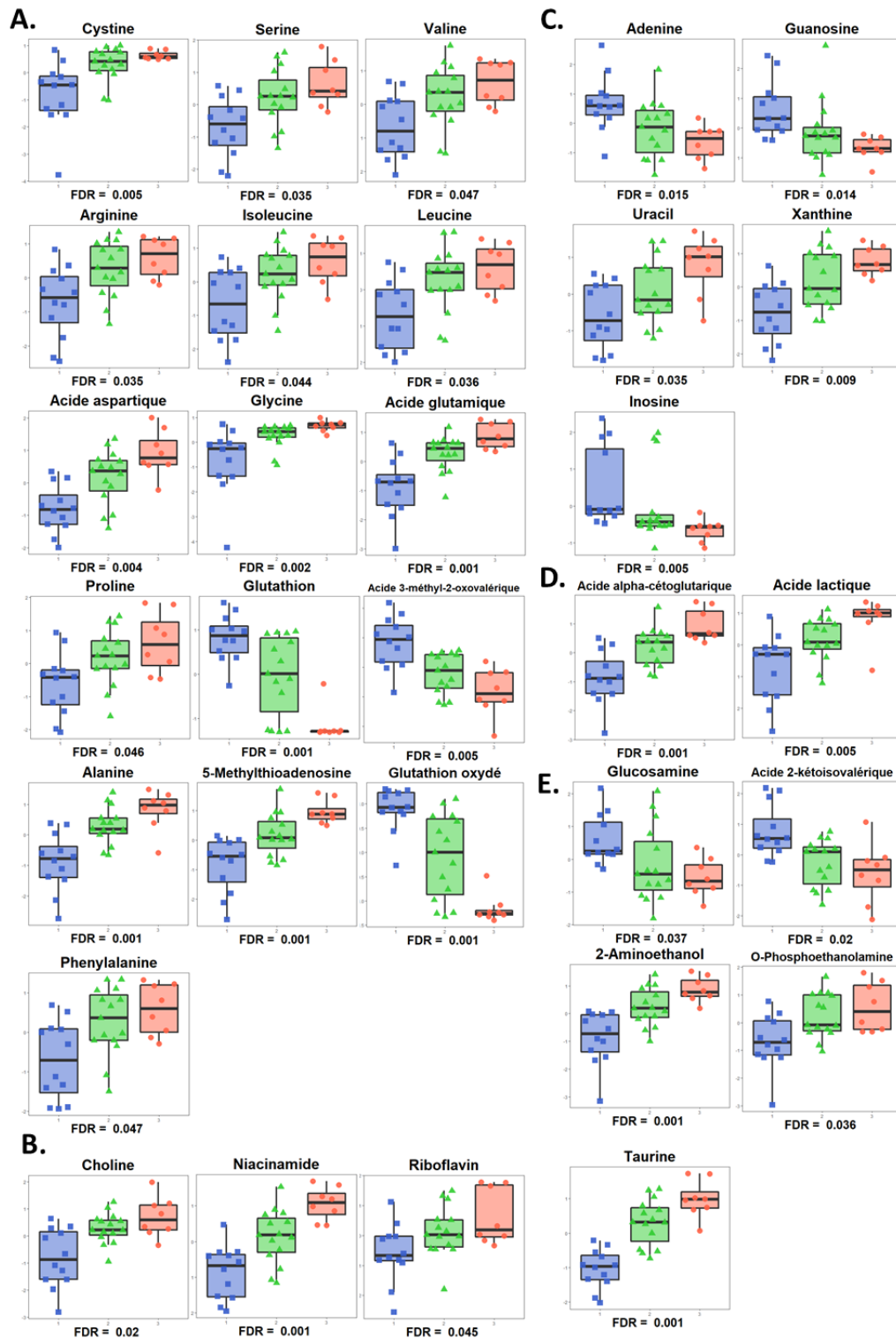


Figure 5 : Métabolites dont les valeurs diffèrent significativement en fonction de la durée de perfusion des greffons, d'après l'analyse univariée.

Seuls les métabolites significativement différents entre les groupes constitués en fonction de la durée de perfusion sont représentés ici. Les analyses statistiques ont été réalisées par des tests de Kruskal wallis, après correction des p-values par la méthode du FDR. Groupe 1 (Boîtes à moustache bleues) : durée de perfusion < 12 heures ; Groupe 2 (boîtes à moustache vertes) : durée de perfusion entre 12 et 20 heures ; Groupe 3 (Boîtes à moustache rouges) : durée de perfusion > 20 heures. Les boîtes à moustache sont regroupées en fonction de la famille à laquelle appartient le métabolite qu'elles représentent. **A.** acide amines et dérivés, **B.** vitamines, **C.** acide nucléiques et dérivés, **D.** Cycle de Krebs et lactate, **E.** autres.

Puis, une analyse multivariée a été menée afin de considérer un profil de biomarqueurs potentiels et non pas chaque métabolite indépendamment les uns des autres. Tout d'abord, l'analyse non supervisée par PCA montre, d'après le *scores plot*, une bonne séparation entre les groupes à durée de perfusion extrêmes (< 12 h vs > 20 h) mais le groupe 2, intermédiaire, chevauche les deux autres. Cinquante-deux % de la variance sont expliqués par les deux premières composantes (**Figure 6A**). Le *score plot* de la PLS-DA (deux premières composantes) montre une séparation complète entre les groupes 1 et 3 mais également un chevauchement avec le groupe 2 (**Figure 6B**). La CV montre de bonnes performances avec un R^2 à 76 % et un Q^2 à 54%, malgré une *accuracy* modeste de 41 % (liée au groupe 2). De plus, le test de permutations montre la significativité du modèle ($p < 0.05$), et donc son absence d'*overfitting*. Les métabolites les plus importants pour le modèle ($VIP > 0.8$) sont représentés en **Figure 6C**. Les voies biologiques significatives, déterminées sur la base des métabolites ayant un $VIP > 0.8$, sont le métabolisme du glutathion, des purines, du glutamate, de la glycine, la sérine, l'alanine, l'arginine et la proline, la biosynthèse de la phosphatidyl-ethanolamine, la dégradation de valine, de la leucine et de l'isoleucine, la navette malate-aspartate, le cycle de l'urée et le recyclage de l'ammonium (**Annexe 5**).

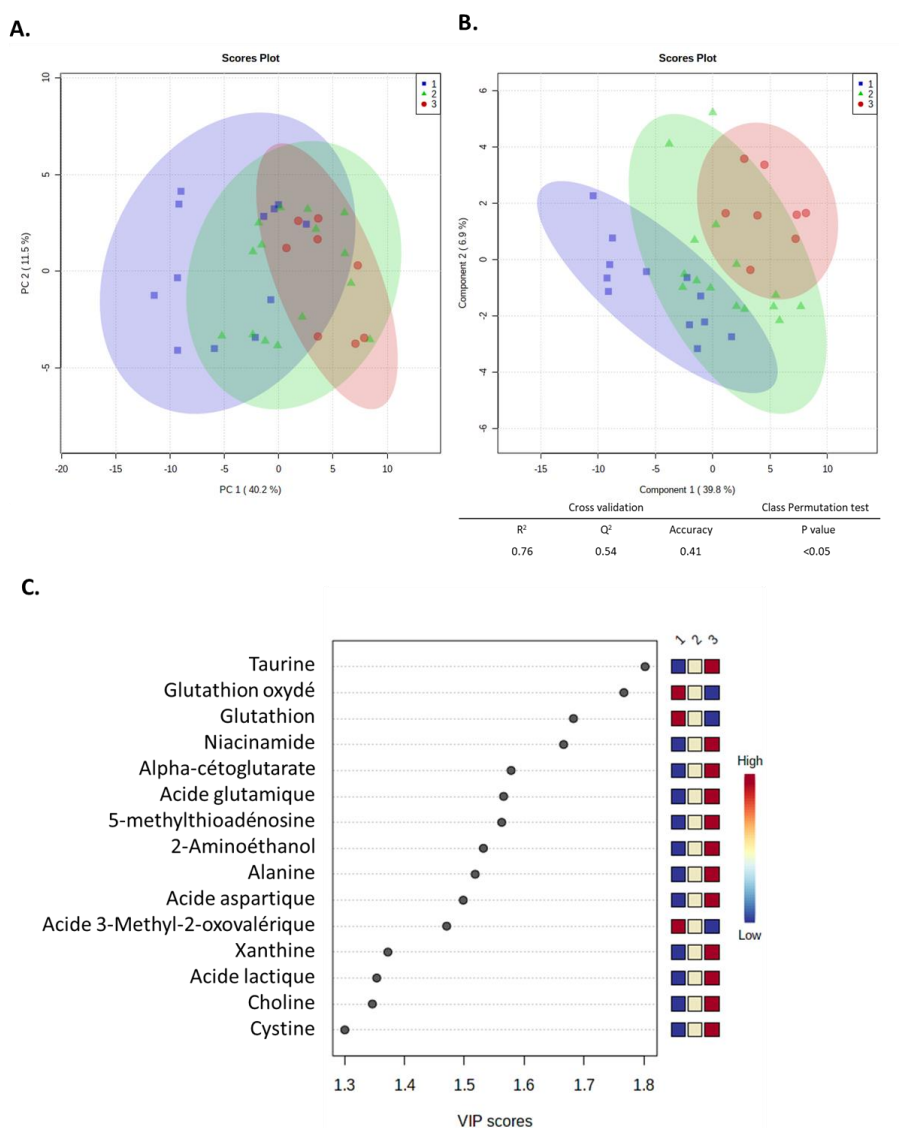


Figure 6: Analyse multivariée des profils métabolomiques des liquides de perfusion, en fonction de la durée de perfusion des greffons.

Groupe 1 (carrés bleus) : durée de perfusion <12 heures ; Groupe 2 (triangles verts) : durée de perfusion entre 12 et 20 heures ; Groupe 3 (points rouges) : durée de perfusion > 20 heures **A.** PCA scores plot montrant une séparation entre les groupes 1 et 3 mais pas du groupe 2 avec la première composante principale expliquant 40% de la variabilité et la seconde, 11,5%. **B.** PLS-DA scores plot montrant une bonne séparation entre les 3 groupes, avec de bonnes performances. **C.** Quinze métabolites les plus importants pour le modèle PLS-DA, selon leur valeur de VIP ; les carrés sur la droite indiquent le sens de variation des analytes.

b. Expression des transporteurs et durée de perfusion.

D'après les résultats de l'analyse univariée, l'expression transcriptionnelle d'aucun transporteur ne diffère significativement en fonction de la durée de perfusion. Les performances du modèle de PLS-DA sont mauvaises : $R^2 = 34\%$, Q^2 négatif, *accuracy* = 30 %) et le test de permutations n'est pas significatif ($p=0.95$) (**Figure 7**).

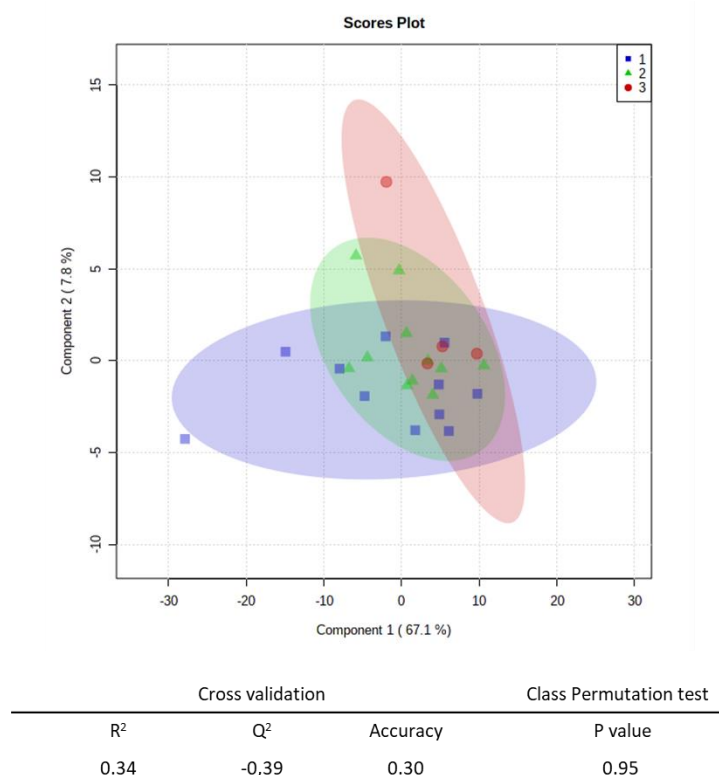


Figure 7: Analyse multivariée de l'expression transcriptionnelle des transporteurs en fonction de la durée de perfusion.

PLS-DA scores plot ne montrant pas de franche séparation entre les 3 groupes, avec des performances du modèle mauvaises d'après les résultats de la CV et du test de permutations. Groupe 1 (carrés bleus) : durée de perfusion <12 heures ; Groupe 2 (triangles verts) : durée de perfusion entre 12 et 20 heures ; Groupe 3 (points rouges) : durée de perfusion > 20 heures.

4. Corrélation entre expression des transporteurs et profils métabolomiques

La corrélation entre l'expression transcriptionnelle et le contenu métabolomique des liquides de perfusion a été évaluée par régression PLS. La classification hiérarchique du modèle, ou *Clustered Image Map* (CIM) est représentée en **Figure 8**. Cette figure ne montre pas d'association particulière entre certains groupes de transporteurs ou de métabolites. De plus l'échelle de corrélation montre des valeurs extrêmes allant uniquement de -0.54 à 0.54 et chaque métabolite se comporte globalement de la même manière pour tous les transporteurs (ce qui peut être expliqué par la forte corrélation des transporteurs entre eux). Cette analyse montre donc une corrélation globalement faible entre l'expression transcriptionnelle des transporteurs et le contenu métabolomique des liquides de perfusion.

patients non-IGF (**Figure 9A**). Les deux groupes sont visuellement séparés sur le *scores plot* (**Figure 9B**) du modèle PLS-DA, avec une *accuracy* correcte de 69% mais les performances sont mauvaises : $R^2 = 36\%$ et Q^2 négatif. De plus le test de permutations n'est pas significatif ($p=0.6$). Un meilleur modèle a alors été cherché par RF. Si l'*out of bag error* n'était que de 23 % pour l'ensemble du *dataset*, cohérent avec l'*accuracy* du PLS-DA, il est en revanche de 100 % pour la classe non-IGF, ce qui montre que le modèle est incapable de prédire une non reprise de fonction (**Figure 9C**).

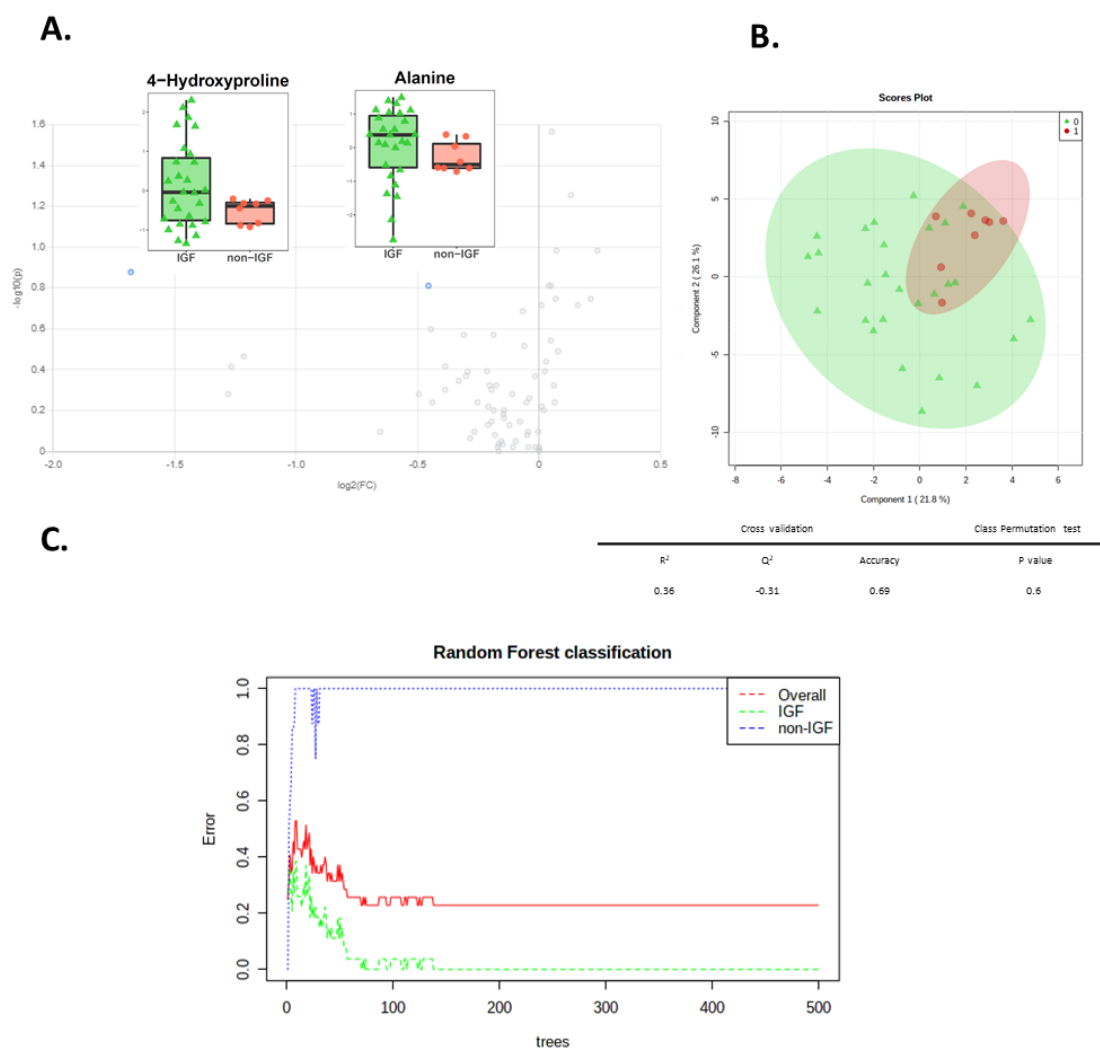


Figure 9 : Evaluation des profils métabolomiques des liquides de perfusion en tant que biomarqueurs prédictifs de la reprise de fonction du greffon.

A. Analyse univariée : Volcano plot montrant une tendance à la diminution pour la 4-Hydroxyproline et l'alanine chez les patients non IGF (en rouge) par comparaison aux patients IGF (en vert) (seuils : $FC = 1,2$ et p -value brute = 0.2). Analyse multivariée : **B.** Le scores plot et les performances de la PLS-DA montrant une séparation mauvaise entre les groupes. **C.** RF montrant le taux d'erreur de prédiction pour l'ensemble du dataset et pour chaque classe.

b. Transporteurs et reprise de fonction

Aucun transporteur n'était discriminatif de la reprise de fonction en analyse univariée. De même, en analyse multivariée, un chevauchement des deux groupes est observé sur le *scores plot* de la PLS-DA (**Figure 10A**), dont les performances sont mauvaises : $R^2 = 26\%$, Q^2 négatif malgré une *accuracy* correcte de 69%. Le test de permutation n'est pas significatif non plus ($p=0.5$). Le modèle de RF montre également une mauvaise prédiction des non-IGF : 5 patients sur 6 sont classés de façon incorrecte en IGF (**Figure 10B**).

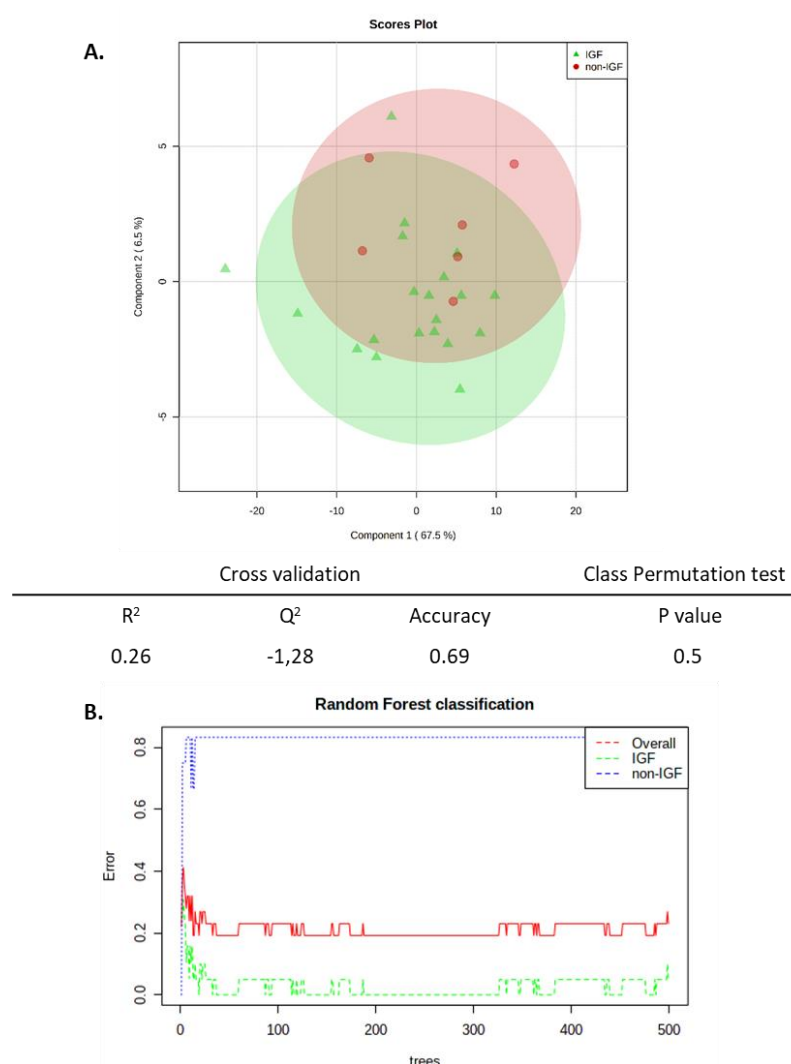


Figure 10 : Evaluation de l'expression transcriptionnelle des transporteurs tubulaires en tant que biomarqueur prédictif de la reprise de fonction du greffon.

A. Le scores plot de la PLS-DA montrant un chevauchement entre les différents groupes de réponse cliniques. **B.** RF montrant les erreurs de prédiction pour l'ensemble du dataset et pour chaque classe : le modèle montre une mauvaise prédiction des patients non-IGF.

IV. Discussion

Le but de cette étude était d'améliorer notre compréhension des phénomènes survenant au cours de la conservation des greffons rénaux dans cet environnement *ex vivo*, hypoxique et hypothermique qu'est l'HMP. Dans cette optique, le contenu métabolomique des liquides de perfusion, collectés juste avant la réimplantation de l'organe chez le receveur, a été déterminé, notamment par une méthode LC-MS/MS de métabolomique ciblée. Cette analyse a mis en évidence des variations de concentrations de nombreux métabolites en fonction de la durée de perfusion du greffon, consolidant certains résultats précédemment retrouvés par d'autres équipes et apportant également de nouvelles connaissances grâce à la variété des métabolites explorés.

Un des atouts majeurs de ce travail est l'exploration de l'impact de l'ischémie sur l'expression transcriptionnelle des transporteurs tubulaires rénaux, ce qui n'a, à notre connaissance, jamais été réalisé au cours d'une étude clinique. Cette étude apporte une preuve de concept sur la possibilité de mettre en lien l'expression transcriptionnelle des transporteurs, déterminée à partir d'une très faible quantité de matériel biologique, avec le profil métabolomique des liquides de perfusion et la reprise de fonctionnalité du greffon. Sur ce dernier point, nos résultats soulignent le manque de reproductibilité des quelques biomarqueurs prédictifs de la reprise du greffon précédemment publiés et encouragent la poursuite de nouveaux travaux, incluant un nombre plus important de sujets afin de renforcer la puissance statistique de telles études.

1. Maintien d'une activité métabolique lors de la conservation sur HMP

Les données combinées des analyses de LC-MS/MS et de l'analyseur Cobas 6000® nous ont permis de déterminer, dans les liquides de perfusion, les concentrations relatives de 72 analytes, certains n'ayant à notre connaissance jamais été étudiés dans ce contexte. La comparaison de ces profils à celui du liquide de perfusion initial, le KPS-1® natif, nous a permis de mettre en évidence une modification profonde du contenu métabolomique de ce dernier. Si une telle approche avait déjà été initiée par Guy *et al.* en 2015, ces derniers n'avaient en revanche pas déterminé le profil métabolomique du KPS-1® natif mais avaient comparé les métabolites retrouvés chez leurs patients à ceux listés dans la composition du KPS-1® (13). Or, pour une telle comparaison, il est nécessaire d'analyser ce liquide au même titre que les autres échantillons, d'autant que nous y avons détecté pas moins de 29

métabolites additionnels, ce qui est bien plus que ceux listés par le fournisseur (**Annexe 1**). Parmi eux, nous avons pu observer une diminution des concentrations de certains métabolites en fin de perfusion, suggérant une réabsorption ou une consommation par l'organe, tandis que d'autres métabolites ont vu leur concentration augmenter, pouvant refléter une libération des constituants intracellulaires suite aux dommages induits par l'ischémie.

2. Modifications liées à la durée de perfusion

S'il est important de montrer qu'une modification de la composition initiale du liquide de perfusion survient lors de la conservation des organes sur HMP, il est également primordial d'évaluer l'impact que peut avoir la durée de perfusion, étroitement liée à la durée d'ischémie froide, sur le métabolisme rénal. En effet, le temps de conservation des greffons peut être très variable, comme illustré ici où il s'étend de 176 à 1603 minutes, alors même que les greffons, prélevés localement, étaient destinés à des receveurs locaux.

Dans notre étude, les concentrations de 8 métabolites étaient significativement diminuées avec l'augmentation du temps de perfusion des greffons. Cela est particulièrement vrai pour le glutathion (dans sa forme réduite et oxydée), pour lequel nous observons une baisse brutale dans le groupe des greffons ayant subi une durée de perfusion > 20 h. Ces résultats viennent appuyer les travaux de RMN précédemment réalisés chez le porc ou l'homme qui ont été présentés plus haut (11–13). Le glutathion agissant en tant que protecteur vis-à-vis des radicaux libres, cette diminution pourrait être la conséquence d'une réabsorption cellulaire pour lutter contre le stress oxydatif induit par l'ischémie. Un raisonnement similaire peut être appliqué pour la glucosamine, pour laquelle nous reportons pour la première fois, à notre connaissance, une diminution liée à la durée de perfusion lors de la conservation sur HMP, ce qui renforce son rôle de candidat potentiel de lutte contre l'IRI (55). A l'instar de ce qui a été retrouvé par Bon *et al.* chez le porc ou Guy *et al.* chez l'homme, nous avons observé pour les temps de perfusion les plus longs une élévation des niveaux de lactate, reflet de la glycolyse anaérobie survenant dans cet environnement hypoxique, ainsi que de nombreux acides aminés, ce qui peut suggérer une libération du contenu intracellulaire après lyse des cellules ou bien encore un défaut de leur réabsorption par des transporteurs spécifiques. Nous avons également retrouvé une altération du métabolisme des purines, en particulier l'adénine, l'inosine, la guanosine (diminuées) et la xanthine (augmentée). En conséquence du déficit en ATP induit par l'ischémie, les cellules vont catalyser l'adénosine monophosphate (AMP) en adénosine (adénine retrouvée diminuée), elle-même rapidement dégradée en inosine

(retrouvée diminuée) par l'adénosine désaminase, qui est ensuite convertie en hypoxanthine. Cette hypoxanthine va alors être transformée en xanthine (retrouvée augmentée) par la xanthine oxydase et cette réaction s'accompagnera de la formation d'espèces oxygènes réactives, pourvoyeuse de stress oxydatif. L'observation d'une diminution des concentrations d'inosine avec la durée de perfusion peut sembler contradictoire avec les résultats de Guy *et al.* qui ont quant à eux observé une élévation de l'inosine. Cependant, les temps de détermination des profils métabolomiques sont différents : précoces dans les travaux de Guy *et al.* (45 min et 4 heures) tandis que le premier quartile de notre durée de perfusion était déjà de 10 h. Nous pouvons par ailleurs observer que dans notre étude, les variations de ce métabolite sont très étendues dans le premier groupe (< 12 h de perfusion) et que la diminution est surtout observée pour les deux autres groupes. Ces discordances apparentes ne sont donc pas surprenantes et peuvent être témoins de la cinétique de cette cascade réactionnelle (formation d'inosine puis dégradation de cette dernière). L'intérêt de suivre la cinétique d'évolution de ces métabolites a déjà été démontré par les travaux de Stryjak *et al.* qui ont utilisé une technique de microextraction en phase solide, *solid phase microextraction* (SPME) pour déterminer le profil métabolomique intratissulaire de reins de lapins conservés par conservation statique (*Static cold storage*, SCS), à 5 temps de prélèvements différents : 0, 2, 4, 6 et 21 heures (56). Ils ont observé que ces métabolites appartenant à des voies métaboliques diverses, notamment des acides aminés et des purines, étaient significativement élevés durant les premières heures de conservation puis étaient diminués pour des temps de perfusion plus long. Ces résultats, *in situ*, sur un faible échantillon (n= 3) et une conservation statique ne peuvent cependant pas être directement comparés aux nôtres.

Les profils métabolomiques que nous avons observés, variant en fonction de la durée de perfusion sont donc bien témoins d'un maintien de l'activité métabolomique des reins lors de leur conservation sur HMP, mais leurs mécanismes sous-jacents restent peu connus. La plupart de ces molécules discriminantes étant physiologiquement réabsorbées ou sécrétées par les transporteurs tubulaires proximaux, une de nos hypothèses était que ces variations pourraient être expliquées par une altération de l'activité de ces transporteurs.

3. Faible corrélation entre transporteurs et métabolites

Afin de trouver un phénomène explicatif à ces variations de contenu métabolomique des liquides de perfusion, l'expression transcriptionnelle de transporteurs tubulaires rénaux a été déterminée à partir de biopsies préimplantatoires. Une des étapes clés de cette analyse a

été la sélection du matériel biologique (biopsies conservées à -20°C en l'état ou fixées) et des méthodes à utiliser. En effet, la quantité de tissu disponible sur une demi-biopsie rénale est très faible et il s'agit d'un matériel précieux au mode de prélèvement invasif, ce qui limite la réalisation de travaux de mise au point. Nous nous sommes portés sur les fragments biopsiques conservés à -20°C, en estimant que l'utilisation de gènes de ménage (probablement impactés par la conservation de la même façon que ceux des transporteurs) contrecarre l'hétérogénéité de la durée de conservation de nos prélèvements (période d'inclusion s'étendant sur plus de deux ans et demi). La mesure du RIN de nos ARN nous a permis de vérifier que l'intégrité des ARN, plutôt correcte compte tenu de notre milieu biologique, était indépendante de cette durée de conservation. Pour la méthode d'analyse, nous avons décidé d'opter pour la technologie TLDA. Il s'agit d'une méthode robuste et reproductible, permettant la réalisation de multiples RT-PCR spécifiques à partir d'une faible quantité d'ARN, contrairement aux RT-PCR classiques pour lesquelles nous aurions dû valider les amorces et qui nous auraient contraints à nous limiter à un faible nombre de transporteurs, moins adapté à une mise en lien avec les profils métabolomiques. La RT-PCR a également l'avantage d'amplifier des fragments d'ADNc de petite taille (souvent < 150 pb), ce qui est particulièrement adapté lorsque la qualité des ARNs n'est pas optimale. De plus, elle est moins coûteuse et plus facilement interprétable qu'une analyse de *RNA sequencing*. L'inclusion dans la puce de 40 transporteurs est certes moins large qu'avec un *RNA sequencing* mais cette liste correspond aux objectifs de notre travail qui ne cherchait pas à analyser d'autres gènes que ceux des transporteurs.

En dépit de ces *challenges* analytiques, nous avons pu déterminer l'expression transcriptionnelle de 40 transporteurs tubulaires. Cependant, nous n'avons pas retrouvé de corrélation particulière entre les profils métabolomiques des liquides de perfusion et l'expression transcriptionnelle de ces transporteurs. Si l'analyse métabolomique était obligatoirement limitée aux métabolites physiologiques (absence des principaux substrats des transporteurs de médicaments), nombre d'entre eux sont néanmoins substrats de transporteurs tubulaires rénaux présents sur nos cartes TLDA (acides aminés, molécule di tri carboxylées, glucose etc...) et nous espérons pouvoir relier leurs variations à l'expression des transporteurs. Une des explications possibles à ce manque de corrélation, outre que les variations des profils métabolomiques ne résultent que d'une modification du métabolisme cellulaire, pourrait être que, lors d'une conservation sur HMP, le liquide de perfusion représente à la fois le pôle basolatéral et apical des cellules tubulaires proximales, alors que la

fonction même des transporteurs est dépendante d'un environnement polarisé. L'expression transcriptionnelle n'est de plus pas parfaitement représentative de leur activité, des auteurs ayant précédemment démontré une cinétique différente entre expression transcriptionnelle et protéique (32) ou bien encore une anomalie de localisation cellulaire (40). Malheureusement, la quantité de protéines extraite de ces demi-biopsies était trop faible pour permettre de déterminer l'expression protéique de ces transporteurs, et l'utilisation de deux fixateurs histologiques différents, non adaptés aux techniques d'immunochimie, a rendu impossible la détermination de la localisation cellulaire.

Nous n'avons pas retrouvé non plus de corrélation particulière entre l'expression transcriptionnelle des transporteurs et la durée de perfusion, alors même que certains travaux, notamment sur des modèles animaux, suggèrent qu'une dérégulation des transporteurs survient dès 30 minutes après le début d'ischémie chaude. Une explication possible pour l'absence de corrélation retrouvée dans cette cohorte serait que le phénomène responsable de l'altération des transporteurs soit survenu en amont du prélèvement de la biopsie, pour tous les patients. Cette théorie aurait pu être confirmée par comparaison de cette expression transcriptionnelle à des témoins non ischémiés, mais nous n'avons pas pu obtenir de telles biopsies en raison de la situation sanitaire liée au COVID-19 au moment des manipulations.

L'ensemble de ces résultats supporte la conduite de futures études, évaluant à la fois le contenu métabolomique intra et extra tissulaire de façon longitudinale, en lien avec l'activité des transporteurs.

4. Mauvaise prédiction de la reprise de fonction du greffon.

Un des autres objectifs de cette étude était la découverte de biomarqueurs non invasifs, prédictifs de la qualité du greffon, pouvant être utilisés pendant la période préimplantatoire. Les paramètres de perfusion de la machine (tels que l'indice de résistance ou le débit) utilisés actuellement, ou bien encore l'évaluation anatomopathologique restent peu satisfaisants dans la prise de décision de rejeter un organe, et n'ont d'ailleurs pas été associés avec la reprise d'activité du greffon dans notre cas.

Le profil métabolomique des liquides de perfusion pourrait être un biomarqueur idéal, étant non invasif et pouvant être adapté en routine clinique à l'aide d'une méthode d'analyse rapide. Une preuve de concept d'une telle application avait été démontrée par les équipes de Bon *et al.* chez le porc ainsi que Guy *et al.* chez l'homme (12,13). Dans notre cohorte, nous n'avons pas identifié de biomarqueurs prédictifs de la reprise de fonction du greffon. Une des

explications possibles est l'hétérogénéité de cette dernière. De plus nous avons un effectif réduit, avec peu de DGF (seulement 5, ce qui nous a contraint à comparer les patients IGF aux non-IGF), ce qui affaiblit la puissance de notre étude, et avons utilisé des outils statistiques contraignants afin de ne pas surestimer nos résultats (correction des p-values en univarié, test de permutations et validation croisée en multivarié). Nous n'avons pas pu retrouver les résultats de Guy *et al.* qui avaient montré une diminution de l'inosine, du gluconate et du glucose chez les patients en DGF, ainsi qu'une augmentation de la leucine (13). Cela peut être expliqué par les temps de prélèvement différents entre nos deux travaux (précoces pour Guy *et al.* versus tardif dans notre étude). Nous pouvons d'ailleurs noter que si le glucose était significativement diminué aux deux temps d'exploration, ce n'était pas le cas des autres paramètres (inosine diminuée uniquement à 45 min, gluconate uniquement à 4 h, leucine uniquement augmentée à 45 minutes). Dans cette étude, les greffons rénaux étaient dans un premier temps conservés par SCS puis ont été mis sur HMP à l'arrivée dans leur laboratoire, contrairement à notre étude où l'organe a été immédiatement placé sur HMP après prélèvement chez le donneur, ce qui peut également impacter la comparaison directe de nos résultats. Nous pouvons par ailleurs relever que les métabolites impliqués dans cette réponse clinique ne sont pas les mêmes entre l'étude de Guy *et al.* et celle de Bon *et al.* Ces données montrent qu'il n'y actuellement pas suffisamment de preuves pour utiliser le profil métabolomique des liquides de perfusion comme outil évaluateur de la qualité des greffons, comme suggéré par une récente revue (57).

L'intérêt d'étudier le profil métabolomique des liquides de perfusion n'est cependant pas à exclure. En effet, ce dernier est toujours utilisé pour démontrer par exemple des différences de métabolisme entre une conservation par SCS par rapport à HMP (58), ou bien encore renseigner sur l'impact de l'ajout de molécules pharmacologiquement actives dans les liquides de conservation ou d'une supplémentation en oxygène (59–61).

Nous avons également évalué si l'expression transcriptionnelle des transporteurs tubulaires rénaux pouvait prédire la reprise de fonction du greffon dans notre cohorte. Certains de ces transporteurs apparaissent comme étant sensibles à l'ischémie et la modulation de leur activité peut avoir des conséquences potentiellement délétères sur cette période post implantatoire, notamment par défaut d'élimination de toxines urémiques ou altération de la pharmacocinétique de médicament utilisés en transplantation (14). Dans cette étude, nous n'avons pas trouvé de relation entre la reprise de fonction du greffon et l'expression transcriptionnelle des transporteurs. Cependant, cette conclusion n'est pas

définitive puisque seule l'expression transcriptionnelle a été évaluée. Cela démontre l'intérêt de la réalisation de futures études étudiant également l'expression protéique et la localisation cellulaire de ces transporteurs, de même que la cinétique de leur évolution, dans un contexte clinique ou plus fondamental.

V. Conclusion

Au cours de cette étude, nous n'avons pas identifié de biomarqueurs prédictifs de la reprise de fonction du greffon à partir du contenu métabolomique du liquide de perfusion ou de l'expression transcriptionnelle des principaux transporteurs tubulaires rénaux. Cependant, nous avons observé des différences profondes entre les profils métabolomiques des liquides collectés en fin de perfusion et celui du soluté de conservation initial (KPS®-1), témoins d'une persistance d'activité métabolique au cours de la perfusion dans cet environnement *ex vivo*, hypothermique et hypoxique qu'est l'HMP. Nous avons également retrouvé des variations de niveaux de nombreux métabolites en fonction des différentes durées de perfusion des patients. Pour certains de ces métabolites, nos résultats sont consistants avec les précédents travaux ayant été réalisés. D'autres n'avaient jamais été étudiés dans ce contexte et leurs variations nous permettent d'améliorer nos connaissances des phénomènes survenant au cours de la conservation des greffons sur HMP. L'expression transcriptionnelle des transporteurs, en revanche n'était pas corrélée avec les variations de ces métabolites dans notre étude, ni avec la durée de perfusion. Nos travaux supportent la conduite d'études supplémentaires, évaluant les ratios de métabolites entre les milieux extracellulaire et intratissulaire afin de les mettre en lien avec les transporteurs (expression transcriptionnelle, protéique et localisation cellulaire). Dans cette optique, un modèle d'ischémie-reperfusion *in vitro* a été développé dans le cadre d'une thèse universitaire réalisé au sein de l'équipe Inserm U1248 de Limoges afin de rechercher les altérations métabolomiques (analyse du surnageant de culture et du milieu intracellulaire par LC-MS/MS) et de fonctionnalité des transporteurs membranaires (étude de transport par système *transwell*) survenant au cours de différents temps d'ischémie et de reperfusion sur des cellules tubulaires rénales humaines et les résultats sont actuellement en cours d'exploitation.

VI. Bibliographie

1. WHO | Projections of mortality and causes of death, 2016 to 2060 [Internet]. [cité 22 mai 2021]. Disponible sur: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/
2. Rapport annuel d'activité de l'agence de la biomédecine relatif à [Internet]. [cité 25 juill 2021]. Disponible sur: <https://rams.agence-biomedecine.fr/greffe-renale-0>
3. Wong G, Teixeira-Pinto A, Chapman JR, Craig JC, Pleass H, McDonald S, et al. The Impact of Total Ischemic Time, Donor Age and the Pathway of Donor Death on Graft Outcomes After Deceased Donor Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2017;101(6):1152-8.
4. Nieuwenhuijs-Moeke GJ, Pischke SE, Berger SP, Sanders JSF, Pol RA, Struys MMRF, et al. Ischemia and Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Relevant Mechanisms in Injury and Repair. *J Clin Med*. 17 janv 2020;9(1).
5. Ponticelli C. Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. juin 2014;29(6):1134-40.
6. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant*. 24 juin 2015;5(2):52-67.
7. Menke J, Sollinger D, Schamberger B, Heemann U, Lutz J. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft. *Curr Opin Organ Transplant*. août 2014;19(4):395-400.
8. Peng P, Ding Z, He Y, Zhang J, Wang X, Yang Z. Hypothermic Machine Perfusion Versus Static Cold Storage in Deceased Donor Kidney Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Artif Organs*. mai 2019;43(5):478-89.
9. Barin-Le Guellec C, Largeau B, Bon D, Marquet P, Hauet T. Ischemia/reperfusion-associated tubular cells injury in renal transplantation: Can metabolomics inform about mechanisms and help identify new therapeutic targets? *Pharmacol Res*. 2018;129:34-43.
10. Moeckli B, Sun P, Lazeyras F, Morel P, Moll S, Pascual M, et al. Evaluation of donor kidneys prior to transplantation: an update of current and emerging methods. *Transpl Int*. mai 2019;32(5):459-69.
11. Nath J, Guy A, Smith TB, Cobbold M, Inston NG, Hodson J, et al. Metabolomic Perfusate Analysis during Kidney Machine Perfusion: The Pig Provides an Appropriate Model for Human Studies. *PLoS One* [Internet]. 12 déc 2014 [cité 6 avr 2021];9(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4264773/>
12. Bon D, Billault C, Claire B, Thuillier R, Hebrard W, Boildieu N, et al. Analysis of perfusates during hypothermic machine perfusion by NMR spectroscopy: a potential tool for predicting kidney graft outcome. *Transplantation*. 27 avr 2014;97(8):810-6.
13. Guy AJ, Nath J, Cobbold M, Ludwig C, Tennant DA, Inston NG, et al. Metabolomic analysis of perfusate during hypothermic machine perfusion of human cadaveric kidneys. *Transplantation*. avr 2015;99(4):754-9.
14. Faucher Q, Alarcan H, Marquet P, Barin-Le Guellec C. Effects of Ischemia-Reperfusion on Tubular Cell Membrane Transporters and Consequences in Kidney Transplantation. *J Clin Med*. 12 août 2020;9(8).

15. Farrow EG, White KE. Recent advances in renal phosphate handling. *Nat Rev Nephrol.* avr 2010;6(4):207-17.
16. Lee JJ, Plain A, Beggs MR, Dimke H, Alexander RT. Effects of phospho- and calciotropic hormones on electrolyte transport in the proximal tubule. *F1000Res.* 2017;6:1797.
17. Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J. Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiol Rev.* oct 2000;80(4):1373-409.
18. Ghezzi C, Loo DDF, Wright EM. Physiology of renal glucose handling via SGLT1, SGLT2 and GLUT2. *Diabetologia.* 2018;61(10):2087-97.
19. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med.* juin 2013;34(2-3):121-38.
20. Verrey F, Singer D, Ramadan T, Vuille-dit-Bille RN, Mariotta L, Camargo SMR. Kidney amino acid transport. *Pflugers Arch.* mai 2009;458(1):53-60.
21. Fenton RA, Poulsen SB, de la Mora Chavez S, Soleimani M, Dominguez Rieg JA, Rieg T. Renal tubular NHE3 is required in the maintenance of water and sodium chloride homeostasis. *Kidney Int.* 2017;92(2):397-414.
22. Rajkumar P, Pluznick JL. Acid-base regulation in the renal proximal tubules: using novel pH sensors to maintain homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1 nov 2018;315(5):F1187-90.
23. Soleimani M, Burnham CE. Physiologic and molecular aspects of the Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter in health and disease processes. *Kidney Int.* févr 2000;57(2):371-84.
24. Smith DE, Cléménçon B, Hediger MA. Proton-coupled oligopeptide transporter family SLC15: physiological, pharmacological and pathological implications. *Mol Aspects Med.* juin 2013;34(2-3):323-36.
25. Bergeron MJ, Cléménçon B, Hediger MA, Markovich D. SLC13 family of Na⁺-coupled di- and tri-carboxylate/sulfate transporters. *Mol Aspects Med.* juin 2013;34(2-3):299-312.
26. Liu X. ABC Family Transporters. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1141:13-100.
27. Liu X. SLC Family Transporters. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1141:101-202.
28. Sharom FJ. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* 7 sept 2011;50(1):161-78.
29. Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* juill 2000;9(4):427-34.
30. Molitoris BA, Dahl R, Geerdes A. Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase during ischemia. *Am J Physiol.* sept 1992;263(3 Pt 2):F488-495.
31. Jung JS, Lee RH, Koh SH, Kim YK. Changes in expression of sodium cotransporters and aquaporin-2 during ischemia-reperfusion injury in rabbit kidney. *Ren Fail.* 2000;22(4):407-21.
32. Schneider R, Sauvant C, Betz B, Otremba M, Fischer D, Holzinger H, et al. Downregulation of organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* mai 2007;292(5):F1599-1605.

33. Kwon TH, Frøkiaer J, Han JS, Knepper MA, Nielsen S. Decreased abundance of major Na(+) transporters in kidneys of rats with ischemia-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* juin 2000;278(6):F925-939.
34. Molitoris BA, Kinne R. Ischemia induces surface membrane dysfunction. Mechanism of altered Na+-dependent glucose transport. *J Clin Invest.* sept 1987;80(3):647-54.
35. Matsuzaki T, Watanabe H, Yoshitome K, Morisaki T, Hamada A, Nonoguchi H, et al. Downregulation of organic anion transporters in rat kidney under ischemia/reperfusion-induced acute [corrected] renal failure. *Kidney Int.* mars 2007;71(6):539-47.
36. Sauvant C, Schneider R, Holzinger H, Renker S, Wanner C, Gekle M. Implementation of an in vitro model system for investigation of reperfusion damage after renal ischemia. *Cell Physiol Biochem.* 2009;24(5-6):567-76.
37. Matsuzaki T, Morisaki T, Sugimoto W, Yokoo K, Sato D, Nonoguchi H, et al. Altered pharmacokinetics of cationic drugs caused by down-regulation of renal rat organic cation transporter 2 (Slc22a2) and rat multidrug and toxin extrusion 1 (Slc47a1) in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Drug Metab Dispos.* avr 2008;36(4):649-54.
38. Chu X, Bleasby K, Evers R. Species differences in drug transporters and implications for translating preclinical findings to humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* mars 2013;9(3):237-52.
39. Corrigan G, Ramaswamy D, Kwon O, Sommer FG, Alfrey EJ, Dafoe DC, et al. PAH extraction and estimation of plasma flow in human postischemic acute renal failure. *Am J Physiol.* 1999;277(2):F312-318.
40. Kwon O, Hong S-M, Blouch K. Alteration in renal organic anion transporter 1 after ischemia/reperfusion in cadaveric renal allografts. *J Histochem Cytochem.* juin 2007;55(6):575-84.
41. Huls M, van den Heuvel JJMW, Dijkman HBPM, Russel FGM, Masereeuw R. ABC transporter expression profiling after ischemic reperfusion injury in mouse kidney. *Kidney Int.* juin 2006;69(12):2186-93.
42. Vallon V. Tubular Transport in Acute Kidney Injury: Relevance for Diagnosis, Prognosis and Intervention. *Nephron.* 2016;134(3):160-6.
43. Satoh M, Hayashi H, Watanabe M, Ueda K, Yamato H, Yoshioka T, et al. Uremic toxins overload accelerates renal damage in a rat model of chronic renal failure. *Nephron Exp Nephrol.* 2003;95(3):e111-118.
44. Oliva-Damaso E, Oliva-Damaso N, Rodriguez-Esparragon F, Payan J, Baamonde-Laborda E, Gonzalez-Cabrera F, et al. Asymmetric (ADMA) and Symmetric (SDMA) Dimethylarginines in Chronic Kidney Disease: A Clinical Approach. *Int J Mol Sci.* 26 juill 2019;20(15).
45. Gondouin B, Cerini C, Dou L, Sallée M, Duval-Sabatier A, Pletinck A, et al. Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Kidney Int.* oct 2013;84(4):733-44.
46. Barreto FC, Barreto DV, Canziani MEF. Uremia Retention Molecules and Clinical Outcomes. *Contrib Nephrol.* 2017;191:18-31.
47. Liabeuf S, Cheddani L, Massy ZA. Uremic Toxins and Clinical Outcomes: The Impact of Kidney Transplantation. *Toxins (Basel).* 05 2018;10(6).

48. Massy ZA, Liabeuf S. Middle-Molecule Uremic Toxins and Outcomes in Chronic Kidney Disease. *Contrib Nephrol.* 2017;191:8-17.
49. Nigam SK, Wu W, Bush KT, Hoenig MP, Blantz RC, Bhatnagar V. Handling of Drugs, Metabolites, and Uremic Toxins by Kidney Proximal Tubule Drug Transporters. *Clin J Am Soc Nephrol.* 6 nov 2015;10(11):2039-49.
50. Wang Z, Lyu Z, Pan L, Zeng G, Randhawa P. Defining housekeeping genes suitable for RNA-seq analysis of the human allograft kidney biopsy tissue. *BMC Med Genomics.* 17 2019;12(1):86.
51. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
52. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 18 juin 2002;3(7):RESEARCH0034.
53. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 1 août 2004;64(15):5245-50.
54. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics.* déc 2019;68(1):e86.
55. Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC. Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2. *Am J Physiol Cell Physiol.* juin 2008;294(6):C1509-1520.
56. Stryjak I, Warmuzińska N, Bogusiewicz J, Łuczykowski K, Bojko B. Monitoring of the influence of long-term oxidative stress and ischemia on the condition of kidneys using solid-phase microextraction chemical biopsy coupled with liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J Sep Sci.* 18 févr 2020;
57. Guzzi F, Knight SR, Ploeg RJ, Hunter JP. A systematic review to identify whether perfusate biomarkers produced during hypothermic machine perfusion can predict graft outcomes in kidney transplantation. *Transplant International.* 2020;33(6):590-602.
58. Nath J, Smith TB, Patel K, Ebbs SR, Hollis A, Tennant DA, et al. Metabolic differences between cold stored and machine perfused porcine kidneys: A ¹H NMR based study. *Cryobiology.* 2017;74:115-20.
59. Nath J, Smith T, Hollis A, Ebbs S, Canbilen SW, Tennant DA, et al. (13)C glucose labelling studies using 2D NMR are a useful tool for determining ex vivo whole organ metabolism during hypothermic machine perfusion of kidneys. *Transplant Res.* 2016;5:7.
60. Darius T, Vergauwen M, Smith TB, Patel K, Craps J, Joris V, et al. Influence of Different Partial Pressures of Oxygen During Continuous Hypothermic Machine Perfusion in a Pig Kidney Ischemia-reperfusion Autotransplant Model. *Transplantation.* avr 2020;104(4):731-43.
61. Hosgood SA, Hoff M, Nicholson ML. Treatment of transplant kidneys during machine perfusion. *Transpl Int.* févr 2021;34(2):224-32.

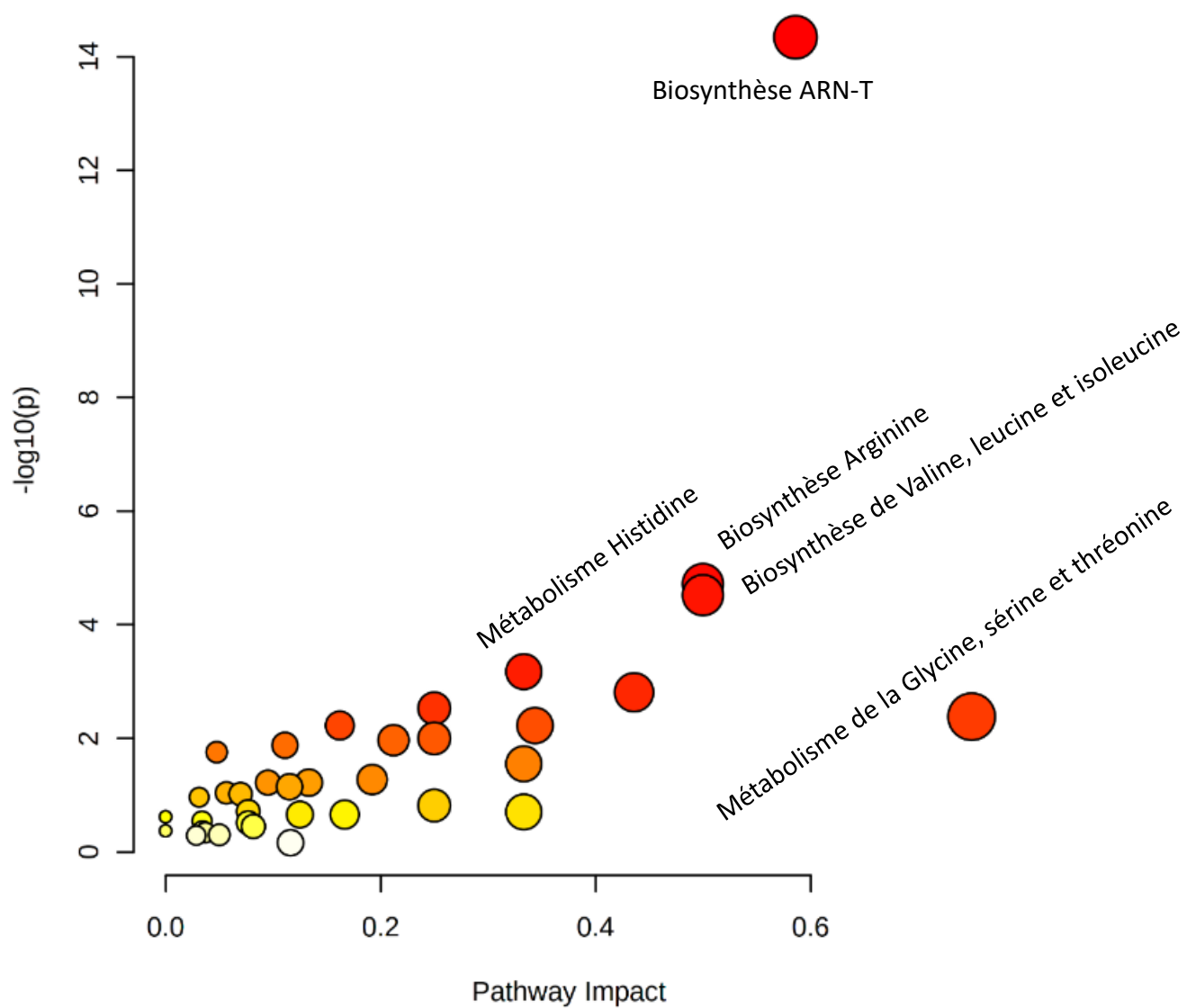
Annexe 1 : Composition du liquide de conservation KPS-1®

Composé	Concentration (g/L)
Calcium chloride (dihydrate)	0,068
Sodium hydroxide	0,70
HEPES (free acid)	2,38
Potassium phosphate (monobaic)	3,4
Mannitol (USP)	5,4
Glucose, beta D (+)	1,80
Sodium gluconate	17,45
Magnesium gluconate D(-), gluconic acid, hemimagnesium salt	1,13
Ribose, D (-)	0,75
Hydroxyethyl Starch (HES)	50,0
Glutathione (reduced form)	0,92
Adenine (free base)	0,68

Annexe 2 : Tableau récapitulatif des gènes et assays choisis

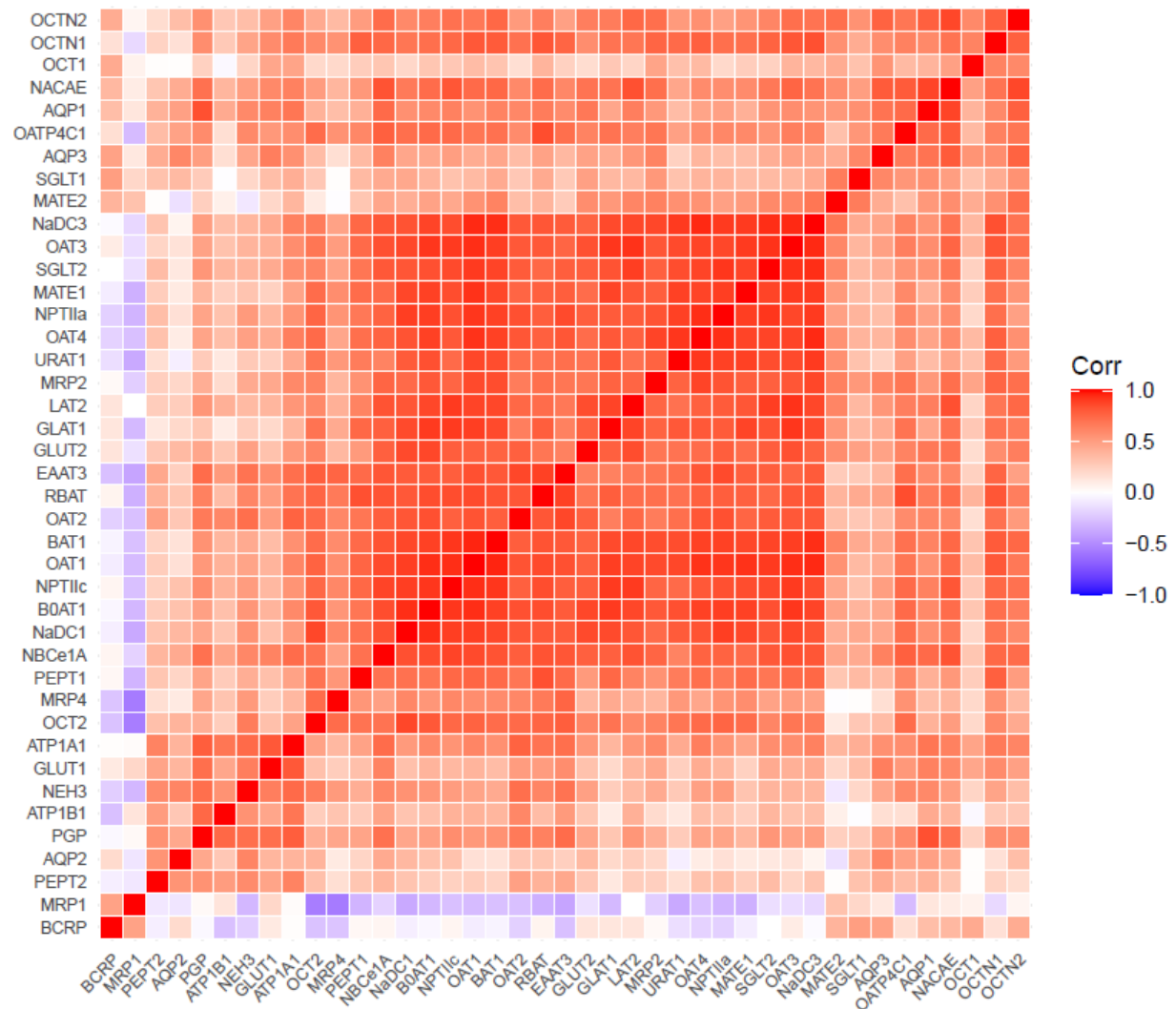
RT-PCR plaque TLDA			
Référence Thermo	Nom du gène	Synonyme	Type
Hs99999905_m1	GAPDH	-	Gènes de ménage
Hs00943494_m1	CHFR	-	
Hs00359037_m1	NME4	-	
Hs01032748_g1	NASP	-	
Hs00220422_m1	C16orf62	-	
Hs01028916_m1	AQP1	-	Aquaporines
Hs00292214_s1	AQP2	-	
Hs00185020_m1	AQP3	-	
Hs00933601_m1	ATP1A1	-	ATPase
Hs00426868_g1	ATP1B1	ATP1B	
Hs00960489_m1	ABCC2	MRP2	Transporteurs ABC
Hs00988720_g1	ABCC4	MRP4	
Hs00988721_m1	ABCC4	MRP4	
Hs01053790_m1	ABCG2	BCRP	
Hs00184500_m1	ABCB1	P-GP	
Hs01561483_m1	ABCC1	MRP1	
Hs00537914_m1	SLC22A6	OAT1	Transporteurs SLC
Hs00198527_m1	SLC22A7	OAT2	
Hs00188599_m1	SLC22A8	OAT3	
Hs01056646_m1	SLC22A8	OAT3	
Hs00945829_m1	SLC22A11	OAT4	
Hs00427552_m1	SLC22A1	OCT1	
Hs01010726_m1	SLC22A2	OCT2	
Hs00268200_m1	SLC22A4	OCTN1	
Hs00929869_m1	SLC22A5	OCTN2	
Hs00217320_m1	SLC47A1	MATE1	
Hs00945652_m1	SLC47A2	MATE2	
Hs01030727_m1	SLC22A12	URAT1	
Hs00192639_m1	SLC15A1	PEPT1	
Hs01113665_m1	SLC15A2	PEPT2	
Hs00903842_m1	SLC9A3	NHE3	
Hs00919316_g1	SLC13A2	NADC1	
Hs00955744_m1	SLC13A3	NADC3	
Hs01092910_m1	SLC34A1	NPTIIa	
Hs02341453_g1	SLC34A3	NPTIIc	
Hs00698884_m1	SLCO4C1	OATP4C1	
Hs01573793_m1	SLC5A1	SGLT1	
Hs00894642_m1	SLC5A2	SGLT2	
Hs00892681_m1	SLC2A1	GLUT1	
Hs01096908_m1	SLC2A2	GLUT2	
Hs01047033_m1	SLC4A4	NBCe1-A	
Hs01384157_m1	SLC6A19	B0AT1	
Hs00909948_m1	SLC7A7	y+LAT-1	
Hs00794796_m1	SLC7A8	LAT2	
Hs00374243_m1	SLC3A2	-	
Hs00942976_m1	SLC3A1	RBAT	
Hs00204638_m1	SLC7A9	BAT1	
Hs00188172_m1	SLC1A1	EAAT3	

Annexe 3 : Analyse de voies biologiques des composés retrouvés exclusivement dans les échantillons de patients

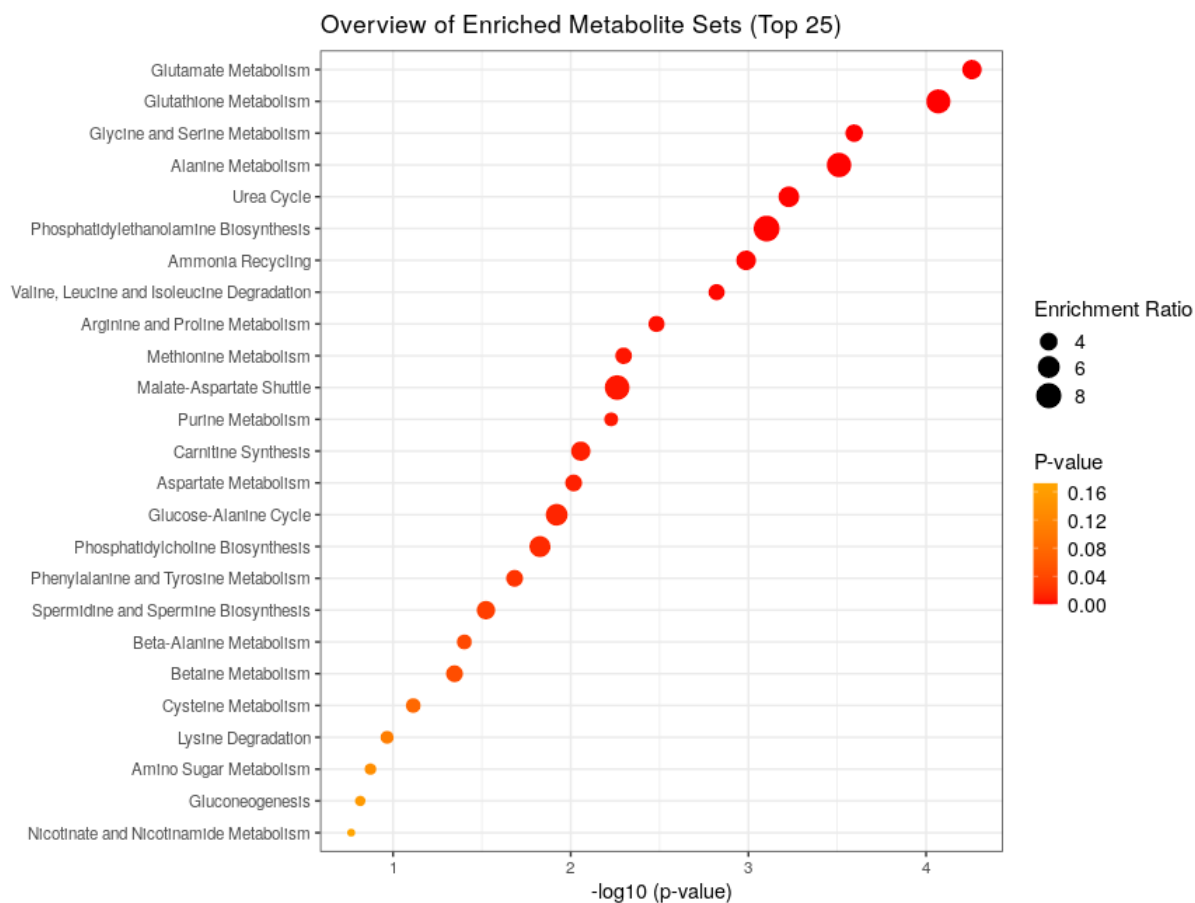


Annexe 4 ; Matrice de corrélation entre les transporteurs retrouvés dans les biopsies préimplantatoires.

Le rouge et le bleu indiquent des corrélations positives et négatives, respectivement.



Annexe 5: Analyse de voies biologiques basée sur les métabolites les plus importants (VIP >0.8) du modèle PLS-DA entre les groupes réalisés selon la durée de perfusion.



ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) **Hugo ALARCAN**.....

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : **21809492**

N° Thèse : **79**

Nom et Prénom : **Alarcan Hugo**

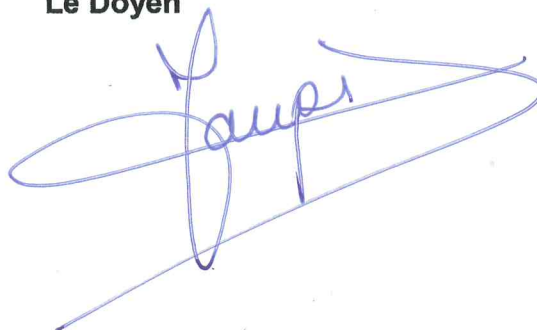
Sujet : « EVALUATION DU CONTENU METABOLOMIQUE DU LIQUIDE DE PERFUSION ET DE L'EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE
DE TRANSPORTEURS TUBULAIRES LORS DE LA CONSERVATION DE GREFFONS RENAUX SUR MACHINE A PERFUSION HYPOTHERMIQUE »

Tours, le : **28/09/2021**

Le(s) Directeur(s) de Thèse :



**Vu et Transmis :
Le Doyen**



ALARCAN, HUGO

N° 79

TITRE DE LA THÈSE

Evaluation du contenu métabolomique du liquide de perfusion et de l'expression transcriptionnelle de transporteurs tubulaires lors de la conservation de greffons rénaux sur machine à perfusion hypothermique.

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Le contenu métabolomique du liquide de conservation de greffons rénaux préservés sur machine à perfusion hypothermique (HPM) a précédemment été associé à la durée de perfusion ainsi qu'à la reprise de fonction du greffon. Ces modifications du contenu métabolomique pourraient être en lien à une variation de l'activité de transporteurs tubulaires rénaux, responsables du transfert bidirectionnel de nombreuses substances.

Dans ce contexte, nous avons déterminé les profils métabolomiques de liquides de conservation (n=35) collectés en fin de perfusion de greffons rénaux conservés sur HMP, dans le cadre du protocole d'étude clinique RENALIFE (ClinicalTrials.gov : NCT03024229). L'expression transcriptionnelle de 40 transporteurs tubulaires rénaux a également été déterminée à partir de biopsies préimplantatoires (n=26) à l'aide de la technologie *Taqman Low density Array*®.

Soixante-douze métabolites ont été retrouvés dans les liquides de perfusion, dont 40 % déjà présents dans le liquide de conservation initial. Nous avons observé une augmentation significative des niveaux de 23 métabolites pour des temps de perfusion plus longs tandis que 8 ont eu leurs concentrations diminuées. L'analyse multivariée (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) explorant la relation entre durée de perfusion et contenu métabolomique était significative et a montré de bonnes performances ($R^2=76\%$, $Q^2=54\%$, $accuracy=41\%$). En revanche le niveau d'expression de tous les transporteurs tubulaires étudiés n'était pas significativement associé à la durée de perfusion ni au contenu métabolomique. Nous n'avons pas non plus identifié de biomarqueurs prédictifs de la reprise de fonction du greffon.

Pour conclure, cette étude a permis d'améliorer nos connaissances des phénomènes survenant au cours de la conservation des greffons sur HMP par les modifications du contenu métabolomique observées en lien avec la durée de perfusion. Ces travaux supportent la conduite d'études supplémentaire, évaluant les ratios de métabolites entre les milieux extracellulaire et intratissulaire afin de les mettre en lien avec l'activité des transporteurs.

MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS DE SON CONTENU, ATTRIBUÉS PAR LE CANDIDAT EN LIAISON AVEC LA BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE ET LES MEMBRES DU JURY

Transplantation rénale ; Ischémie ; Machine à perfusion hypothermique; Transporteurs tubulaires rénaux ; Analyse multivariée; métabolomique.

JURY

PRÉSIDENT : Pr Patrick Emond, pharmacien, PU-PH, Faculté de pharmacie - Tours

MEMBRES :

Pr Hélène Blasco, pharmacien, PU-PH, Faculté de médecine - Tours

Pr Pierre Marquet, médecin, PU-PH, Faculté de médecine – Limoges

Dr Chantal Barin-Le Guellec, pharmacien, MCU-PH, Faculté de médecine – Tours

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : 24 septembre 2021, UFR de Sciences Pharmaceutiques, TOURS