



**HAL**  
open science

# Caractéristiques métabolomiques et expression des biomarqueurs urinaires des patients développant une insuffisance rénale aiguë post circulation extracorporelle

Baptiste Fohlen

► **To cite this version:**

Baptiste Fohlen. Caractéristiques métabolomiques et expression des biomarqueurs urinaires des patients développant une insuffisance rénale aiguë post circulation extracorporelle. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-02051954

**HAL Id: dumas-02051954**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02051954>**

Submitted on 28 Feb 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4*

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10*

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES  
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2018

N° 71

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE  
DOCTEUR EN MÉDECINE

Caractéristiques métabolomiques et expression des biomarqueurs  
urinaires des patients développant une insuffisance  
rénale aiguë post circulation extracorporelle

Présentée et soutenue publiquement  
le 5 juin 2018

Par

***Baptiste FOHLEN***

Né le 24 août 1988 à Chamonix-Mont-Blanc (74)

Dirigée par Mme Le Docteur Thi Mum Huynh, CCA

Jury :

M. Le Professeur Bernard Colley , PU-PH ..... Président

M. Le Professeur Romain Pirracchio, PU-PH

M. Le Professeur Alexandre Mebazaa, PU-PH

M. Le Docteur Nicolas Pallet, MCU-PH



## Remerciements

---

Au Pr Bernard Cholley, pour avoir accepté de présider ce jury, de m'avoir donné la possibilité de faire ce travail et de m'avoir accompagné tout au long de sa réalisation et de mon internat. C'est un honneur de pouvoir continuer à travailler avec vous.

Au Pr Romain Pirracchio, pour avoir accepté de siéger dans de ce jury, pour vos conseils toujours avisés et pour l'honneur d'avoir accepté de m'intégrer dans votre équipe à Pitié-Salpêtrière.

Au Pr Alexandre Mebazaa, pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail sans me connaître. Veuillez recevoir l'expression de ma gratitude et mes remerciements sincères.

Au Dr Nicolas Pallet, pour avoir accepté de faire part de ce jury, pour votre aide précieuse et votre disponibilité, au plaisir de travailler de nouveau avec vous.

Au Dr Thi Mum Huynh, pour m'avoir guidé et soutenu tout au long de la réalisation de ce travail, merci pour toute l'aide apportée.

A Laure, merci pour ton soutien quotidien depuis toutes ces années.

A mes parents et ma famille, merci de m'avoir supporté et soutenu tout au long de ces études de médecine,

A mes amis, mes co internes, tous mes anciens collègues,

Un grand merci !

## Liste des abréviations

---

Activated clotting time: ACT  
Activated transcription factor 6: ATF6  
Acute kidney injury following cardiac surgery: AKICS  
Acute kidney injury: AKI  
Agression rénale aigue: ARA  
Aire sous la courbe: AUC  
Anti-inflammatoires non stéroïdiens: AINS  
Circulation extra corporelle: CEC  
Débit de filtration glomérulaire: DFG  
Epuration extra rénale: EER  
Fonction ventriculaire gauche: FEVG  
Hypertension artérielle pulmonaire : HTAP  
Inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ :IRE1 $\alpha$   
Kidney Disease Improving Global Outcomes: KDIGO  
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: NGAL  
Polynucléaires neutrophiles: PNN  
Pression artérielle moyenne: PAM  
Pression artérielle pulmonaire systolique : PAPs  
Pression veineuse central: PVC  
Protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase: PERK  
Réticulum endoplasmique: RE  
Système rénine angiotensine : SRA  
Unfolded protein response: UPR

## Table des matières

---

Remerciements .....	2
Liste des abréviations .....	3
Table des matières .....	4
Introduction .....	5
Chapitre 1 : Chirurgie cardiaque sous circulation extra corporelle chez l'adulte. ....	5
Chapitre 2 : Agression rénale aiguë après chirurgie cardiaque sous circulation extracorporelle.....	5
Chapitre 3 : Diagnostic de l'agression rénale péri-opératoire.....	9
Chapitre 4 : Objectif.....	12
Partie 1: matériels et méthodes.....	13
Chapitre 1 : Patients .....	13
Chapitre 2 : Critère de jugement .....	13
Chapitre 3 : Procédures chirurgicales et anesthésiques.....	13
Chapitre 4 : Recueil prospectif.....	14
Chapitre 5 : Mesure des biomarqueurs.....	15
Chapitre 6 : Analyse statistique.....	15
Chapitre 7 : Ethique.....	16
Partie 2 : résultats .....	17
Chapitre 1 : Population de l'étude.....	17
Chapitre 2 : Description de la population.....	18
Chapitre 3 : Analyse des biomarqueurs.....	22
Chapitre 4 : Analyse du métabolome .....	24
Partie 3 : discussion.....	31
Chapitre 1 : Population de l'étude.....	31
Chapitre 2 : Incidence de l'ARA dans notre population .....	33
Chapitre 3 : Réponse adaptative.....	34
Chapitre 4 : Données manquantes ou non utilisées dans notre analyse .....	36
Conclusion.....	38
Bibliographie.....	39
Annexes .....	51

## Introduction

---

### **Chapitre 1 : Chirurgie cardiaque sous circulation extra corporelle chez l'adulte.**

La chirurgie cardiaque a connu un essor considérable au cours du siècle précédent grâce à la circulation extracorporelle (CEC)(1–3). Le nombre d'actes de chirurgie cardiaque en France en 2010 était de 42 032 (4).

La chirurgie cardiaque des pathologies acquises est dominée par la chirurgie de revascularisation coronaire et par la chirurgie valvulaire. D'après les données de la société française de chirurgie thoracique et cardiovasculaire (4), environ 14 000 pontages coronaires et 19 000 chirurgies valvulaires dont la majorité sous CEC sont réalisés chaque année.

Du fait de l'essor ces dernières années de la chirurgie cardiaque pédiatrique, un grand nombre de patients atteints de cardiopathies congénitales arrivent désormais à l'âge adulte. Environ 15 à 20 % des cardiopathies congénitales opérées dans l'enfance, devront bénéficier d'une ré-intervention (5).

### **Chapitre 2 : Agression rénale aiguë après chirurgie cardiaque sous circulation extracorporelle**

#### **2.1. Définition**

La définition de l'agression rénale aiguë (ARA ou AKI, Acute Kidney Injury en anglais) a plusieurs fois évolué au cours des dernières années. La dernière recommandation a établi la classification KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes, annexe 1) (6) qui prend en compte le débit urinaire et la variation de la créatininémie péri opératoire pour déterminer l'insuffisance rénale aiguë.

Afin d'évaluer le risque d'ARA en chirurgie cardiaque, plusieurs scores ont été proposés (le score de Cleveland (Annexe 2), le score AKICS (acute kidney injury following cardiac surgery, annexe 3). Le score de Cleveland a été proposé par Thakar et al. (7) à partir d'une étude portant sur cohorte de 3317 patients entre 1993 et 2002. Bien qu'initialement proposé pour évaluer le risque d'épuration extra rénale (EER) après chirurgie cardiaque, ce score est également utilisé et validé pour prédire des ARA moins sévères (8–10). Ses principaux critères sont: une insuffisance rénale chronique pré opératoire, une chirurgie en urgence et l'association d'une chirurgie valvulaire avec un pontage coronarien.

## **2.2. Epidémiologie**

L'agression rénale aiguë est un sujet majeur de santé publique. Elle atteint 7 à 18% des patients hospitalisés (12,13) et est associée à une mortalité élevée. Dans le monde, on estime que la mortalité liée à l'ARA est supérieure à celles du cancer du sein, du cancer de la prostate, du diabète et de l'insuffisance cardiaque combinés (13). Le développement d'une maladie rénale chronique et d'une morbidité cardiovasculaire sont désormais reconnus comme des conséquences à long terme de l'ARA du fait de nombreux mécanismes (réparation tissulaire inadaptée, régénération cellulaire désordonnée) (14).

Après le sepsis, la période péri opératoire est l'étiologie principale d'ARA (15). De nombreuses recherches sont en cours afin de mieux diagnostiquer, prévenir et traiter cette complication.

Avec les anciennes définitions, l'incidence de l'ARA péri opératoire était estimée entre 1 et 31%. On estime désormais qu'elle concerne près de 50% des chirurgies majeures (16,17).

L'incidence des ARA au décours des interventions de chirurgie cardiaque sous CEC est estimée entre 20 et 30 % (18–20). La survenue d'une ARA en post opératoire est associée à une hausse de la morbidité, de la durée d'hospitalisation, du coût d'hospitalisation et de la mortalité à long terme (20–22).

## **2.3. Physiopathologie des lésions rénales péri opératoires**

La physiopathologie des lésions rénales après chirurgie cardiaque sous CEC est très complexe et n'est pas encore complètement comprise (20,23). Les principaux facteurs étiologiques classiquement mis en cause sont :

- la néphrotoxicité directe,
- l'hypoxie régionale,
- les lésions traumatiques de l'hémoglobine,
- l'inflammation.

### **2.3.1. Néphrotoxicité directe**

Les patients sont exposés à des médicaments néphrotoxiques au cours de la période opératoire.

Avant la chirurgie, un traitement interfère avec le système rénine angiotensine (SRA) (inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC), inhibiteurs des récepteurs de l'angiotensine II) perturbe la régulation du débit sanguin rénal. Ceci conduit à une hypo-perfusion rénale



secondaire, à une diminution de la pression de perfusion rénale et de la pression capillaire glomérulaire par inhibition de la vasoconstriction de l'artériole efférente (24,25).

Un traitement par anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) provoque une dysrégulation du débit sanguin rénal conduisant à une hypo perfusion rénale (par inhibition des cyclo oxygénase I et II provoquant une vasoconstriction intra rénale) (26,27).

L'utilisation des diurétiques de l'anse, notamment à haute dose, peut s'avérer néphrotoxique (28,29). Une injection de produit de contraste iodé juste avant la chirurgie est également responsable d'une toxicité avérée dans la littérature (30,31).

Durant la chirurgie, le choix des solutés de remplissage vasculaire peut également favoriser la survenue de lésions rénales (32). En effet, la réaction inflammatoire systémique secondaire à la CEC peut être comparée au sepsis dans lequel l'utilisation des hydroxy-éthyl-amidons et des gélatines n'est pas recommandée (33–35).

### **2.3.2. Hypoxie régionale**

Certaines régions anatomiques et fonctionnelles rénales telles que la médulla ou le tubule ont des besoins métaboliques élevés ce qui les rend très sensibles à l'hypoxémie (36)

Cette dernière peut résulter :

- d'une vasoconstriction secondaire aux lésions endothéliales (37,38) ;
- d'embolies dus à l'athérosclérose, en particulier lors de la canulation aortique et de la manipulation des clamps aortiques (39,40).

L'hémodilution participe également à l'hypoxie régionale par la baisse du transport artériel en oxygène, ce qui en fait un déterminant majeur au cours de la CEC (41–43).

De la même façon, le débit non pulsé sous CEC participe probablement à la diminution de la perfusion rénale et à l'hypoxémie régionale (44–46).

Une étude récente a évalué le transport en oxygène rénal sous CEC et a observé un déficit d'oxygénation rénale responsable d'une nécrose tubulaire malgré le maintien des débit de CEC standard (47).

### **2.3.3. Lésions traumatiques de l'hémoglobine**

Des lésions mécaniques du globule rouge sont causées par les pompes sous CEC, en particulier les pompes à galets (48), l'oxygénateur, le circuit et le récupérateur de sang épanché dans le champ opératoire CellSaver®. Cela entraîne une hémolyse et une libération d'hémoglobine et d'ion fer (49,50) responsables d'un stress oxydatif qui participe à la genèse de l'ARA.

#### **2.3.4. Inflammation**

La CEC entraîne un syndrome de réponse inflammatoire systémique bien décrit dans la littérature qui semble être provoqué par le contact entre le sang et la surface du circuit de CEC (51). Ce syndrome de réponse inflammatoire est caractérisé par l'activation des polynucléaires neutrophiles, des plaquettes, de l'endothélium et du facteur XII. Cette cascade inflammatoire aboutit à l'augmentation de la production des radicaux libres, des cytokines et de protéases, ainsi qu'à une augmentation de l'agrégation plaquettaire et des troubles de la coagulation qui sont directement mis en cause dans les lésions rénales. Les mécanismes inflammatoires impliqués sont très complexes mais la composante inflammatoire est essentielle dans l'agression rénale en chirurgie cardiaque (52,53).

#### **2.4. Facteurs de risque d'agression rénale aiguë péri-opératoire sous CEC**

Les facteurs de risque d'ARA per CEC sont nombreux, la plupart découlent de la physiopathologie des lésions rénales vues précédemment.

##### **2.4.1. Facteurs de risque pré opératoire**

Les facteurs identifiables en pré opératoire sont :

- La dysfonction rénale pré opératoire,
- Une altération de la fonction ventriculaire gauche (FEVG) (7,54,55),
- L'âge (55-60),
- Le diabète insulino-dépendant (7,55,56),
- Le sexe féminin (7,56),
- Les bronchopathies chroniques obstructives (7,54),
- L'obésité morbide (60,61),
- Le traitement pré opératoire par des médicaments néphrotoxiques (26,28,60),
- L'injection de produit de contraste iodé en pré opératoire (30,31),
- L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)(62).

Un certain nombre de ces items se retrouve dans l'Euroscore 2 (63,64) (annexe 4) qui permet d'évaluer le risque opératoire lié à la chirurgie cardiaque.

##### **2.4.2. Facteurs de risque per opératoire**

Les facteurs de risques per opératoires les plus fréquemment décrits dans la littérature sont:

- la durée de CEC > 60 min (28,55,60,65-67),

- la durée du clampage aortique (29,68,69),
- le type et le nombre de procédures chirurgicales (les chirurgies valvulaires et l'association d'un pontage coronarien avec une autre procédure) (19,62,70,71),
- l'hémodynamique per opératoire:
  - le débit de CEC < 1.8 L/min/m<sup>2</sup> (72),
  - la pression artérielle moyenne (PAM) per opératoire (19,68,69,73-77),
  - l'oligurie (78),
  - la pression veineuse centrale (PVC) (79),
- l'hypothermie per opératoire et la vitesse de réchauffement per CEC (80-82),
- l'hémodilution (41,83-87),
- la transfusion per opératoire (86,88,89).

#### **2.4.3. Facteurs de risque post opératoire**

Les facteurs de risques post opératoires d'ARA sont peu spécifiques de la chirurgie cardiaque sous CEC, on retrouve des facteurs classiques d'AKI post opératoire (11,16,28,29,70,90) :

- la reprise chirurgicale,
- l'instabilité hémodynamique post opératoire,
- le sepsis,
- l'utilisation de médicaments néphrotoxiques durant cette période.

### **Chapitre 3 : Diagnostic de l'agression rénale péri-opératoire.**

#### **3.1. Créatininémie**

La classification KDIGO est la classification de référence pour l'ARA et sera utilisée dans ce travail. Elle se base essentiellement sur la variation de la créatininémie au cours des 7 premiers jours et sur le débit urinaire. La créatinine est un marqueur de la fonction glomérulaire, elle met en jeu de nombreux facteurs rénaux et extrarénaux. Sa variation est retardée dans le temps, ce qui en fait un marqueur peu sensible de dysfonction rénale post opératoire (91,92).

#### **3.2. Biomarqueurs**

Les biomarqueurs ont connu un essor ces dernières années du fait des limitations des autres moyens de diagnostic de l'ARA décrits précédemment. Plusieurs biomarqueurs

plasmatiques et urinaires ont été explorés. Le biomarqueur idéal doit être capable de détecter une ARA en amont des lésions tissulaires afin de pouvoir les prévenir (93–95).

De nombreuses études ont présenté NGAL (neutrophilgelatinase-associated lipocalin) comme un potentiel biomarqueur de l'ARA. Bien que la littérature récente soit riche en étude concernant NGAL, son utilisation en pratique clinique reste peu fréquente et non validée (96,97). L'inflammation entraîne la synthèse de cette protéine de 25 kDalton de la famille des lipocalines et son relargage par les polynucléaires neutrophiles (PNN) sans spécificité d'organe. NGAL a un rôle bactériostatique mais également anti apoptotique.

Les dernières données disponibles montrent que NGAL (plasmatique ou urinaire) n'est pas assez spécifique pour différencier une ARA d'une autre atteinte d'organe (98–101) au cours de la chirurgie cardiaque et des autres situations cliniques en général.

En chirurgie cardiaque, une méta-analyse récente (102) a observé une aire sous la courbe (AUC) de 0,70 pour NGAL urinaire mesuré en intra opératoire et de 0,72 pour sa mesure en post opératoire précoce dans la prédiction d'une ARA post opératoire. De plus la mesure du NGAL plasmatique dans les 24h post opératoires avait une AUC < 0,70. L'expression de NGAL en per opératoire et en particulier durant la CEC ne semble pas corrélée avec l'apparition ou la sévérité d'une ARA (103) et est moins performante que la mesure de la créatinine plasmatique (102,104).

Plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer le manque de performance diagnostic de NGAL (97):

- la préexistence d'une maladie rénale chronique est associée à un niveau basal de NGAL plus élevé que la population générale (105,106),
- les tests détectant NGAL ne différencient pas les multiples formes moléculaires sécrétées par les différents tissus, ainsi, lors d'une inflammation systémique (secondaire à un sepsis ou en post-CEC), ce biomarqueur est relargué par les PNN ce qui augmente sa concentration plasmatique puis sa filtration glomérulaire et son excrétion urinaire de manière indépendante d'une quelconque atteinte rénale débutante (107,108).

### **3.3. Approche métabolomique**

#### **3.3.1. La réponse adaptative du réticulum endoplasmique**

Les perturbations physiopathologiques liées à l'ARA entraînent les cellules rénales à engager une réponse adaptative pour réduire l'intensité du stress auquel elles sont soumises

par des mécanismes de reprogrammation métabolique, des signaux pro ou anti apoptotiques et l'établissement de connexion avec le milieu extra cellulaire et en particulier le système immunitaire (109,110).

La détection de cette réponse adaptative pour effectuer un diagnostic précoce des lésions rénales fait partie des pistes d'avenir notamment dans le domaine de l'ARA (111). Ces réponses moléculaires et cellulaires se produisent très précocement après l'exposition au facteur de stress, bien avant la mort cellulaire ou les processus de réparation cellulaire (112,113). Leur détection pourrait ainsi permettre de déceler un processus en cours avant l'apparition des lésions rénales.

La réponse adaptative du réticulum endoplasmique (RE) nommée UPR (unfolded protein response) est la réponse au stress lié à l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE. Cette UPR est amorcée par un large panel de perturbations de l'environnement cellulaire comme la carence énergétique, la dysrégulation calcique, l'hypoxie, la réponse inflammatoire qui sont des phénomènes directement impliqués dans l'ARA (114–116). L'objectif de la réponse UPR est d'adapter le métabolisme cellulaire à l'environnement et de rétablir la fonction normale du RE (116). Il existe 3 axes majeurs impliqués dans cette UPR représentés par 3 médiateurs:

- ATF6 (activated transcription factor 6),
- IRE1 $\alpha$  (inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ ),
- PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase), dont NGAL serait également un des éléments (117).

### **3.3.2. Angiogénine**

L'angiogénine est une ribonucléase qui fait partie de l'UPR par l'intermédiaire de l'axe IRE1 $\alpha$  (inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ ) au sein des cellules épithéliales. Elle régule l'homéostasie cellulaire pendant le stress du RE par l'intermédiaire de la production de fragments d'ARN de transfert qui interfèrent avec l'initiation de la traduction et atténuent le stress du RE. Il a été également observé que l'angiogénine urinaire pouvait être considérée comme un potentiel biomarqueur non invasif d'ARA. En effet, sa concentration urinaire reflète un processus inflammatoire rénal en cours ainsi qu'une atteinte tubulaire. L'augmentation de son excrétion urinaire serait donc le signal d'alarme d'une ARA en cours. De plus, un travail récent a également montré que l'angiogénine urinaire était un indicateur des dommages tissulaires chez les patients transplantés rénaux atteints de rejet aigu (118).

Ce potentiel biomarqueur urinaire n'a jamais été évalué en péri opératoire ou en chirurgie cardiaque. Toutefois son étude pourrait être intéressante, en particulier l'étude de l'activation de la voie IRE1 $\alpha$ .

### **3.3.3. Le métabolome rénal urinaire**

Le métabolome urinaire est l'ensemble des molécules de bas poids moléculaire (métabolites) présentes dans les urines. L'analyse du métabolome peut se faire par résonance magnétique nucléaire (119) : on obtient alors une « photographie » ou une « empreinte digitale » des différents métabolites sécrétés par le rein. Ceci ne permet pas d'identifier précisément les métabolites (120,121) mais la comparaison dans le temps du métabolome urinaire permet une analyse rapide des modifications physiologiques impliquées dans le processus d'ARA. L'analyse du métabolome urinaire pourrait également être une première étape vers l'identification de nouveaux biomarqueurs d'ARA (122).

## **Chapitre 4 : Objectif**

L'objectif principal de cette étude était de caractériser les variations du métabolome urinaire des patients développant une ARA au décours d'une chirurgie cardiaque programmée.

Les objectifs secondaires étaient:

- L'évaluation des facteurs de risques d'ARA post CEC habituellement retrouvés dans la littérature, notamment la PAM per CEC.
- l'évaluation de l'angiogénine urinaire et du NGAL urinaire comme biomarqueurs d'ARA post CEC.

## Partie 1: matériels et méthodes

---

Nous avons effectué une étude exploratoire au sein du service d'anesthésie-réanimation de l'hôpital européen Georges Pompidou.

### Chapitre 1 : Patients

#### 1.1. Critères d'inclusion

Tous les patients opérés d'une chirurgie cardiaque programmée sous CEC à l'hôpital européen Georges Pompidou et ne présentant pas de critère de non-inclusion.

#### 1.2. Critères de non inclusion

Les critères de non inclusion de l'étude comprenaient un débit de filtration glomérulaire de base (DFG)  $<30\text{ml/min/1,73m}^2$ , l'injection d'un produit de contraste iodé dans les 24h avant l'intervention chirurgicale, une FEVG pré opératoire  $<40\%$ , un âge  $< 18$  ans, une grossesse en cours et l'incapacité de donner son consentement.

### Chapitre 2 : Critère de jugement

#### 2.1. Critère de jugement principal

Le critère de jugement principal était :

- La caractérisation des variations du métabolome rénal per CEC.

#### 2.2. Critères de jugement secondaires

Les critères de jugement secondaires étaient :

- La mise en évidence d'une corrélation entre la PAM per CEC et une ARA post opératoire,
- Etude du biomarqueur urinaire NGAL au décours de la CEC,
- Etude du biomarqueur urinaire angiogénine au décours de la CEC.

### Chapitre 3 : Procédures chirurgicales et anesthésiques

Les patients étaient inclus dans l'étude après information et recueil du consentement en consultation d'anesthésie ou en visite pré anesthésique la veille de la chirurgie.

Les médicaments interagissant avec le SRA et les diurétiques étaient arrêtés avant l'opération selon les recommandations en vigueur (11).

L'anesthésie générale était réalisée selon les protocoles du département d'anesthésie. L'induction et l'entretien étaient effectués en intraveineux avec du propofol et du sufentanil au moyen d'un système d'AIVOC (anesthésie à objectif de concentration). Le curare utilisé lors de toutes les procédures était l'atracurium.

Une injection d'acide tranexamique était réalisée en fonction du poids avant et après la CEC.

Le débit de la circulation extra corporelle était calculé en utilisant l'équation suivante: débit (l/min) = 2,6 x surface corporelle. Une injection d'héparine était faite au départ et pendant la CEC afin d'obtenir un ACT (Activated clotting time) > 400 secondes.

En sortie de CEC, une dose de protamine était injectée selon un rapport 1:1 de la dose totale d'héparine administrée et l'antagonisation complète était vérifiée en réalisant un ACT au décours. La méthode de cardioplégie était choisie par le chirurgien.

Les pertes sanguines per opératoires étaient recueillies et traitées par un dispositif CellSaver® Elite® (Haemonetics™, France) et retransfusées durant la procédure lorsque cela était possible. L'administration d'agents vasotropes, inotropes, la transfusion et le remplissage vasculaire étaient réalisés selon le choix de l'équipe anesthésique en se basant sur des critères cliniques, échographiques et biologiques. A la sortie du bloc opératoire, tous les patients étaient transférés en unité de soins intensifs cardiovasculaires.

## **Chapitre 4 : Recueil prospectif**

### **4.1. Echantillons urinaires**

Trois échantillons d'urine étaient prélevés : avant la CEC, après la CEC et à J1 post opératoire.

Les échantillons urinaires étaient collectés dans des tubes Corning coniques de 50 ml et centrifugés à 2000g pendant 20 minutes dans les 4 heures suivant leur recueil. Les culots cellulaires étaient conservés dans une solution tampon (RLT® buffer (Qiagen™, France). Les surnageants et les culots cellulaires étaient stockés jusqu'aux analyses ultérieures à - 80°C.

### **4.2. Données**

Les paramètres hémodynamiques per opératoires étaient recueillis sur un moniteur Philips Intellivue® MX800. Les données étaient acquises numériquement grâce au logiciel IXTREND® version 2.1.0. FW14 (IxellenceGmbH, Allemagne). La PAM était calculée en mesurant l'aire sous la courbe de pression artérielle radiale instantanée.

Les autres données (cliniques et paracliniques) étaient extraites du dossier médical, de la feuille d'anesthésie et du logiciel Philips® IntelliSpaceCritical Care and Anesthesia®.



## **Chapitre 5 : Mesure des biomarqueurs**

### **5.1. Angiogénine et NGAL**

La quantification urinaire de NGAL et de l'angiogénine était réalisée en utilisant la méthode ELISA (Lipocalin-2/NGAL Quantikine® ELISA Immunoassays (R&D Systems, USA) selon le protocole décrit par le fabricant), sans ajustement par rapport à la créatininurie.

### **5.2. Spectrométrie par résonance magnétique des urines pour analyse du métabolome**

Les échantillons urinaires étaient préparés afin d'obtenir un volume final de 600  $\mu$ l (400  $\mu$ l d'urine; 160  $\mu$ l de 200 mM de solution tampon phosphate).

La spectrométrie par résonance magnétique était réalisée par un spectromètre Bruker Avance II® 500 MHz (BrukerBiospinGmbH, Allemagne). Le pré traitement des données était réalisé avec le logiciel MestReNova® 8.0. Les signaux acquis étaient transformés en spectre (transformée de Fourier) puis réduits selon une méthode dite d'« equidistant binning ». Les régions du spectre correspondant à l'urée (entre 5,52 et 6,06 ppm) et l'eau (4,28 à 5,24 ppm) ont été supprimées de l'analyse pour éviter toute mauvaise interprétation des métabolites et une mauvaise interprétation des données (le spectre de l'eau masque les spectres de métabolites dans la même région, rendant leur analyse impossible et l'urée est le métabolite le plus abondant dans les urines, sa forte concentration peut biaiser l'analyse ultérieure des données). La matrice obtenue normalisée était mise à l'échelle par la méthode de Pareto (divisions des variables moyennes centrées (bins) par la racine carrée de leurs écarts-types) ce qui permettait de représenter chaque spectre en 2 dimensions (selon un système de coordonnées).

## **Chapitre 6 : Analyse statistique**

Les variables continues étaient exprimées en moyennes avec leurs écarts types (ET). Les variables non continues étaient présentées en pourcentage.

Le test de Student était utilisé pour analyser la variance des variables continues entre les différents groupes. Les variables non continues étaient comparées par le test du chi carré. L'analyse de variance était utilisée pour comparer plusieurs valeurs moyennes. L'ensemble des tests étaient considérés comme montrant une différence significative lorsque la valeur p était inférieure à 0,05. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel JMP 10® software (SAS, USA).

Les données issues de l'analyse métabolomique ont été étudiées en utilisant une analyse en composantes principales afin d'exprimer chaque spectre selon un nouveau système de

coordonnées interprétables grâce au logiciel SIMCA® 13.0 (Umetrics™ AB, Sweden). Les modèles obtenus étaient évalués par R2X pour estimer la qualité de l'ajustement et Q2X pour estimer la capacité prédictive du modèle.

## **Chapitre 7 : Ethique**

Cette étude a été réalisée après soumission et approbation du protocole de recherche par un comité d'éthique français le 7 février 2017 (CPP Sud Est III n° 2016-072 B, annexe 5). La notification de constitution de recherche biologique a été effectuée sous le numéro 2016-A01871-50.

Tous les patients inclus avaient reçu une information écrite (annexe 6) avant de donner leur consentement écrit (annexe 7) pour participer à l'étude et l'analyse de leurs données cliniques et biologiques.

## Partie 2 : résultats

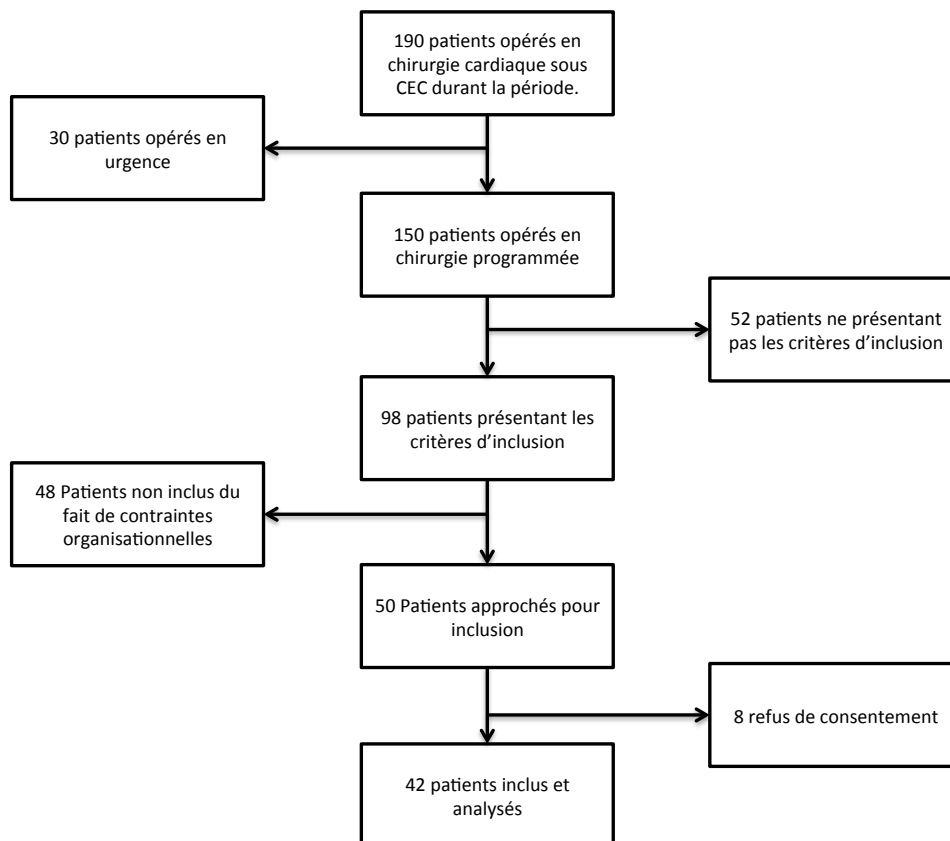
### Chapitre 1 : Population de l'étude

Nous avons inclus 42 patients de chirurgie cardiaque programmée entre le 17/02/2017 et le 26/04/2017.

Cent cinquante patients ont été opérés d'une chirurgie cardiaque programmée sous CEC entre le 17/02/2017 et le 26/04/2017. Parmi les 98 patients présentant les critères d'inclusion, 48 patients n'ont pas pu être inclus du fait de contraintes organisationnelles liées à l'obtention et à la conservation des échantillons urinaires et/ou à l'enregistrement des données per opératoires par le logiciel IXTREND®.

Le diagramme de flux est présenté dans la figure 1.

**Figure 1: Diagramme de flux.**



CEC : circulation extra corporelle.

## Chapitre 2 : Description de la population

### 2.1. Incidence de l'ARA

Une ARA a été observée chez 28% (n=12) des patients.

Quatre patients (10%) ont présenté une ARA de stade KDIGO 1, 5 patients (12%) un stade KDIGO 2 et 3 patients (7%) un stade KDIGO 3 dont 2 d'entre eux ont eu recours à une EER. Ces résultats sont présentés dans le tableau 1.

**Tableau:1 Stade KDIGO**

Stade KDIGO	KDIGO 1	KDIGO 2	KDIGO 3	Total
Nombre de patients (%)	4 (10)	5 (12)	3 (7)	12 (28)

KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes

### 2.2. Paramètres pré opératoire

Les paramètres pré opératoires sont détaillés dans le tableau 2. Les patients étaient en moyenne âgés de  $62 \pm 15$  ans. Vingt-six patients (62%) étaient de sexe masculin, L'IMC moyen était de  $25.8 \pm 4.9$  kg/cm<sup>2</sup>.

Nous n'avons pas observé de différence significative au sein de notre cohorte entre les patients ayant présenté une ARA ou non parmi les facteurs de risque d'insuffisance rénale classiquement identifié en chirurgie cardiaque en dehors du DFG pré opératoire.

Le DFG préopératoire était supérieur chez les patients n'ayant pas présenté d'ARA post opératoire par rapport à ceux ayant présenté une ARA post opératoire ( $78 \pm 4$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> versus  $63 \pm 6$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (p=0.01)). La FEVG moyenne était comparable dans les deux groupes ( $62 \pm 2$  % dans le groupe ARA+ versus  $61 \pm 1$  % dans le groupe ARA-, p = 0,52). L'Euroscore 2 était de  $2.7 \pm 2.8$ , sans différence significative entre les deux groupes. Le score de Cleveland était de  $2.5 \pm 1.4$ , sans différence entre les deux groupes. Il n'existait pas non plus de différence significative entre les groupes concernant les traitements pré opératoires potentiellement néphrotoxiques (inhibiteurs de l'enzyme de conversion, diurétiques).

**Tableau 2: Caractéristiques préopératoires**

	<b>Tous (n=42)</b>	<b>ARA + (n=12)</b>	<b>ARA – (n=30)</b>	<b>P</b>
Age (années)	62.1±15.3	64.3±4.4	61.3±2.8	0.56
Sexe masculin n (%)	26 (62)	6 (50)	20 (66)	0.31
IMC (kg/cm <sup>2</sup> )	25.8±4.9	27±0.4	25.3±0.9	0.31
<u>Antécédents notables, n(%)</u>				
Hypertension	21 (50)	7 (58)	14 (46)	0.49
Diabètes	2 (4.7)	1 (3)	1 (8)	0.5
Obésité	7 (16)	2 (16)	5 (16)	1
Maladie athéromateuse	6 (14.2)	2 (16)	4 (16)	0.78
IRC	9 (21)	4 (33)	5 (16)	0.28
<u>Caractéristiques notables,</u>				
DFG (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	74±23	63±6	78±4	0.01
FEVG (%)	61±9	62±3	61±2	0.57
Score de Cleveland	2.5±1.4	2.7±0.4	2.4±0.2	0.52
Euroscore 2	2.7±2.8	3.2±0.8	2.5±0.5	0.47
<u>Traitements préopératoires, n (%)</u>				
Inhibiteur du SRA	18 (43)	4 (33)	14 (46)	0.4
Diurétiques	12 (28)	7 (23)	5 (41)	0.27
Beta bloquant	22 (52)	8 (66)	14 (46)	0.26

ARA +: groupe de patients ayant présenté une ARA, ARA –: groupe de la patients n’ayant pas présenté d’ARA, IMC : indice de masse corporelle, IRC : Insuffisance respiratoire chronique, DFG: débit de filtration glomérulaire, FEVG : fraction d’éjection du ventricule gauche, SRA : système rénine angiotensine.

### 2.3. Indications chirurgicales

Les indications chirurgicales sont détaillées dans le tableau 3.

Les chirurgies réalisées étaient principalement des chirurgies de la valve aortique (24 prothèses valvulaires aortiques) ; 11 pontages coronariens et 8 chirurgies de la valve mitrale ont également été réalisés. Plusieurs indications chirurgicales pouvaient être réalisées au cours de la même procédure. Les autres indications chirurgicales étaient : une cure complète de tétralogie Fallot, une fermeture de communication inter auriculaire et 2 cures de retour veineux pulmonaire anormaux, dont une cure de veine Cimetterre ).

**Tableau 3: indication chirurgicales**

Indications, n (%)	Tous	ARA +	ARA –	p
Pontages coronariens	11 (26)	5 (41)	6 (20)	0.15
Valve mitrale	8 (19)	6 (20)	2 (16)	0.81
Valve aortique	24 (57)	8 (66)	16 (66)	0.43
Aorte ascendante	6 (14)	1 (8)	5 (16)	0.46
Autres	6 (14)	1 (8)	5 (16)	0.46

ARA +: groupe de patients ayant présenté une ARA, ARA –: groupe de la patients n’ayant pas présenté d’ARA.

#### 2.4. Paramètres per opératoires

Les paramètres per opératoires sont détaillés dans le tableau 4.

La durée moyenne de CEC était de 99±23 minutes et de clampage aortique de 75±31 minutes. La durée moyenne de la chirurgie était de 295±45 minutes. Il n’y avait pas de différence entre les deux groupes. Nous n’avons pas trouvé de différence non plus en terme de remplissage vasculaire, pertes sanguines, volume retransfusé par CellSaver® et la diurèse per opératoire entre les deux groupes

**Tableau 4: Caractéristiques per opératoires**

	<u>Tous (n=42)</u>	<u>ARA + (n=12)</u>	<u>ARA – (n=30)</u>	<u>p</u>
Durée de la CEC (min)	99±23	109±10	95±7	0.25
Durée du clampage aortique (min)	75±31	84±9	72±6	0.25
Durée de la chirurgie (min)	295±45	312±13	288±8	0.12
Remplissage vasculaire (ml)	1562±709	1250±198	1687±126	0.07
Pertes sanguines (ml)	3015±1382	3277±419	2908±268	0.46
CellSaver (ml)	800±621	692±189	843±120	0.5
Débit urinaire durant la CEC (ml/kg/h)	63±88	65±26	62±16	0.9
Débit urinaire durant la chirurgie (ml/kg/h)	145±107	162±31	138±20	0.51

ARA+: groupe de patients ayant présenté une ARA, ARA–: groupe de la patients n’ayant pas présenté d’ARA, CEC : circulation extra corporelle, min : minutes.

## 2.5. Paramètres post opératoires

Les paramètres post opératoires sont présentés dans le tableau 5.

Deux patients sont décédés dans les 7 jours suivant la chirurgie. Ils présentaient tous les deux une ARA.

La durée de traitement sous catécholamines, la durée de séjour en réanimation et la durée d'hospitalisation étaient plus longues dans le groupe de patient ayant présenté une ARA.

**Tableau 5: Caractéristiques post opératoires**

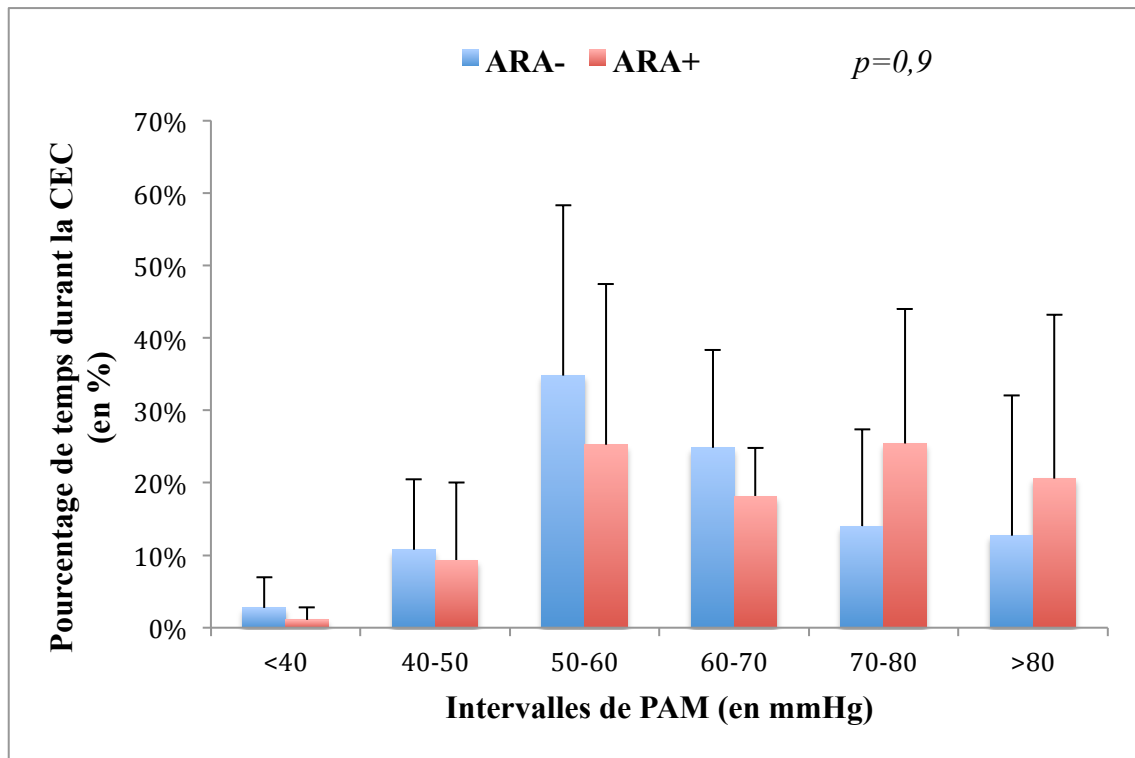
	<b>Tous (n=42)</b>	<b>ARA + (n=12)</b>	<b>ARA – (n=30)</b>	<b>p</b>
Remplissage vasculaire (24h) (ml)	2005±737	2145±214	1950±135	0.5
Durée sous catécholamines (jours)	0.7±1.1	1.2 ±0.3	0.5±1.1	0.05
EER, n (%)	3 (7)	3 (25)	0 (0)	0.004
Durée en réanimation (jours)	3.5±3.7	5.3±1	2.8±0.6	0.04
Durée d'hospitalisation (jours)	15.3±8.6	19.5±9.5	13.7±1.5	0.04
Décès, n (%)	2 (5)	2 (16)	0 (0)	0.02

ARA+: groupe de patients ayant présenté une ARA, ARA-: groupe de la patients n'ayant pas présenté d'ARA, EER : épuration extra rénale.

## 2.6. Pression artérielle moyenne

Nous n'avons pas mis en évidence de différence entre la gravité et la durée des épisodes d'hypotension per CEC et l'ARA post opératoire (p=0.9). La relation entre la PAM et l'ARA est présentée dans la figure 2. De manière inattendue, les patients du groupe ARA-sont restés majoritairement dans des intervalles de PAM moins élevés que ceux du groupe avec ARA.

**Figure 2: relation entre la PAM et l'ARA**



% : pourcentage, PAM : pression artérielle moyenne, ARA+ : groupe avec une agression rénale aigue post opératoire, ARA - : groupe sans agression rénale aigue post opératoire.

Proportion de temps passé durant la CEC dans plusieurs intervalles de PAM en comparant les patients ayant eu une ARA par rapport à ceux n'ayant pas présenté d'ARA post opératoire. La proportion de temps passée dans chaque intervalle (en% du temps total) est en ordonnée et les intervalles de PAM sont en abscisse (en mmHg). Les patients ayant eu une ARA sont en rouge, les patients n'ayant pas eu d'ARA sont en bleu.

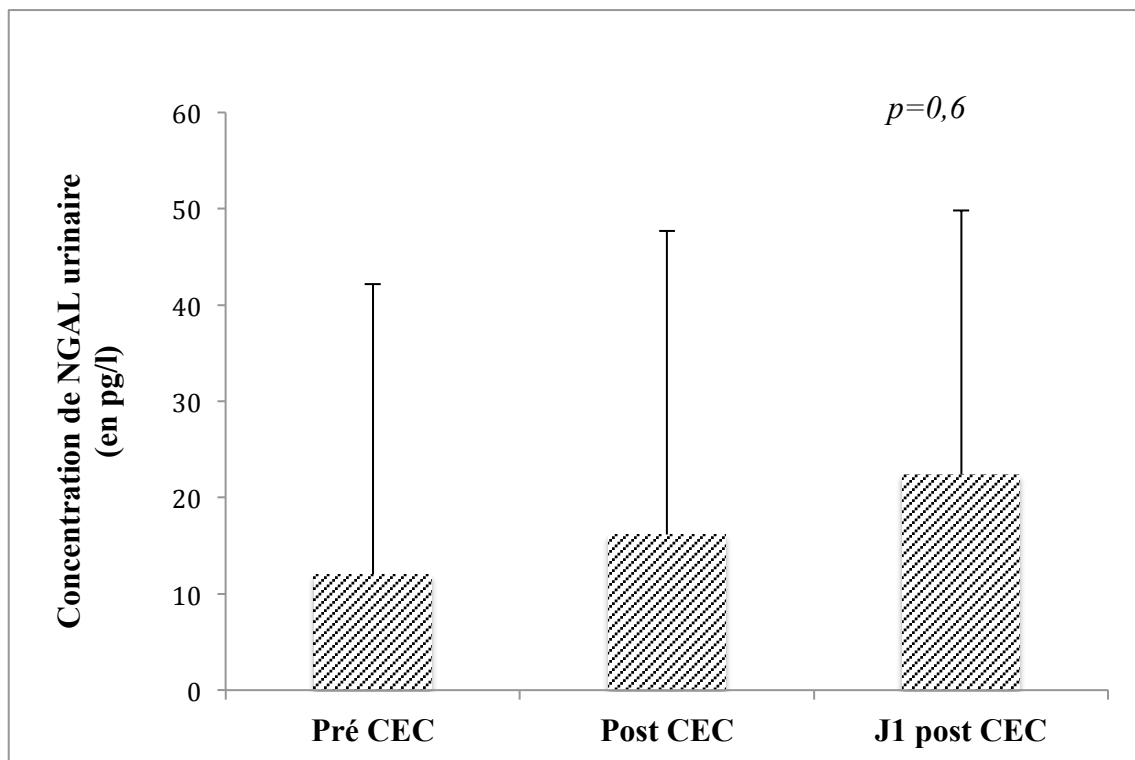
### Chapitre 3 : Analyse des biomarqueurs

#### 3.1. NGAL urinaire

La figure 3 montre la distribution des concentrations urinaires de NGAL des 42 patients avant la CEC, en sortie de CEC et à J1 post CEC. Les valeurs moyennes des concentrations de NGAL urinaire (en pg/l) sont  $12 \pm 30$  en pré CEC,  $16 \pm 32$  en post CEC et  $22 \pm 27$  à J1 post CEC. L'analyse de variance ne montre pas de différence entre les concentrations au cours du temps et de la CEC ( $p=0.6$ ).



**Figure 3: NGAL urinaire au cours de la CEC**



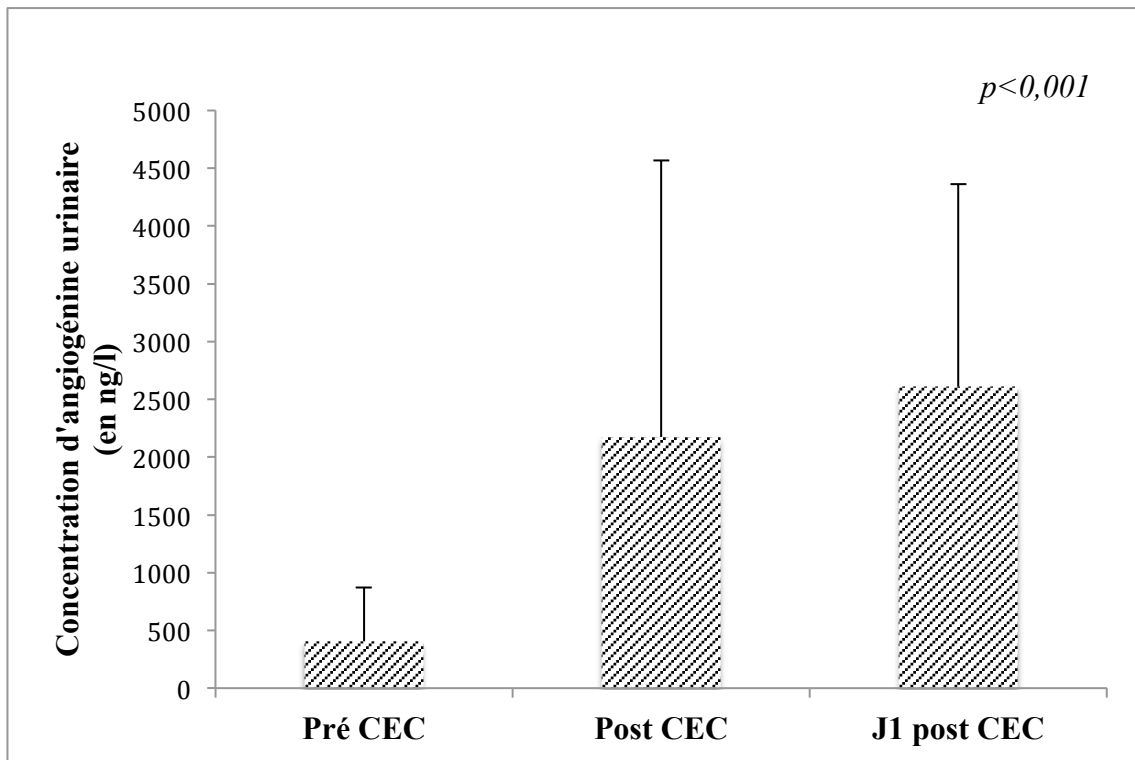
CEC : circulation extracorporelle.

En abscisse, les différents stades de prélèvements (pré CEC, post CEC, J1 post CEC) et en ordonnée la concentration de NGAL urinaire (en pg/l).

### 3.2. Angiogénine

La figure 4 montre la distribution des concentrations urinaires d'angiogénine des 42 patients avant la CEC, en sortie de CEC et à J1 post CEC. Les valeurs moyennes des concentrations de l'angiogénine urinaire (en ng/L) sont  $406 \pm 465$  en pré CEC,  $2176 \pm 2393$  en post CEC et  $2610 \pm 1751$  à J1 post CEC.

**Figure 4: Angiogénine urinaire au cours de la CEC**



CEC : Circulation extra corporelle.

En abscisse les différents stades de prélèvements (pré CEC, post CEC, J1 post CEC) et en ordonnée la concentration de l'angiogénine urinaire (en ng/l). On observe une augmentation de la concentration d'angiogénine urinaire au cours de la CEC ( $p < 0,001$ ), d'un facteur 5 entre le début et la fin de la CEC et d'un facteur 6 entre le début de la CEC et J1 post CEC

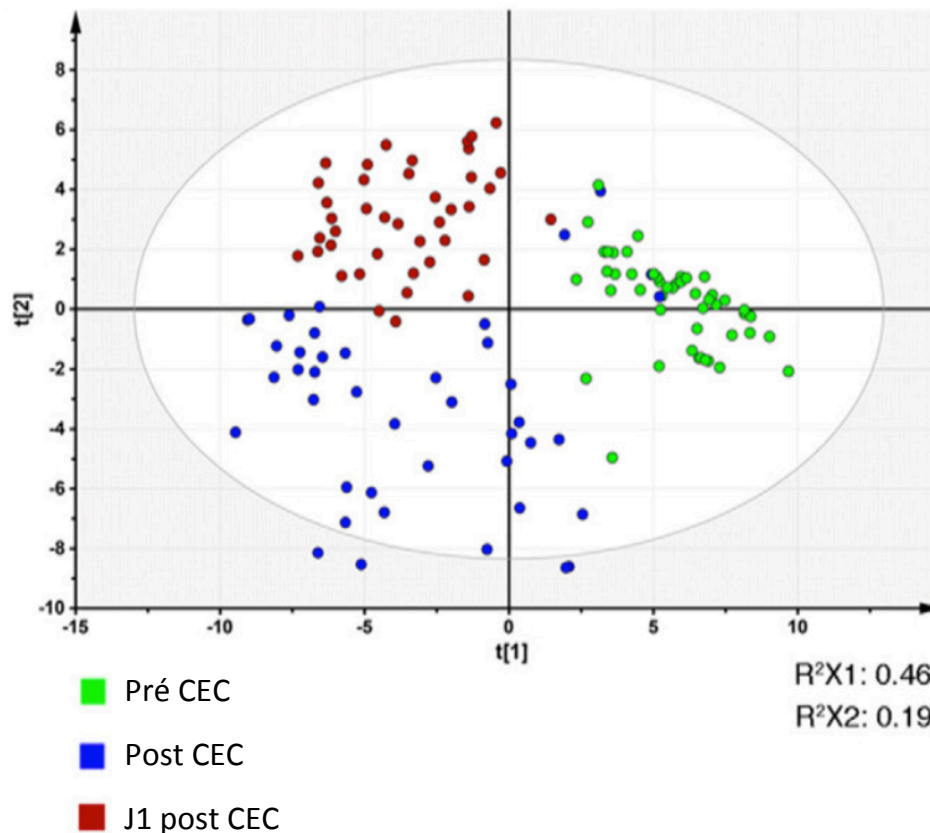
## Chapitre 4 : Analyse du métabolome

### 4.1. Analyse par composantes principales

Une analyse par composante principale des 126 échantillons (42x3) recueillis a été effectuée et est exposée dans la figure 5.

On observe un changement qualitatif du métabolome au cours du temps et de l'évolution de la CEC pour la majorité des patients. En effet, la signature métabolomique de chaque patient variait entre le début de la CEC et la fin de la CEC mais également entre la fin de la CEC et le J1 post CEC. Ces changements indiquent une modification des métabolites urinaires excrétés après le début de la CEC.

**Figure 5: analyse par composante principale du métabolome urinaire.**



CEC : circulation extra corporelle

Analyse par composante principale des 126 échantillons urinaires collectés, chaque point représente la signature métabolomique d'un échantillon obtenue par spectrométrie par résonance magnétique nucléaire. Les points des échantillons avant la CEC sont en vert, ceux en post CEC sont en bleu et ceux à J1 post CEC sont en rouge, les caractéristiques du modèle sont  $R^2$ , 0.92;  $Q^2$ , 0.65 et  $R^2X$ , 0.46 et  $R^2X2$ , 0.19.

#### 4.2. Constitution de 2 groupes

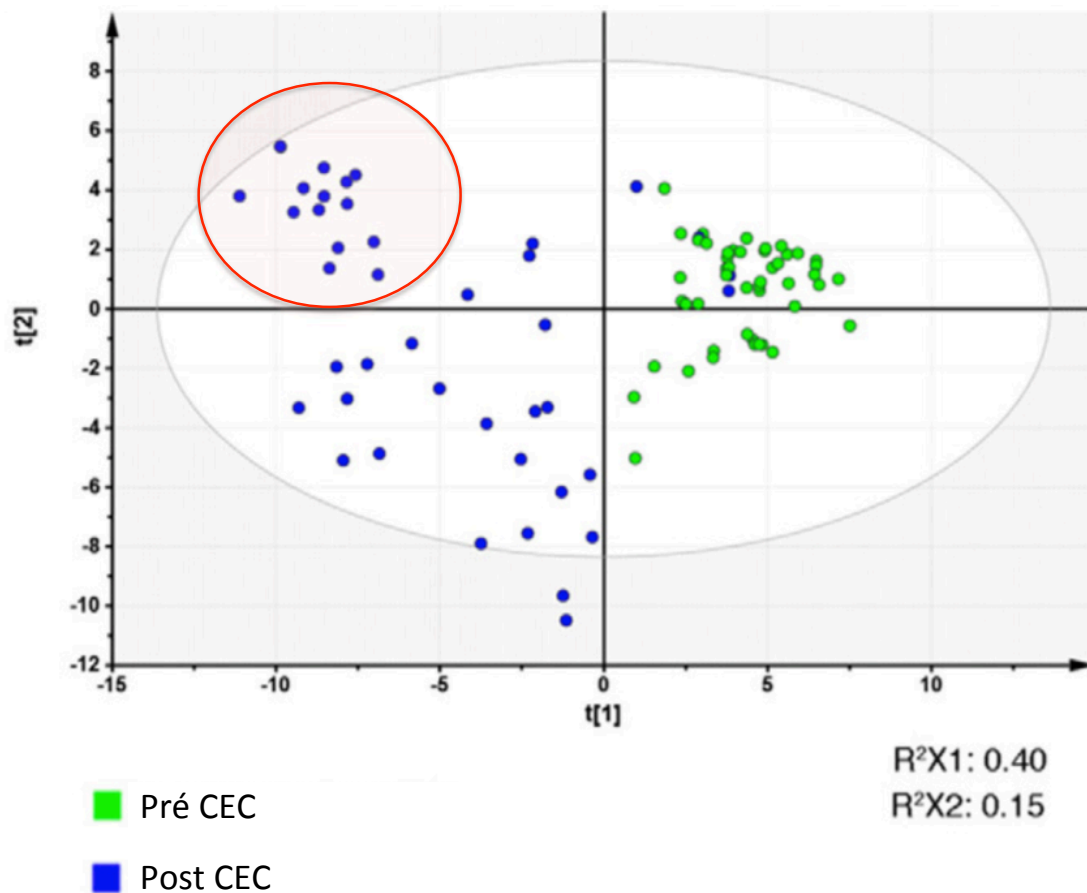
La figure 6 illustre le déplacement d'un même individu selon 2 axes en fonction des changements qualitatifs de son métabolome urinaire entre le début et la fin de la CEC.

Le patient A est caractéristique du type de patient dont le métabolome a peu évolué au cours de la CEC. Le patient B est caractéristique des patients dont le métabolome s'est modifié (les signatures métabolomiques sont très éloignées entre le début et la fin de la CEC pour ce même patient, ce qui semble être le résultat d'une grande variation de ses métabolites urinaires). Le cercle rouge définit les 13 échantillons dont la variation est supérieure aux autres. Les caractéristiques du modèle sont  $R^2=0.93$ ,  $Q^2=0.64$ .

Selon la variation du métabolome, nous avons ainsi constitué 2 groupes distincts:

- le groupe «sans variation métabolomique» qui contient les 29 patients ayant une faible variation du métabolome urinaire pendant la CEC (comme le patient A) ;
- le groupe « avec variation métabolomique» avec les 13 patients dont le métabolome a le plus varié durant la même période (comme le patient B, dans le cercle rouge).

**Figure 6: Déplacement d'un même individu selon 2 axes en fonction des changements qualitatifs de son métabolome urinaire**



CEC : circulation extra corporelle.

Analyse par composante principale de 84 échantillons urinaires collectés, chaque point représente la signature métabolomique d'un échantillon obtenue par spectrométrie par résonance magnétique nucléaire. Les points des échantillons avant la CEC sont en vert, ceux en post CEC sont en bleu. Le patient A représente un patient avec une faible variation du métabolome, le patient B représente les patients avec la plus grande variation du métabolome urinaire. Les patients dont les échantillons sont situés dans le cercle rouge sont les patients avec la plus grande variation du métabolome urinaire, les caractéristiques du modèle sont  $R^2 = 0.93$ ,  $Q^2 = 0.64$  et  $R^2X1 = 0.40$ ,  $R^2X2 = 0.15$

### 4.3. Comparaison entre les 2 groupes «variation métabolomique»

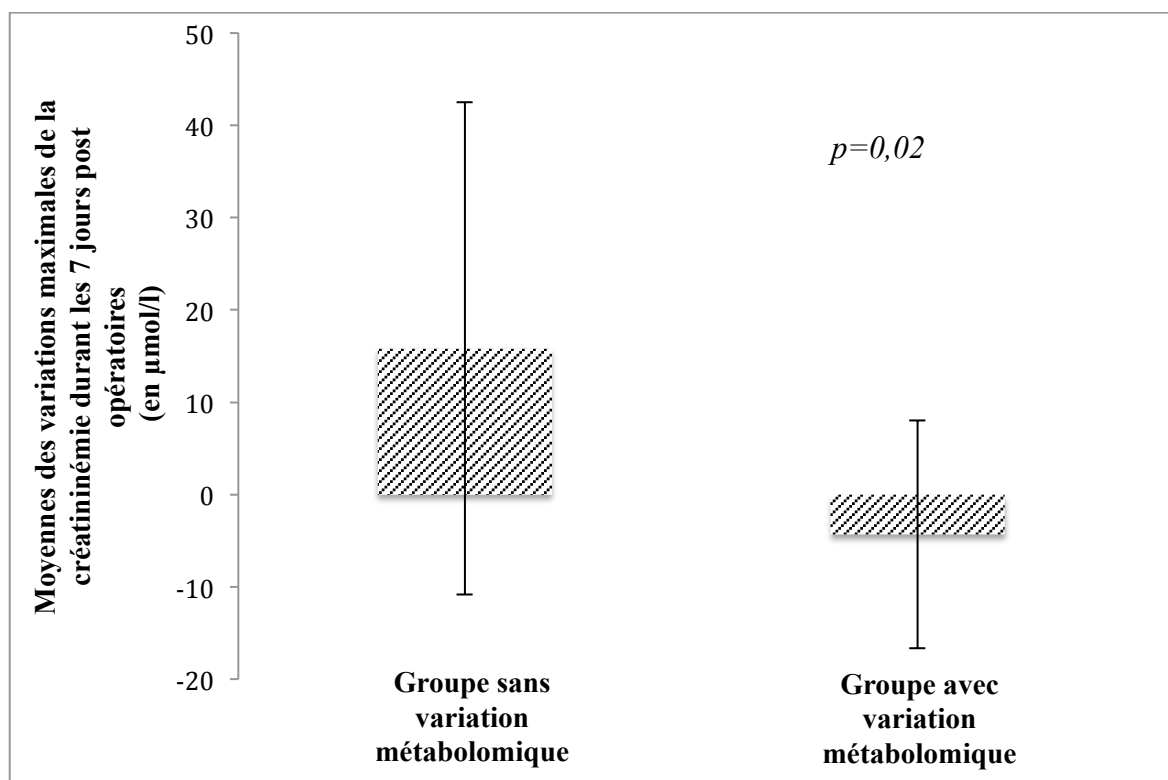
#### 4.3.1. Incidence de l'ARA

Suite à la constitution des 2 groupes, nous avons comparé les variations de la créatininémie dans les 7 jours post opératoire en fonction de l'appartenance à chaque groupe.

La figure 7 montre les variations maximales de créatinine plasmatique dans les 7 jours après la chirurgie sous CEC par rapport à la créatinine plasmatique de base en pré opératoire chez les 42 patients comparées en fonction de l'appartenance à chacun des groupes de variations métaboliques à l'aide d'un test t de Student.

La variation moyenne de la créatininémie (en  $\mu\text{mol/l}$ ) durant les 7 premiers jours post opératoires étaient plus importante dans le groupe «sans variation métabolomique» que dans le groupe «avec variation métabolomique » ( $16\pm 27$  vs  $4\pm 12$ ,  $p = 0.02$ )

**Figure 7 : Comparaison des variations de la créatinémie entre les 2 groupes en fonction de la variation du métabolome**



Groupe sans variation métabolomique : patients dont le métabolome urinaire a varié faiblement durant la CEC, groupe avec variation métabolomique : patients dont le métabolome urinaire a varié fortement durant la CEC

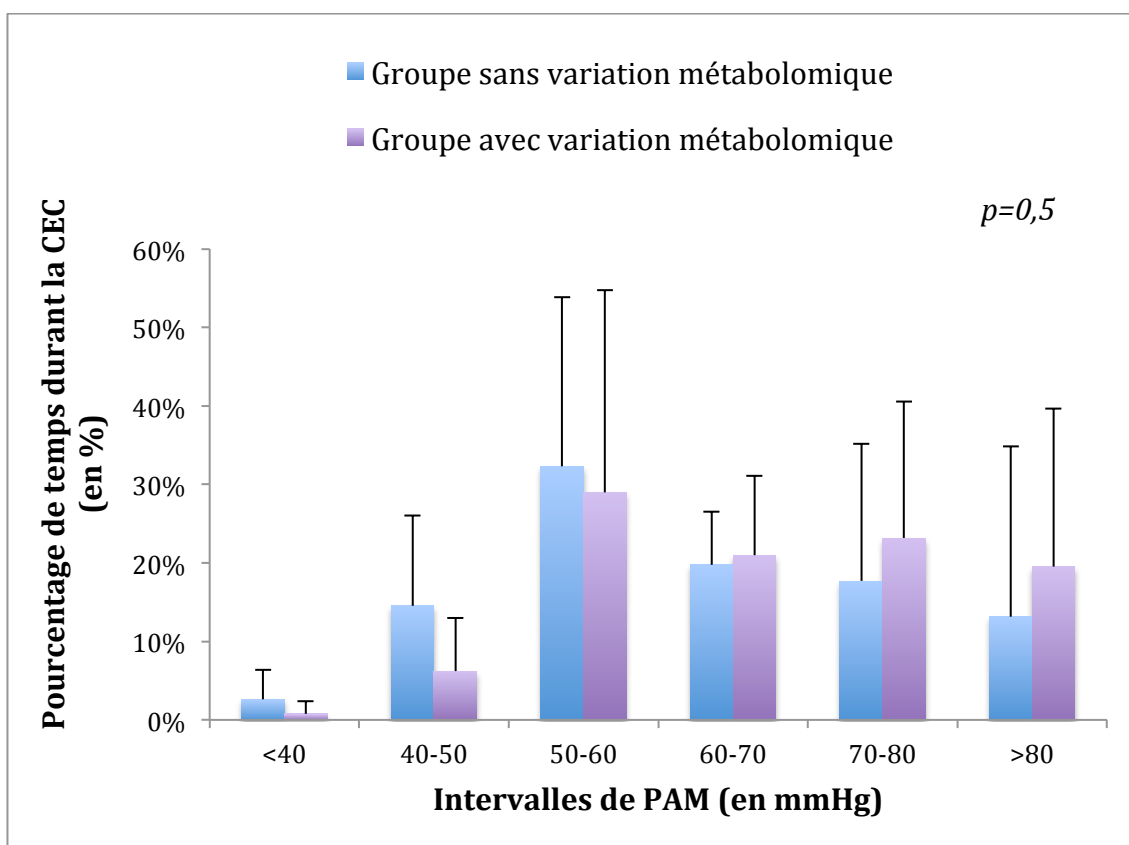
En abscisse les groupes «variation métabolomique -» et «variation métabolomique +» et en ordonnée la variation maximale de la créatininémie au cours de la première semaine par rapport à la créatininémie de base pré opératoire (en  $\mu\text{mol/l}$ ).

### 4.3.2. Pression artérielle moyenne pendant la CEC

La figure 8 montre la relation entre la pression artérielle moyenne et la variation du métabolisme urinaire pendant la CEC.

La comparaison ne montre pas de différence significative en fonction de l'appartenance à un des groupes de « variation métabolomique » ( $p=0.5$ ).

**Figure 8: Relation entre la PAM et les groupes de variation métabolomique**



CEC : circulation extracorporelle, PAM : pression artérielle moyenne,

Groupe sans variation métabolomique: patients dont le métabolome urinaire a varié faiblement durant la CEC, groupe avec variation métabolomique: patients dont le métabolome urinaire a varié fortement durant la CEC.

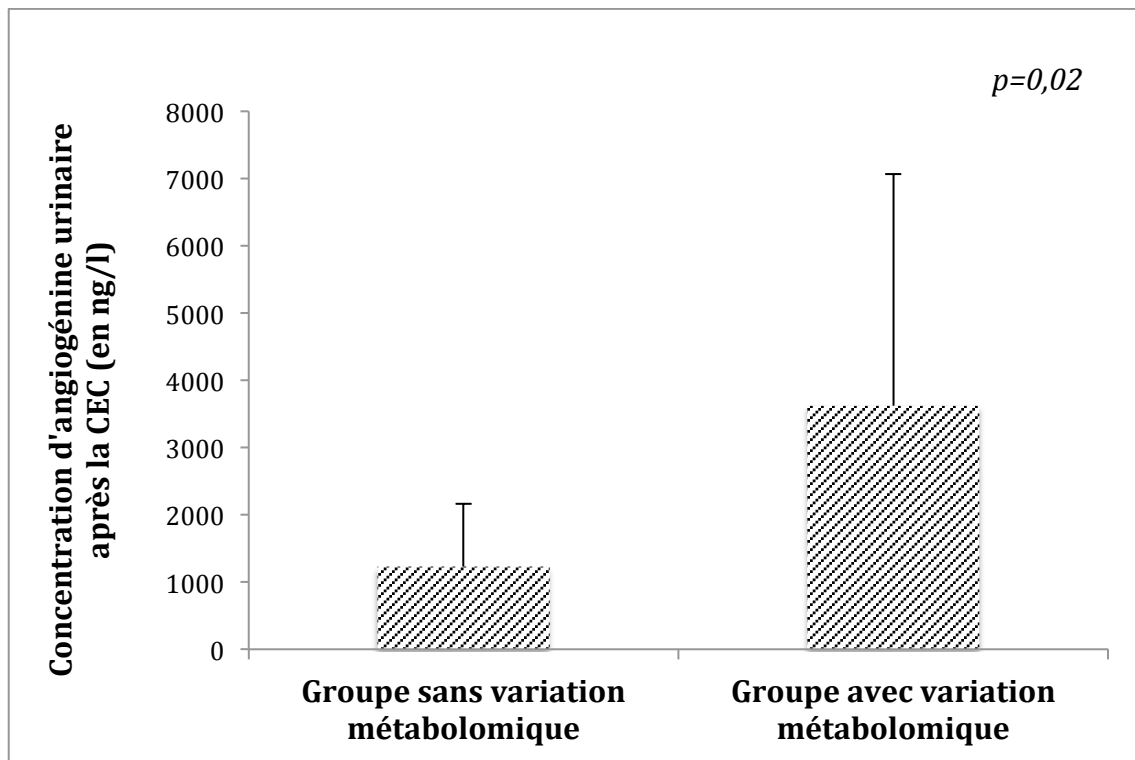
La proportion de temps passée dans chaque intervalle durant la CEC (en%) est en ordonnée et les intervalles de PAM sont en abscisse (en mmHg).

### 4.3.3. Concentration urinaire d'angiogénine

L'analyse des concentrations urinaires d'angiogénine après la CEC est montrée dans la figure 9.

La concentration urinaire d'angiogénine en post CEC (en ng/l) était significativement plus élevée dans le groupe « avec variation métabolomique » ( $3622\pm3446$  vs  $1226\pm937$  dans le groupe «sans variation métabolomique»,  $p=0.02$ ).

**Figure 9 : Angiogénine urinaire après la CEC selon les groupes de variation métabolomique**

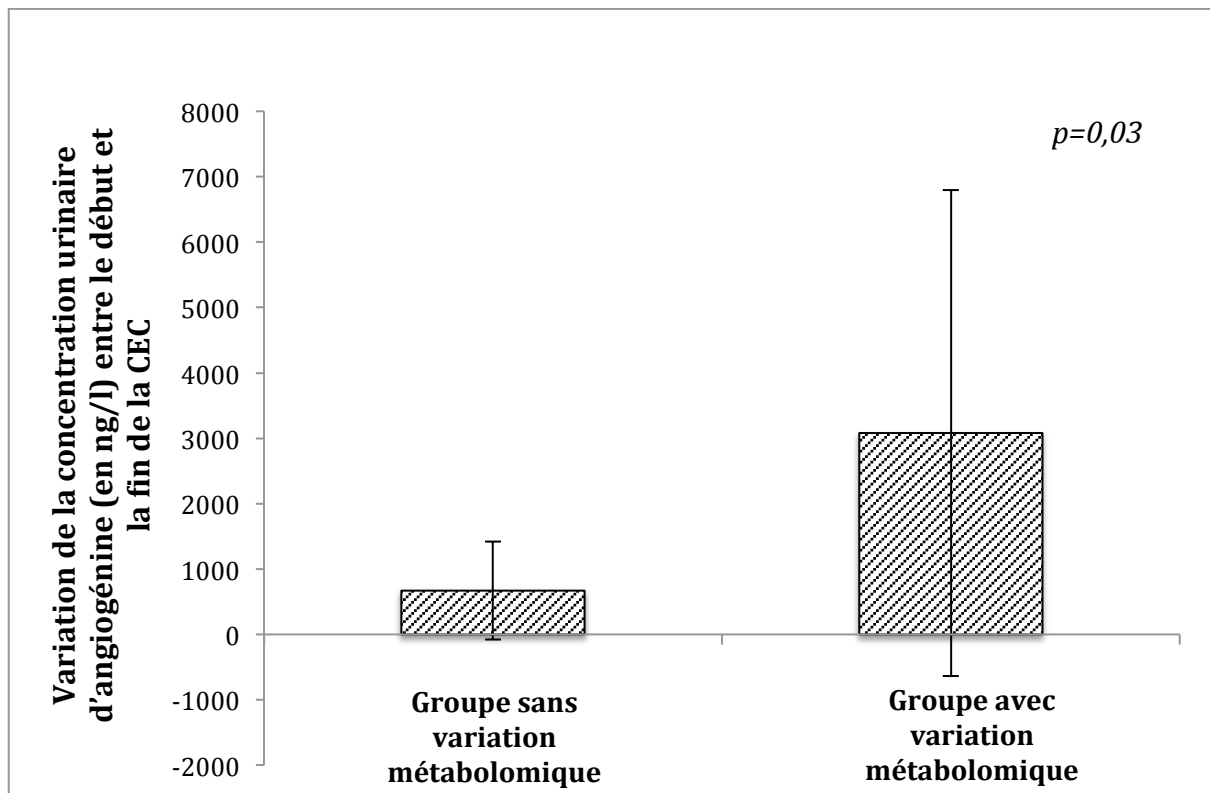


Groupe sans variation métabolomique : patients dont le métabolome urinaire a varié faiblement durant la CEC, groupe avec variation métabolomique : patients dont le métabolome urinaire a varié fortement durant la CEC. CEC : circulation extracorporelle.

En abscisse les groupes « sans variation métabolomique » et « avec variation métabolomique » et en ordonnée la concentration d'angiogénine urinaire après la CEC (en ng/l).

La variation de l'angiogénine urinaire au cours de la CEC est montrée dans la figure 10, elle était plus importante dans le groupe « avec variation métabolomique » ( $3080 \pm 3717$  ng/l vs  $670 \pm 747$  dans le groupe « sans variation métabolomique »,  $p = 0.03$ ).

**Figure 10 : Variation de l'angiogénine urinaire au cours de la CEC selon les groupes de variation métabolomique.**



Groupe « sans variation métabolomique » : patients dont le métabolome urinaire a varié faiblement durant la CEC, groupe « avec variation métabolomique » : patients dont le métabolome urinaire a varié fortement durant la CEC, CEC : circulation extra corporelle.

En abscisse les groupes «sans variation métabolomique» et « avec variation métabolomique » et en ordonnée la variation de l'angiogénine urinaire durant la CEC (concentration d'angiogénine urinaire post CEC – concentration d'angiogénine urinaire pré CEC (en ng/l)).



## Partie 3 : discussion

---

Nous avons effectué une étude exploratoire sur 42 patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque programmée sous CEC afin de caractériser le métabolome urinaire des patients au cours de la CEC, d'étudier le rôle de la PAM sur la survenue d'une ARA et d'évaluer des biomarqueurs urinaires (NGAL et angiogénine) au cours de la CEC.

Nous avons mis en évidence l'apparition d'une réponse métabolique rénale adaptative durant la CEC à travers une modification plus importante du métabolome urinaire chez les patients ne développant pas une ARA post opératoire. Nous avons observé que le niveau de PAM pendant la CEC n'était pas corrélé à la survenue d'une ARA post opératoire.

De plus, nous avons observé une augmentation et une variation de l'angiogénine urinaire plus importante chez les patients ayant modifié leur métabolome urinaire, ce qui est en faveur d'une activation de la voie IRE1 $\alpha$ /sXBP1. Nous n'avons pas mis en évidence de variation du NGAL urinaire au cours de la CEC (reflet de l'axe PERK/ATF4).

### Chapitre 1 : Population de l'étude

#### 1.1. Taille de l'effectif

Quarante-deux patients ont été inclus dans cette étude exploratoire. Le faible effectif de l'étude pourrait avoir minimisé l'impact de certains facteurs de risque, notamment le rôle de la PAM. Les principales difficultés rencontrées à l'inclusion étaient liées aux contraintes pour le prélèvement et la préparation des échantillons urinaires nécessitant que les procédures soient effectuées en semaine.

Notre étude de cohorte était exploratoire, mono-centrique, observationnelle et prévue pour décrire le métabolome urinaire.

#### 1.2. Caractéristiques de la population

##### 1.2.1. Gravité

Le risque opératoire en chirurgie cardiaque est principalement évalué par l'Euroscore 2 (64) (annexe 4). L'Euroscore 2 moyen dans notre étude était de  $2.7 \pm 2.8$  avec une mortalité de 5%, ce qui est comparable aux autres centres de chirurgie cardiaque (Euroscore moyen français de  $3.2 \pm 4.2$  en 2015) (123).

Nous n'avons pas inclus les patients atteints d'insuffisance rénale chronique sévère afin de pouvoir analyser une population mixte et naïve d'atteinte rénale avancée. Nous n'avons

également pas inclus les patients à haut risque d'ARA post opératoire, comme les patients ayant une FEVG altérée (< 40%).

Le score de Cleveland était de  $2.5 \pm 1.4$  pour l'ensemble des patients,  $2.7 \pm 0.4$  dans le groupe ARA+ et de  $2.4 \pm 0.2$  dans le groupe ARA – ( $p=0.52$ ). Trois patients (7%) ont été dialysés. En comparaison, dans l'étude princeps ayant permis le développement du score de Cleveland, il avait été retrouvé 1,7% (269 patients sur 31677) de patients dialysés (7).

Ce score présente comme principal inconvénient l'absence de prise en compte de paramètres per opératoires et de prendre en compte principalement l'insuffisance rénale pré opératoire avec un coefficient 2 ou 4 (sur 15) (124) ce qui explique sa faible pertinence dans notre cohorte chez où les patients insuffisants rénaux sévères n'étaient pas inclus et sa faible utilisation en pratique clinique.

### **1.2.2. Indications chirurgicales**

Nous avons inclus les patients quelques soient les indications chirurgicales programmées, tous patients confondus, nous avons 57% de chirurgies de la valve aortique, 26% de pontages coronariens, 19% de chirurgies de la valve mitrale, 14% de chirurgies de l'aorte ascendante et 14% de chirurgies pour des pathologies congénitales. Ceci constitue une différence notable par rapport aux autres études portant sur l'ARA en post opératoire de CEC, pour exemple, la cohorte sur laquelle est basée le score AKICS (62) était constituée par 53% de pontages coronariens, 12,6% de chirurgies de la valve aortique et également 12,6% de chirurgies de la valve mitrale.

De plus, 6 patients pris en charge pour des pathologies congénitales ont participé à l'étude. Ces chirurgies sont en plein essor du fait des progrès des techniques opératoires ces dernières années et de l'arrivée à l'âge adulte d'un grand nombre de patients atteints d'une cardiopathie congénitale opérée dans l'enfance. Dans le domaine de l'évaluation péri opératoire et notamment de la prise en charge de l'ARA, ces nouvelles indications rendent plus complexes l'utilisation de scores prédictifs et pronostics (Euroscore 2, score de Cleveland, score AKICS) car les patients n'appartiennent pas aux types de populations étudiées (7,9,62).

Dans notre cohorte, sur les 6 patients pris en charge pour chirurgies de pathologies congénitales, 1 patient a présenté une insuffisance rénale post opératoire. En comparaison, en pédiatrie, une étude danoise récente réalisée par Madsen et al. (125) portant sur 382 patients âgés de moins de 15 ans opérés d'une 1<sup>ère</sup> chirurgie pour pathologie congénitale a observé 33% d'ARA post opératoire.

### **1.2.3. CEC**

Le temps moyen de CEC était de  $99\pm 23$  minutes, le temps de clampage aortique était de  $75\pm 31$  minutes ; ils n'étaient pas différents entre les 2 groupes d'ARA ( $84\pm 9$  dans le groupe avec ARA,  $72\pm 6$  dans le groupe sans ARA,  $p=0.25$ ). La durée de la CEC et particulièrement la durée du clampage aortique sont réputées comme des facteurs de risque indépendants d'ARA, Karkouti et al. (71) avaient montré que chaque période de 15 minutes sous CEC représentait un OR de 1.11 (intervalle de confiance : 1.08–1.14) quant à la survenue d'une ARA post opératoire mais les durées au sein de cette cohorte sont courtes par rapport aux études internationales qui retiennent une durée de CEC  $> 120$  minutes comme facteur de risque d'ARA (62).

Afin de prévenir l'ARA post opératoire, plusieurs mesures sont prises en per CEC; le maintien d'un débit de CEC adapté, l'utilisation de vasoconstricteurs, le remplissage vasculaire et l'hémofiltration. En 2012, une méta-analyse concernant l'hémofiltration au cours de la CEC n'a montré aucun bénéfice clinique de cette stratégie (126). Une autre étude randomisée concernant 199 patients entre 2010 et 2013 n'a également pas retrouvé de bénéfice au niveau de l'ARA chez les patients ayant été hémofiltrés durant la CEC (127). Dans notre cohorte, 11 patients (26%) ont été hémofiltrés durant la CEC, 6 d'entre eux ont présentés une ARA post opératoire.

## **Chapitre 2 : Incidence de l'ARA dans notre population**

### **2.1. Par rapport à la population en chirurgie cardiaque sous CEC**

L'incidence d'ARA après chirurgie cardiaque est variable selon les cohortes et les définitions et est comprise entre 20 et 30% avec 2 à 6% d'EER (18–20). Dans notre étude, 12 patients (28%) ont présenté une ARA, trois patients (7%) d'EER.

### **2.2. Rôles des facteurs de risque classiquement retrouvés**

Dans notre population, le seul facteur de risque classiquement décrit dans la littérature que nous avons retrouvé était l'insuffisance rénale pré opératoire, avec un DFG pré opératoire (en ml/min/m<sup>2</sup>) de  $63\pm 6.3$  pour les patients ayant présenté une ARA contre  $78.3\pm 4$  chez les patients n'ayant pas présenté d'ARA ( $p = 0.01$ ).

Les autres facteurs de risque classiquement décrits comme majeurs n'ont pas semblé influencer la survenue d'une ARA. Ainsi, nous n'avons pas retrouvé comme facteur de risque le diabète ni la prise de diurétiques en préopératoire. L'hémodilution n'a pas été retrouvée comme facteur de risque d'ARA.

La complexité de l'ARA post opératoire et en particulier en chirurgie cardiaque rend difficile l'identification des facteurs de risque, encore plus avec un effectif de 42 patients. L'ARA est multifactorielle et les facteurs décrits dans la littérature sont nombreux et variables en fonction des populations étudiées. Dans une étude portant sur 4118 patients opérés d'une chirurgie cardiaque sous CEC, il avait été retrouvé comme facteur de risque d'ARA chez les patients avec un DFG pré opératoire  $> 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ , une chirurgie en urgence (OR=10,00), un âge avancé (OR=1,085), le diabète (OR=1,848), un traitement par diurétique (OR=1,642), le temps de CEC (OR=1,007), l'hématocrite (OR=0,936), la PAM per opératoire (OR=1,011) et l'utilisation de la noradrénaline (OR=1,885) (28).

### **2.3. Rôle de la PAM**

Nous n'avons pas retrouvé d'association entre les niveaux de PAM per CEC et la survenue d'une ARA post opératoire. Cette donnée est en accord avec la littérature, plusieurs études n'ont pas mis en évidence d'effet du niveau de PAM per CEC sur l'incidence de l'ARA post opératoire (68,69,73). Ces études étaient rétrospectives ou fixait arbitrairement un niveau de PAM (faible PAM  $< 60 \text{ mmHg}$  et PAM élevée  $> 70 \text{ mmHg}$ ). Une étude plus récente (75) s'est intéressée au bénéfice d'un niveau de PAM « élevé » 75-85 mmHg par rapport à un niveau de PAM « bas » 50-60 mmHg sans retrouver de différence au niveau de l'ARA post opératoire. L'originalité de notre étude était d'analyser plusieurs niveaux de PAM tout au long de la CEC. Il pourrait être intéressant de poursuivre cette évaluation sur un plus grand nombre de patients.

Nous n'avons pas retrouvé de modification de la réponse métabolique rénale en fonction du niveau de PAM. Ceci pourrait être dû à la faible variation de PAM entre les patients de notre population et à sa faible taille. A notre connaissance, aucune étude n'a évalué la réponse métabolique rénale en fonction des niveaux de PAM pendant la CEC. D'autres travaux récents suggèrent que l'autorégulation rénale permettrait une adaptation à la diminution du débit sanguin rénal sous CEC et la non pulsativité du flux (71). Nous n'avons pas évalué la relation entre la variation de la PAM par rapport à sa valeur de base préopératoire et la survenue d'une ARA post opératoire.

## **Chapitre 3 : Réponse adaptative**

### **3.1. Interprétation du métabolome**

A notre connaissance, l'étude du métabolome urinaire par spectrométrie par résonance nucléaire pendant une chirurgie cardiaque sous CEC n'a jamais été réalisée.

Dans notre analyse, nous avons trouvé que en quelques heures ( $99 \pm 23$  minutes), la CEC provoquait un changement important du métabolome urinaire. L'augmentation de la créatininémie post opératoire est plus importante dans le groupe « sans variation métabolomique » que dans le groupe « avec variation métabolomique » (respectivement  $15.8 \pm 26.6$  contre  $-4.3 \pm 12.3$  ( $p=0.02$ )). Il semblerait ainsi que le développement d'une ARA post opératoire soit en rapport avec une absence de réponse adaptative rénale face à un stress cellulaire. Bien que la taille de notre échantillon soit trop petite pour conclure de la sorte, l'absence de rôle joué par la PAM per CEC et la durée de la CEC dans la variation du métabolome suggère que cette réponse ne soit pas liée à la durée ni à la sévérité du stress cellulaire.

L'incapacité de certains patients à enclencher une réponse adaptative protectrice face au stress cellulaire lié à la CEC permettrait de détecter les patients non répondeurs susceptibles de développer une ARA post opératoire (« sans variation métabolomique ») : c'est le concept de pré-conditionnement. Il repose sur l'hypothèse que des réponses cellulaires adaptatives soient enclenchées lors d'une agression aiguë avant une éventuelle expression clinique pathologique afin de permettre une protection cellulaire et donc un meilleur pronostic clinique (131,132). En pratique, les techniques de pré-conditionnement consistent à effectuer plusieurs stimuli ischémiques à distance de l'organe cible (par exemple, 4 séries de 5 minutes d'inflation du bras à 200 mmHg par un brassard avant l'incision chirurgicale).

Plusieurs études ont été réalisées en chirurgie cardiaque afin d'étudier l'intérêt du pré-conditionnement dans la prévention de l'ARA post opératoire. Deux études randomisées (133) (134) avaient retrouvé une diminution de l'incidence de l'ARA post opératoire chez les patients bénéficiant d'un pré conditionnement. Toutefois, une autre étude randomisée multicentrique portant sur 1612 patients (135) n'avait retrouvé aucune différence entre les deux groupes.

L'étude du métabolome urinaire en fonction d'une technique de pré conditionnement ou non au cours de la chirurgie cardiaque sous CEC pourrait permettre une meilleure compréhension des différentes voies activées.

### **3.2. Interprétation des autres biomarqueurs**

Comme mentionné précédemment, de nombreuses études se sont intéressées aux biomarqueurs d'ARA en chirurgie cardiaque sous CEC. Le rôle de NGAL a été particulièrement évalué (5,97,103,105,107) et malgré une dizaine d'années de recherche, son utilisation en pratique clinique n'est toujours pas validée.

Au cours de notre étude, nous avons mesuré de manière répétée la concentration d'angiogénine urinaire (marqueur indirect de l'axe IRE1  $\alpha$ ) (118) et la concentration de NGAL urinaire (qui semblerait être régulée par la voie PERK) (117). Nous avons constaté une augmentation de l'angiogénine urinaire mais pas de NGAL urinaire. Il semblerait donc que le stress cellulaire induit par la CEC active l'axe IRE1  $\alpha$  plutôt que l'axe PERK/ATF4. Les patients du groupe « avec variation métabolomique » sont ceux ayant présenté le moins d'ARA et qui ont eu une concentration et une variation de l'angiogénine urinaire la plus élevée. L'angiogénine urinaire pourrait être considérée comme un biomarqueur de bon pronostic d'ARA.

## **Chapitre 4 : Données manquantes ou non utilisées dans notre analyse**

### **4.1. HTAP pré opératoire**

L'HTAP pré opératoire est un facteur de risque majeur de complication post opératoire en chirurgie cardiaque et également d'ARA post opératoire (62).

Le recueil de la pression artérielle pulmonaire systolique (PAPs) n'était pas effectué de manière systématique dans notre cohorte (23 patients n'avaient pas de recueil, 5 patients n'avaient pas d'HTAP (PAPs < 31 mmHg), 12 patients avaient une HTAP modérée (entre 31 et 55 mmHg) et 2 patients une HTAP sévère (PAPs > 55 mmHg). Le manque de données n'a pas permis d'effectuer d'analyse dans notre cohorte.

### **4.2. Pression veineuse centrale**

Nous n'avons pas rapporté les résultats de la pression veineuse centrale (PVC) au cours de l'étude bien qu'il soit clairement admis que la congestion veineuse soit un facteur étiologique important d'ARA et de maladie rénale chronique, en particulier en péri opératoire de chirurgie cardiaque (136). Au cours de l'étude AKICS, une PVC > 14 mmHg per opératoire était un facteur de risque d'ARA post opératoire en analyse univariée et est prise en compte dans le score de risque (1,7 points sur 20) (annexe 3, (62)). Une étude sur un registre de 2390 patients (79) a montré que la PVC mesurée à H6 post opératoire était un facteur de risque de mortalité intra hospitalière et à 30 jours (Odds ratio = 1.5 IC 95% [1.23, 1.87]) et d'atteinte rénale après ajustement sur l'index cardiaque (Odds ratio ajusté 1.5 (IC 95% = 1.28-1.86) pour chaque augmentation de 5 mmHg de la PVC, p < 0.0001).

Toutefois, le monitoring de la congestion veineuse par la PVC est délicat car il faut vérifier la bonne position du cathéter central, le bon positionnement des têtes de pression par

rapport à l'oreillette droite, prendre en compte les pression intra thoraciques sous ventilation mécanique, qualité de la mesure au cours de la CEC) (137,138).

## Conclusion

---

Nous avons réalisé une étude observationnelle exploratoire afin de caractériser sur le plan physiologique et clinique les patients développant une insuffisance rénale aiguë en post opératoire de chirurgie cardiaque sous circulation extra corporelle.

Chez nos 42 patients inclus, nous n'avons pas retrouvé les facteurs de risque habituels d'ARA classiquement décrits. Notamment, le niveau de pression artérielle moyenne pendant la CEC ne semble pas être associé au développement d'une ARA post opératoire.

Nous avons mis en évidence l'apparition d'une réponse métabolique rénale adaptative durant la CEC à travers une modification plus importante du métabolome urinaire chez les patients ne développant pas une ARA post opératoire.

Nous avons observé une augmentation et une variation de l'angiogénine urinaire plus importante chez les patients ayant modifié leur métabolome urinaire, ce qui est en faveur d'une activation de la voie IRE1 $\alpha$ /sXBP1. Nous n'avons pas mis en évidence de variation du NGAL urinaire, reflet de l'axe PERK/ATF4, au cours de la CEC.



## Bibliographie

---

1. Fellahi J-L. Anesthésie-Réanimation en chirurgie cardiaque. 2e édition. Rueil-Malmaison: Arnette Blackwell; 2014. 587 p.
2. Ghosh S, Falter F, Jr ACP. Cardiopulmonary Bypass. Cambridge University Press; 2015. 271 p.
3. MD GPG, MD RFD, CCP AHSM, MBA RMUM, editors. Cardiopulmonary Bypass: Principles and Practice. Third edition. Philadelphia, PA: LWW; 2007. 816 p.
4. Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire [Internet]. [cited 2017 Mar 20]. Available from: <http://www.sfctcv.org/>
5. Gurvitz M, Burns KM, Brindis R, Broberg CS, Daniels CJ, Fuller SMPN, et al. Emerging Research Directions in Adult Congenital Heart Disease: A Report from a National Heart, Lung, and Blood Institute/Adult Congenital Heart Association Working Group. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Apr 26;67(16):1956–64.
6. Notice. *Kidney Int Suppl*. 2012 Mar 1;2(1):1.
7. Thakar CV, Arrigain S, Worley S, Yared J-P, Paganini EP. A clinical score to predict acute renal failure after cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2005 Jan;16(1):162–8.
8. Kiers HD, van den Boogaard M, Schoenmakers MCJ, van der Hoeven JG, van Swieten HA, Heemskerk S, et al. Comparison and clinical suitability of eight prediction models for cardiac surgery-related acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2013 Feb;28(2):345–51.
9. Wong B, St Onge J, Korkola S, Prasad B. Validating a scoring tool to predict acute kidney injury (AKI) following cardiac surgery. *Can J Kidney Health Dis*. 2015;2:3.
10. Englberger L, Suri RM, Li Z, Dearani JA, Park SJ, Sundt TM, et al. Validation of clinical scores predicting severe acute kidney injury after cardiac surgery. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2010 Oct;56(4):623–31.
11. Ichai C, Vinsonneau C, Souweine B, Armando F, Canet E, Clec'h C, et al. Acute kidney injury in the perioperative period and in intensive care units (excluding renal replacement therapies). *Ann Intensive Care [Internet]*. 2016 [cited 2017 Mar 20];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/s.frodon.univ-paris5.fr/pmc/articles/PMC4882312/>
12. Lameire NH, Bagga A, Cruz D, Maeseneer JD, Endre Z, Kellum JA, et al. Acute kidney injury: an increasing global concern. *The Lancet*. 2013 Jul 13;382(9887):170–9.
13. Lewington AJP, Cerdá J, Mehta RL. Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer. *Kidney Int*. 2013 Sep;84(3):457–67.

14. Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N Engl J Med*. 2014 Jul 3;371(1):58–66.
15. Mårtensson J, Bellomo R. What's new in perioperative renal dysfunction? *Intensive Care Med*. 2015 Mar;41(3):514–6.
16. Hobson C, Ruchi R, Bihorac A. Perioperative Acute Kidney Injury: Risk Factors and Predictive Strategies. *Crit Care Clin*. 2017 Apr;33(2):379–96.
17. Bihorac A, Yavas S, Subbiah S, Hobson CE, Schold JD, Gabrielli A, et al. Long-Term Risk of Mortality and Acute Kidney Injury During Hospitalization After Major Surgery. *Ann Surg*. 2009 May;249(5):851–8.
18. Hobson CE, Yavas S, Segal MS, Schold JD, Tribble CG, Layon AJ, et al. Acute kidney injury is associated with increased long-term mortality after cardiothoracic surgery. *Circulation*. 2009 May 12;119(18):2444–53.
19. Kumar AB, Suneja M. Cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury. *Anesthesiology*. 2011 Apr;114(4):964–70.
20. Thiele RH, Isbell JM, Rosner MH. AKI associated with cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2015 Mar 6;10(3):500–14.
21. Pickering JW, James MT, Palmer SC. Acute kidney injury and prognosis after cardiopulmonary bypass: a meta-analysis of cohort studies. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2015 Feb;65(2):283–93.
22. Ng SY, Sanagou M, Wolfe R, Cochrane A, Smith JA, Reid CM. Prediction of acute kidney injury within 30 days of cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014 Jun;147(6):1875–83, 1883.e1.
23. Ortega-Loubon C, Fernández-Molina M, Carrascal-Hinojal Y, Fulquet-Carreras E. Cardiac surgery-associated acute kidney injury. *Ann Card Anaesth*. 2016 Dec;19(4):687–98.
24. Lameire N. The pathophysiology of acute renal failure. *Crit Care Clin*. 2005;21(2):197–210.
25. Bagnis CI, Deray G. Facteurs de risque et prévention de l'insuffisance rénale postopératoire. *Prat En Anesth Réanimation*. 2008;12(1):14–8.
26. Shah M, Jain AK, Brunelli SM, Coca SG, Devereaux PJ, James MT, et al. Association between angiotensin converting enzyme inhibitor or angiotensin receptor blocker use prior to major elective surgery and the risk of acute dialysis. *BMC Nephrol*. 2014 Apr 2;15:53.
27. Epstein M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the continuum of renal dysfunction. *J Hypertens Suppl Off J Int Soc Hypertens*. 2002 Sep;20(6):S17–23.
28. Lombardi R, Ferreiro A. Risk factors profile for acute kidney injury after cardiac

surgery is different according to the level of baseline renal function. *Ren Fail.* 2008;30(2):155–60.

29. Perez-Valdivieso JR, Monedero P, Vives M, Garcia-Fernandez N, Bes-Rastrollo M, GEDRCC (Grupo Español de Disfunción Renal en Cirugía Cardíaca). Cardiac-surgery associated acute kidney injury requiring renal replacement therapy. A Spanish retrospective case-cohort study. *BMC Nephrol.* 2009 Sep 22;10:27.

30. Del Duca D, Iqbal S, Rahme E, Goldberg P, de Varennes B. Renal failure after cardiac surgery: timing of cardiac catheterization and other perioperative risk factors. *Ann Thorac Surg.* 2007 Oct;84(4):1264–71.

31. Kim K, Joung K-W, Ji S-M, Kim J-Y, Lee E-H, Chung C-H, et al. The effect of coronary angiography timing and use of cardiopulmonary bypass on acute kidney injury after coronary artery bypass graft surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2016 Jul;152(1):254–61.e3.

32. Stratégie du remplissage vasculaire périopératoire [Internet]. SFAR - Société Française d'Anesthésie et de Réanimation. 2015 [cited 2017 Dec 13]. Available from: <http://sfar.org/strategie-du-remplissage-vasculaire-perioperatoire-2/>

33. Hartog CS, Bauer M, Reinhart K. The efficacy and safety of colloid resuscitation in the critically ill. *Anesth Analg.* 2011 Jan;112(1):156–64.

34. Myburgh JA, Finfer S, Bellomo R, Billot L, Cass A, Gattas D, et al. Hydroxyethyl starch or saline for fluid resuscitation in intensive care. *N Engl J Med.* 2012 Nov 15;367(20):1901–11.

35. Habicher M, Perrino A, Spies CD, Heymann C von, Wittkowski U, Sander M. Contemporary Fluid Management in Cardiac Anesthesia. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2011 Dec 1;25(6):1141–53.

36. Brezis M, Rosen S. Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N Engl J Med.* 1995 Mar 9;332(10):647–55.

37. Kohan DE. Endothelins in the kidney: physiology and pathophysiology. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 1993 Oct;22(4):493–510.

38. Caramelo C, Espinosa G, Manzarbeitia F, Cernadas MR, Pérez Tejerizo G, Tan D, et al. Role of endothelium-related mechanisms in the pathophysiology of renal ischemia/reperfusion in normal rabbits. *Circ Res.* 1996 Nov;79(5):1031–8.

39. Blauth CI. Macroemboli and microemboli during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1995 May;59(5):1300–3.

40. Dávila-Román VG, Kouchoukos NT, Schechtman KB, Barzilai B. Atherosclerosis of the ascending aorta is a predictor of renal dysfunction after cardiac operations. *J Thorac*

Cardiovasc Surg. 1999 Jan;117(1):111–6.

41. Habib RH, Zacharias A, Schwann TA, Riordan CJ, Engoren M, Durham SJ, et al. Role of hemodilutional anemia and transfusion during cardiopulmonary bypass in renal injury after coronary revascularization: implications on operative outcome. *Crit Care Med*. 2005 Aug;33(8):1749–56.
42. Huybregts RAJM, de Vroege R, Jansen EK, van Schijndel AW, Christiaans HMT, van Oeveren W. The association of hemodilution and transfusion of red blood cells with biochemical markers of splanchnic and renal injury during cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg*. 2009 Aug;109(2):331–9.
43. Karkouti K, Beattie WS, Wijeyesundera DN, Rao V, Chan C, Dattilo KM, et al. Hemodilution during cardiopulmonary bypass is an independent risk factor for acute renal failure in adult cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005 Feb;129(2):391–400.
44. Likosky DS. An epidemiologist's review of the case for pulsatile flow during cardiopulmonary bypass. *J Extra Corpor Technol*. 2009 Mar;41(1):P30–2.
45. Abramov D, Tamariz M, Serrick CI, Sharp E, Noel D, Harwood S, et al. The influence of cardiopulmonary bypass flow characteristics on the clinical outcome of 1820 coronary bypass patients. *Can J Cardiol*. 2003 Mar 15;19(3):237–43.
46. Wright G. The assessment of pulsatile blood flow. *Perfusion*. 1995 May;10(3):135–40.
47. Lannemyr L, Bragadottir G, Krumbholz V, Redfors B, Sellgren J, Ricksten S-E. Effects of Cardiopulmonary Bypass on Renal Perfusion, Filtration, and Oxygenation in Patients Undergoing Cardiac Surgery. *Anesthesiology*. 2017 Feb;126(2):205–13.
48. Morgan IS, Codispoti M, Sanger K, Mankad PS. Superiority of centrifugal pump over roller pump in paediatric cardiac surgery: prospective randomised trial. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 1998 May;13(5):526–32.
49. Wright G. Haemolysis during cardiopulmonary bypass: update. *Perfusion*. 2001 Sep;16(5):345–51.
50. Moat NE, Evans TE, Quinlan GJ, Gutteridge JM. Chelatable iron and copper can be released from extracorporeally circulated blood during cardiopulmonary bypass. *FEBS Lett*. 1993 Aug 9;328(1-2):103–6.
51. Cremer J, Martin M, Redl H, Bahrami S, Abraham C, Graeter T, et al. Systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg*. 1996 Jun;61(6):1714–20.
52. Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2000 Jul;9(4):427–34.

53. Rosner MH, Portilla D, Okusa MD. Cardiac surgery as a cause of acute kidney injury: pathogenesis and potential therapies. *J Intensive Care Med.* 2008 Feb;23(1):3–18.
54. Chertow GM, Levy EM, Hammermeister KE, Grover F, Daley J. Independent association between acute renal failure and mortality following cardiac surgery. *Am J Med.* 1998 Apr;104(4):343–8.
55. Mangano CM, Diamondstone LS, Ramsay JG, Aggarwal A, Herskowitz A, Mangano DT. Renal dysfunction after myocardial revascularization: risk factors, adverse outcomes, and hospital resource utilization. The Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. *Ann Intern Med.* 1998 Feb 1;128(3):194–203.
56. Robert AM, Kramer RS, Dacey LJ, Charlesworth DC, Leavitt BJ, Helm RE, et al. Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury: A Comparison of Two Consensus Criteria. *Ann Thorac Surg.* 2010 Dec;90(6):1939–43.
57. Haase M, Bellomo R, Matalanis G, Calzavacca P, Dragun D, Haase-Fielitz A. A comparison of the RIFLE and Acute Kidney Injury Network classifications for cardiac surgery-associated acute kidney injury: a prospective cohort study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Dec;138(6):1370–6.
58. Zanardo G, Michielon P, Paccagnella A, Rosi P, Caló M, Salandin V, et al. Acute renal failure in the patient undergoing cardiac operation. Prevalence, mortality rate, and main risk factors. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994 Jun;107(6):1489–95.
59. Andersson LG, Ekroth R, Bratteby LE, Hallhagen S, Wesslén O. Acute renal failure after coronary surgery--a study of incidence and risk factors in 2009 consecutive patients. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Aug;41(4):237–41.
60. Saydy N, Mazine A, Stevens L-M, Jeamart H, Demers P, Pagé P, et al. Differences and similarities in risk factors for postoperative acute kidney injury between younger and older adults undergoing cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2017 Aug 26;
61. Kumar AB, Bridget Zimmerman M, Suneja M. Obesity and post-cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury: a single-center retrospective analysis. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2014 Jun;28(3):551–6.
62. Palomba H, de Castro I, Neto ALC, Lage S, Yu L. Acute kidney injury prediction following elective cardiac surgery: AKICS Score. *Kidney Int.* 2007 Sep;72(5):624–31.
63. Nashef SA, Roques F, Michel P, Gauducheau E, Lemeshow S, Salamon R. European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE). *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* 1999 Jul;16(1):9–13.
64. Nashef SAM, Roques F, Sharples LD, Nilsson J, Smith C, Goldstone AR, et al.

EuroSCORE II. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2012 Apr;41(4):734–44; discussion 744–5.

65. Taniguchi FP, Souza AR de, Martins AS. Cardiopulmonary bypass time as a risk factor for acute renal failure. *Rev Bras Cir Cardiovasc Orgao Of Soc Bras Cir Cardiovasc*. 2007 Jun;22(2):201–5.

66. Conlon PJ, Stafford-Smith M, White WD, Newman MF, King S, Winn MP, et al. Acute renal failure following cardiac surgery. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 1999 May;14(5):1158–62.

67. Boldt J, Brenner T, Lehmann A, Suttner SW, Kumle B, Isgro F. Is kidney function altered by the duration of cardiopulmonary bypass? *Ann Thorac Surg*. 2003 Mar;75(3):906–12.

68. Sirvinskas E, Andrejaitiene J, Raliene L, Nasvytis L, Karbonskiene A, Pilvinis V, et al. Cardiopulmonary bypass management and acute renal failure: risk factors and prognosis. *Perfusion*. 2008 Nov;23(6):323–7.

69. Sirvinskas E, Benetis R, Raliene L, Andrejaitiene J. The influence of mean arterial blood pressure during cardiopulmonary bypass on postoperative renal dysfunction in elderly patients. *Perfusion*. 2012 May;27(3):193–8.

70. Thakar CV, Yared J-P, Worley S, Cotman K, Paganini EP. Renal dysfunction and serious infections after open-heart surgery. *Kidney Int*. 2003 Jul;64(1):239–46.

71. Karkouti K, Wijeyesundera DN, Yau TM, Callum JL, Cheng DC, Crowther M, et al. Acute kidney injury after cardiac surgery: focus on modifiable risk factors. *Circulation*. 2009 Feb 3;119(4):495–502.

72. Coleman MD, Shaefi S, Sladen RN. Preventing acute kidney injury after cardiac surgery. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2011 Feb;24(1):70–6.

73. Urzua J, Troncoso S, Bugeo G, Canessa R, Muñoz H, Lema G, et al. Renal function and cardiopulmonary bypass: effect of perfusion pressure. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1992 Jun;6(3):299–303.

74. Gold JP, Charlson ME, Williams-Russo P, Szatrowski TP, Peterson JC, Pirraglia PA, et al. Improvement of outcomes after coronary artery bypass. A randomized trial comparing intraoperative high versus low mean arterial pressure. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995 Nov;110(5):1302–11; discussion 1311–4.

75. Azau A, Markowicz P, Corbeau JJ, Cottineau C, Moreau X, Baufreton C, et al. Increasing mean arterial pressure during cardiac surgery does not reduce the rate of postoperative acute kidney injury. *Perfusion*. 2014 Nov;29(6):496–504.

76. Sun LY, Wijeyesundera DN, Tait GA, Beattie WS. Association of intraoperative hypotension with acute kidney injury after elective noncardiac surgery. *Anesthesiology*. 2015 Sep;123(3):515–23.
77. Murphy GS, Hessel EA, Groom RC. Optimal perfusion during cardiopulmonary bypass: an evidence-based approach. *Anesth Analg*. 2009 May;108(5):1394–417.
78. Hori D, Katz NM, Fine DM, Ono M, Barodka VM, Lester LC, et al. Defining oliguria during cardiopulmonary bypass and its relationship with cardiac surgery-associated acute kidney injury. *Br J Anaesth*. 2016 Dec;117(6):733–40.
79. Williams JB, Peterson ED, Wojdyla D, Harskamp R, Southerland KW, Ferguson TB, et al. Central venous pressure after coronary artery bypass surgery: does it predict postoperative mortality or renal failure? *J Crit Care*. 2014 Dec;29(6):1006–10.
80. Engelman R, Baker RA, Likosky DS, Grigore A, Dickinson TA, Shore-Lesserson L, et al. The Society of Thoracic Surgeons, The Society of Cardiovascular Anesthesiologists, and The American Society of ExtraCorporeal Technology: Clinical Practice Guidelines for Cardiopulmonary Bypass--Temperature Management During Cardiopulmonary Bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2015 Aug;29(4):1104–13.
81. Newland RF, Tully PJ, Baker RA. Hyperthermic perfusion during cardiopulmonary bypass and postoperative temperature are independent predictors of acute kidney injury following cardiac surgery. *Perfusion*. 2013 May;28(3):223–31.
82. Newland RF, Baker RA, Mazzone AL, Quinn SS, Chew DP. Rewarming Temperature During Cardiopulmonary Bypass and Acute Kidney Injury: A Multicenter Analysis. *Ann Thorac Surg*. 2016 May 1;101(5):1655–62.
83. Swaminathan M, Phillips-Bute BG, Conlon PJ, Smith PK, Newman MF, Stafford-Smith M. The association of lowest hematocrit during cardiopulmonary bypass with acute renal injury after coronary artery bypass surgery. *Ann Thorac Surg*. 2003 Sep;76(3):784–91; discussion 792.
84. Habib RH, Zacharias A, Schwann TA, Riordan CJ, Durham SJ, Shah A. Adverse effects of low hematocrit during cardiopulmonary bypass in the adult: should current practice be changed? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003 Jun;125(6):1438–50.
85. Ranucci M, Conti D, Castelvechchio S, Menicanti L, Frigiola A, Ballotta A, et al. Hematocrit on cardiopulmonary bypass and outcome after coronary surgery in nontransfused patients. *Ann Thorac Surg*. 2010 Jan;89(1):11–7.
86. Haase M, Bellomo R, Story D, Letis A, Klemz K, Matalanis G, et al. Effect of mean arterial pressure, haemoglobin and blood transfusion during cardiopulmonary bypass on post-

operative acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2012 Jan;27(1):153–60.

87. Vermeer H, Teerenstra S, de Sévaux RGL, van Swieten HA, Weerwind PW. The effect of hemodilution during normothermic cardiac surgery on renal physiology and function: a review. *Perfusion.* 2008 Nov;23(6):329–38.

88. Surgenor SD, Kramer RS, Olmstead EM, Ross CS, Sellke FW, Likosky DS, et al. The association of perioperative red blood cell transfusions and decreased long-term survival after cardiac surgery. *Anesth Analg.* 2009 Jun;108(6):1741–6.

89. Mazer CD, Whitlock RP, Fergusson DA, Hall J, Belley-Cote E, Connolly K, et al. Restrictive or Liberal Red-Cell Transfusion for Cardiac Surgery. *N Engl J Med.* 2017 Nov 30;377(22):2133–44.

90. Loef BG, Epema AH, Smilde TD, Henning RH, Ebels T, Navis G, et al. Immediate postoperative renal function deterioration in cardiac surgical patients predicts in-hospital mortality and long-term survival. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2005 Jan;16(1):195–200.

91. Waikar SS, Betensky RA, Bonventre JV. Creatinine as the gold standard for kidney injury biomarker studies? *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2009 Nov;24(11):3263–5.

92. Wagener G, Minhaz M, Mattis FA, Kim M, Emond JC, Lee HT. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute kidney injury after orthotopic liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2011 May;26(5):1717–23.

93. Ray P, Le Manach Y, Riou B, Houle TT. Statistical evaluation of a biomarker. *Anesthesiology.* 2010 Apr;112(4):1023–40.

94. McIlroy DR, Wagener G, Lee HT. Biomarkers of acute kidney injury: an evolving domain. *Anesthesiology.* 2010 Apr;112(4):998–1004.

95. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Ma Q, Bennett MR, Möckel M, et al. Novel biomarkers early predict the severity of acute kidney injury after cardiac surgery in adults. *Ann Thorac Surg.* 2009 Jul;88(1):124–30.

96. Vanmassenhove J, Vanholder R, Nagler E, Van Biesen W. Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: an in-depth review of the literature. *Nephrol Dial Transplant.* 2013 Feb 1;28(2):254–73.

97. Mårtensson J, Bellomo R. The rise and fall of NGAL in acute kidney injury. *Blood Purif.* 2014;37(4):304–10.

98. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for



human acute kidney injury. *Biomark Med.* 2010 Apr;4(2):265–80.

99. Schmidt-Ott KM. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury--where do we stand today? *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2011 Mar;26(3):762–4.

100. Singer E, Elger A, Elitok S, Kettritz R, Nickolas TL, Barasch J, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes pre-renal from intrinsic renal failure and predicts outcomes. *Kidney Int.* 2011 Aug;80(4):405–14.

101. Nickolas TL, Schmidt-Ott KM, Canetta P, Forster C, Singer E, Sise M, et al. Diagnostic and prognostic stratification in the emergency department using urinary biomarkers of nephron damage: a multicenter prospective cohort study. *J Am Coll Cardiol.* 2012 Jan 17;59(3):246–55.

102. Ho J, Tangri N, Komenda P, Kaushal A, Sood M, Brar R, et al. Urinary, Plasma, and Serum Biomarkers' Utility for Predicting Acute Kidney Injury Associated With Cardiac Surgery in Adults: A Meta-analysis. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2015 Dec;66(6):993–1005.

103. Friedrich MG, Bougioukas I, Kolle J, Bireta C, Jebran FA, Placzek M, et al. NGAL expression during cardiopulmonary bypass does not predict severity of postoperative acute kidney injury. *BMC Nephrol.* 2017 Feb 21;18(1):73.

104. De Loor J, Herck I, Francois K, Van Wesemael A, Nuytinck L, Meyer E, et al. Diagnosis of cardiac surgery-associated acute kidney injury: differential roles of creatinine, chitinase 3-like protein 1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a prospective cohort study. *Ann Intensive Care.* 2017 Dec;7(1):24.

105. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, Donato V, Campo S, Fazio MR, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2009 Feb;4(2):337–44.

106. Mitsnefes MM, Kathman TS, Mishra J, Kartal J, Khoury PR, Nickolas TL, et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2007 Jan;22(1):101–8.

107. Cai L, Borowiec J, Xu S, Han W, Venge P. Assays of urine levels of HNL/NGAL in patients undergoing cardiac surgery and the impact of antibody configuration on their clinical performances. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2009 May;403(1-2):121–5.

108. Koyner JL, Bennett MR, Worcester EM, Ma Q, Raman J, Jeevanandam V, et al. Urinary cystatin C as an early biomarker of acute kidney injury following adult cardiothoracic surgery. *Kidney Int.* 2008 Oct;74(8):1059–69.

109. Chovatiya R, Medzhitov R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell*. 2014 Apr 24;54(2):281–8.
110. Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell*. 2015 Feb 26;160(5):816–27.
111. Yang X, Chen C, Teng S, Fu X, Zha Y, Liu H, et al. Urinary Matrix Metalloproteinase-7 Predicts Severe AKI and Poor Outcomes after Cardiac Surgery. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2017 Jul 11;
112. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int*. 2004 Aug;66(2):480–5.
113. Zuk A, Bonventre JV. Acute Kidney Injury. *Annu Rev Med*. 2016;67:293–307.
114. Cybulsky AV. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2017 Nov;13(11):681–96.
115. Mami I, Tavernier Q, Bouvier N, Aboukamis R, Desbuissons G, Rabant M, et al. A Novel Extrinsic Pathway for the Unfolded Protein Response in the Kidney. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2016 Sep;27(9):2670–83.
116. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011 Nov 25;334(6059):1081–6.
117. El Karoui K, Viau A, Dellis O, Bagattin A, Nguyen C, Baron W, et al. Endoplasmic reticulum stress drives proteinuria-induced kidney lesions via Lipocalin 2. *Nat Commun*. 2016 Jan 20;7:10330.
118. Tavernier Q, Mami I, Rabant M, Karras A, Laurent-Puig P, Chevet E, et al. Urinary Angiogenin Reflects the Magnitude of Kidney Injury at the Infrahistologic Level. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2017 Feb;28(2):678–90.
119. Lei Z, Huhman DV, Sumner LW. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J Biol Chem*. 2011 Jul 22;286(29):25435–42.
120. Eckhart AD, Beebe K, Milburn M. Metabolomics as a Key Integrator for “Omic” Advancement of Personalized Medicine and Future Therapies. *Clin Transl Sci*. 2012 Jun;5(3):285–8.
121. Budczies J, Denkert C, Müller BM, Brockmüller SF, Klauschen F, Györfy B, et al. Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissue - a GC-TOFMS based metabolomics study. *BMC Genomics*. 2012 Jul 23;13:334.
122. Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, Ramos-Barron A, Sanchez-Niño MD, Gomez-Alamillo C, García-Segura JM, et al. Urine metabolomics insight into acute kidney injury point to oxidative stress disruptions in energy generation and H<sub>2</sub>S availability. *J Mol Med*

Berl Ger. 2017 Dec;95(12):1399–409.

123. Guillet L, Bedague D, Durand M, Chavanon O, Albaladejo P. L'EuroSCORE II améliore-t-il la prédiction de la mortalité chez les patients à haut risque ? *Anesth Réanimation*. 2015 Sep 1;1(Supplement 1):A34.

124. Crosina J, Lerner J, Ho J, Tangri N, Komenda P, Hiebert B, et al. Improving the Prediction of Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury. *Kidney Int Rep*. 2017 Mar;2(2):172–9.

125. Madsen NL, Goldstein SL, Frøslev T, Christiansen CF, Olsen M. Cardiac surgery in patients with congenital heart disease is associated with acute kidney injury and the risk of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2017 Sep;92(3):751–6.

126. Zhu X, Ji B, Wang G, Liu J, Long C. The effects of zero-balance ultrafiltration on postoperative recovery after cardiopulmonary bypass: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Perfusion*. 2012 Sep 1;27(5):386–92.

127. A Single-Center Randomized Trial of Intraoperative Zero-Balanced Ultrafiltration During Cardiopulmonary Bypass for Patients With Impaired Kidney Function Undergoing Cardiac Surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2015 Oct 1;29(5):1236–47.

128. Usuki F, Fujimura M, Yamashita A. Endoplasmic reticulum stress preconditioning attenuates methylmercury-induced cellular damage by inducing favorable stress responses. *Sci Rep*. 2013;3:2346.

129. Liu D, Liu X, Zhou T, Yao W, Zhao J, Zheng Z, et al. IRE1–RACK1 axis orchestrates ER stress preconditioning-elicited cytoprotection from ischemia/reperfusion injury in liver. *J Mol Cell Biol*. 2016 Apr 1;8(2):144–56.

130. Inagi R, Kumagai T, Nishi H, Kawakami T, Miyata T, Fujita T, et al. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2008 May;19(5):915–22.

131. Hertzberg D, Rydén L, Pickering JW, Sartipy U, Holzmann MJ. Acute kidney injury—an overview of diagnostic methods and clinical management. *Clin Kidney J*. 2017 Jun 1;10(3):323–31.

132. Gassanov N, Nia AM, Caglayan E, Er F. Remote ischemic preconditioning and renoprotection: from myth to a novel therapeutic option? *J Am Soc Nephrol JASN*. 2014 Feb;25(2):216–24.

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

134. Zarbock A, Schmidt C, Van Aken H, Wempe C, Martens S, Zahn PK, et al. Effect of remote ischemic preconditioning on kidney injury among high-risk patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2015 Jun 2;313(21):2133–41.
135. Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, et al. Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N Engl J Med*. 2015 Oct 8;373(15):1408–17.
136. Gambardella I, Gaudino M, Ronco C, Lau C, Ivascu N, Girardi LN. Congestive kidney failure in cardiac surgery: the relationship between central venous pressure and acute kidney injury. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2016;23(5):800–5.
137. Feihl F, Broccard AF. Interactions between respiration and systemic hemodynamics. Part II: practical implications in critical care. *Intensive Care Med*. 2009 Feb;35(2):198–205.
138. Gelman S. Venous function and central venous pressure: a physiologic story. *Anesthesiology*. 2008 Apr;108(4):735–48.

## Annexes

### **Annexe 1 classification KDIGO**

Stade	Créatinine plasmatique	Diurèse
1	$\geq 26,5 \mu\text{mol/l}$ ou 1,5 à 1,9 fois la créatinine plasmatique de base	$< 0,5 \text{ ml/kg/h}$ pendant 6 h à 12h
2	2,0 à 2,9 fois la créatinine plasmatique de base	$< 0,5 \text{ ml/kg/h}$ pendant $\geq 12\text{h}$
3	3,0 fois la créatinine plasmatique de base ou créatinine plasmatique $\geq 354 \mu\text{mol/l}$ ou mise en route de l'épuration extra-rénale	$< 0,3 \text{ ml/kg/h}$ pendant $\geq 24\text{h}$ ou anurie pendant $\geq 12\text{h}$

Le stade est déterminé par le critère le plus péjoratif entre "créatinine plasmatique" et "diurèse"

### **Annexe 2 Score de Cleveland**

Facteur de risque	Points
Sexe féminin	1
Insuffisance cardiaque congestive	1
Fraction d'éjection du ventricule Gauche $< 35\%$	1
Utilisation pré opératoire d'un ballon de contre pulsion	2
Bronchopneumopathie chronique obstructive	1
Diabète insulino requérant	1
Chirurgie cardiaque antérieure	1
Chirurgie en urgence	2
Chirurgie valvulaire uniquement	1
Pontage aorto coronarien + chirurgie valvulaire	2
Autre chirurgie cardiaque	2
Créatininémie préopératoire entre 1.2 et $< 2.1 \text{ mg/dl}$	2
Créatininémie préopératoire $\geq 2.1 \text{ mg/dl}$	4
Total	/ 15

**Annexe 3 Score AKICS, d'après Palomba et Al. (62)**

<b>Facteur de risque</b>	<b>Points</b>
Plusieurs procédures	3,7
Insuffisance cardiaque chronique	3,2
Créatininémie préopératoire $\geq 1.2$ mg/dl	3,1
Débit cardiaque diminué	2,5
Age > 65 ans	2,3
Durée de circulation extracorporelle > 120 min	1,8
Glycémie pré opératoire >140 mg/dl	1,7
Pression veineuse centrale >14 cm H <sub>2</sub> O	1,7
Total	/ 20

#### Annexe 4 : Items de l'Euroscore 2

Age
Sexe
Patient atteint de broncho-pneumopathie chronique obstructive.
Artériopathie périphérique.
Troubles neurologiques.
Chirurgie cardiaque antérieure.
Créatininémie préopératoire > 200 µmol/L.
Endocardite.
Etat préopératoire critique : Au moins un des évènements suivants : tachycardie ventriculaire, fibrillation ventriculaire, "mort subite" récupérée, massage cardiaque préopératoire, ventilation mécanique préopératoire, agents vasopresseurs , ballon de contrepulsion, Insuffisance rénale aigue (anurie ou oligurie < 10 mL/h).
Angor instable.
Fraction d'éjection
Infarctus myocardique récent.
Pression de l'Artère Pulmonaire Systolique > 60 mmHg.
Urgence.
Chirurgie cardiaque associée ou Non aux coronaires.
Chirurgie de l'aorte thoracique.
Réparation septale postinfarctus.

## Annexe 5 : Avis du comité de protection des personnes

# CPP Sud-Est III

## COMITÉ DE PROTECTION DES PERSONNES

### SECRETARIAT

Mme Elisabeth VERCHERAND

Groupement Hospitalier Est  
Bâtiment Pisé  
59 Boulevard Pinel  
69 500 BRON

+33 4 27 85 62 45

Ligne interne H.C.L. : 35 62 45

+33 4 27 85 90 85

cprudest3@gmail.com

elisabeth.vercherand@cha-lyon.fr

PROFESSEUR BERNARD HOLLEY  
HOPITAL EUROPEEN GEORGES POMPIDOU  
SERVICE D'ANESTHESIE REANIMATION  
20 RUE LEBLANC  
75015 PARIS

### BUREAU

Président

Pr François CHAPUIS

Vice-Présidente

Mme Vanessa VITTE

Secrétaire Général

Dr Dominique SAPPÉY-MARINIER  
Mme Elodie CAMIER-LEMOINE (adjointe)

Trésorier

Dr Marianne MAYNARD-MUET  
Mme Isabella DELFOUR (adjointe)

### MEMBRES

Mme Sonia BENKHELIFA

Mme Elodie CAMIER-LEMOINE

Pr François CHAPUIS

Pr Christian COLLOMBEL

Mme Evelyne DECULLIER

Dr Lambert DE FREMINVILLE

Mme Isabelle DELFOUR

Pr Sylvie DI FILIPPO

Mme Fabienne DOKET

Mme Claire DUROZARD

Mme Alexandra FAMERY

Mme Michèle FUSSELLIER

Mme Martine GEROUUD SAVOIE

Dr Audrey JANOLY-DUMENIL

M. Jean-Marie JOURNET

Mme Mireille LIOTARD GAZQUEZ

Dr Marianne MAYNARD-MUET

Mme Christel MOLLARD

Dr Sabine MOUCHET-MAGES

Dr François MICHEL

Mme Hélène ROMANO

Dr Dominique SAPPÉY-MARINIER

Me Nolte TERTRAIN

Mme Vanessa VITTE

Pr Luc ZIMMER

(Vs 14 octobre 2016)

CPP 2016- 072 B COURRIER N° 2

Numéro d'enregistrement de l'essai auprès du CPP : 2016-072 B		
Numéro EudraCT (ou ISRCTN, le cas échéant) : 2016-A01871-50		
Numéro de référence interne du demandeur : -		
Titre complet de l'essai clinique : « Exploration des perturbations de l'homéostasie rénale liées à l'ischémie-reperfusion post circulation extra corporelle (CEC) chez l'homme. Association avec la pression de perfusion rénale per-CEC ».		
Investigateur : Professeur Bernard HOLLEY		
Promoteur : Assistance Publique Hôpitaux de Paris		
Date de réception de la demande : (cf liste des pièces transmises ci jointes) 06 décembre 2016	Date de la demande d'informations complémentaires : 13 décembre 2016	Refus d'autorisation / avis défavorable : <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si oui, date :
Date du début de la procédure : 06 décembre 2016	Date de réception de la réponse du promoteur suite à la demande d'informations complémentaires formulée par le Comité : 03 février 2017	Autorisation / avis favorable : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non Si oui, date : 07 février 2017
<b>Avis formulé par le CPP le 07 février 2017</b>		
Au vu des compléments apportés répondant à ses remarques du 13 décembre 2016,		
Au vu des documents transmis le 17 janvier 2017, à savoir :		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- courrier de réponse aux remarques du Comité (daté du 03.02.17),</li> <li>- formulaire de demande d'avis (daté du 13.01.17),</li> <li>- document additionnel (daté du 13.01.17),</li> <li>- protocole (version 3 du 01.02.17),</li> <li>- résumé (version 3 du 01.02.17),</li> <li>- document d'information et consentement – étude principale (version 3 du 01.02.17),</li> <li>- consentement – examen des caractéristiques génétiques (version 2 du 01.02.17),</li> <li>- attestation d'assurance (datée du 13.01.17).</li> </ul>		
2016- 072 B/2* 07/02/2017 1/2		



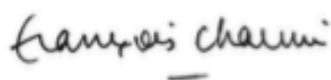
Et ainsi qu'il a été convenu en séance du 13 décembre 2016,

**le Comité émet un avis favorable à la réalisation de cette étude**

*Le Comité vous rappelle que conformément au Livre I, Titres II et III du Code de la Santé Publique régissant les recherches biomédicales, toute modification substantielle du protocole devra faire l'objet d'une demande d'avis complémentaire auprès de ce même comité. Par ailleurs, le Comité souhaiterait pour son information être destinataire du résumé du rapport final qui sera rédigé à l'issue de cette étude.*

Date :  
**07 février 2017**

Pour le Comité, le Président,  
Professeur François CHAPUIS



P.J.:

- Liste des pièces transmises dans le cadre de ce protocole,
- Liste des membres du Comité présents lors de la séance du 07 février 2017,
- Composition du Comité Sud-Est III.

2016-072 B/2\*

07/02/2017

2/2

**Groupeement Hospitalier Est**  
Bâtiment Pinel - CPP Sud-Est III  
59 Boulevard Pinel  
F-69500 BRON  
Tél : 04 27 85 62 45

## Annexe 6 Lettre d'information aux patients

**LETTRE D'INFORMATION**  
**DESTINEE AUX PATIENTS**  
**POUR PARTICIPATION A UNE ETUDE DE RECHERCHE COMPORTANT DES**  
**RISQUES ET CONTRAINTES MINIMES**

Version 3, date 01/02/2017

**Titre de la recherche :**

**Exploration des perturbations de l'homéostasie rénale liées à l'ischémie-reperfusion post-CEC chez l'homme. Association avec la pression de perfusion rénale per-CEC**

Promoteur : Assistance publique hôpitaux de Paris, 3 avenue Victoria 75003 Paris

Investigateurs :

Dr Thi Mum HUYNH, Hôpital européen Georges Pompidou, département d'anesthésie réanimation, 20 rue Leblanc 75015 Paris; tel : 0156093122

Dr Nicolas Pallet, Hôpital européen Georges Pompidou, département de biochimie, 20 rue Leblanc 75015 Paris

Pr Bernard CHOLLEY, Hôpital européen Georges Pompidou, département d'anesthésie réanimation, 20 rue Leblanc 75015 Paris; tel : 0156092515

Madame, Monsieur,

Nous vous proposons de participer à une étude de recherche clinique.

Cette lettre d'information vous détaille en quoi consiste cette étude.

Vous pourrez prendre le temps pour lire et comprendre ces informations de réfléchir à votre participation et pour demander au médecin responsable de l'étude de vous expliquer ce que vous n'aurez pas compris.

**BUT DE L'ETUDE :**

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence et de caractériser des marqueurs biologiques de l'insuffisance rénale aigue lors de la chirurgie cardiaque sous circulation extra corporelle.

**BENEFICE(S) ATTENDUS**

Mise en évidence d'outils biologiques permettant

- Une meilleure compréhension des mécanismes de l'insuffisance rénale aigue et chronique,
- Un diagnostic plus précoce de l'insuffisance rénale aigue et chronique
- Une amélioration de la prévention et du traitement de l'insuffisance rénale aigue.

#### DEROULEMENT DE L'ETUDE

Durée totale de l'étude : du 1<sup>er</sup> janvier 2017 à l'inclusion du 50<sup>e</sup> patient

Le protocole sera proposé la veille de l'intervention à chaque participant. Un délai minimal de réflexion de 24h est proposé avant la signature du consentement.

Durée de l'étude pour chaque participant : 6 mois

- Prélèvement urinaire (50 mL) le jour de l'intervention au bloc opératoire et le lendemain de l'intervention en réanimation ; Nous réaliserons un ionogramme urinaire, une électrophorèse des protéines urinaires, protéinurie, albuminurie, créatininurie. Nous extraierons les ARN à la recherche de 3 biomarqueurs (angiogénine, NGAL et KIM-1)
- Dosage de la créatinine le jour de l'intervention et le lendemain post
- Dosage de la créatinine 6 mois après l'opération. Une ordonnance vous sera délivrée à cet effet à votre sortie de l'hôpital.

#### RISQUES POTENTIELS

Pas d'effets indésirables possibles.

Cette étude ne comporte que des risques et des contraintes minimales. En effet :

- La recherche ne modifie pas la prise en charge pré, per et post opératoire ;
- La recherche nécessite l'analyse de plusieurs échantillons d'urine (méthode non invasive, rapide, très peu onéreuse) et du ionogramme sanguin (prélevé de façon quotidienne les premiers jours post opératoires).

#### FRAIS MEDICAUX

Votre collaboration à ce protocole de recherche biomédicale n'entraînera pas de participation financière de votre part. Conformément à la loi, tous les frais liés à l'étude seront pris en charge par le promoteur de l'étude.

#### LEGISLATION - CONFIDENTIALITE

Conformément aux articles L. 1121-1 et suivants du Code de la Santé Publique, le Comité de Protection des Personnes SUD-EST III désigné aléatoirement, a étudié ce projet de recherche et a émis un avis favorable à sa réalisation le 07/02/2017

Toute information vous concernant recueillie pendant cet essai sera traitée de façon confidentielle.

Seuls les responsables de l'étude et éventuellement les autorités de Santé pourront avoir accès à ces données. A l'exception de ces personnes -qui traiteront les informations dans le plus strict respect du secret médical-, votre anonymat sera préservé. La publication des résultats de l'étude ne comportera aucun résultat individuel.

Les données enregistrées à l'occasion de cette étude feront l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur. S'agissant de données nominatives, vous bénéficiez à tout moment, du droit d'accès et de rectification des données vous concernant auprès des responsables de l'étude et , en ce qui concerne les informations de nature médicale, ce droit est exercé par l'intermédiaire du Professeur Bernard Cholley conformément à la loi 78-17 du 06 janvier 1978 relative à l'Informatique, aux Fichiers et aux Libertés, modifiée par la loi n°94-548 du 1er juillet 1994, relative au traitement des données nominatives ayant pour fin la recherche dans le domaine de la santé. Conformément à l'article L 1122-1 du Code de la Santé

Publique (loi de Mars 2002 relative aux droits des malades) les résultats globaux de l'étude pourront vous être communiqués si vous le souhaitez.

Si vous avez des questions pendant votre participation à cette étude, vous pourrez contacter le médecin responsable de l'étude, le Pr Bernard Cholley, tél : 0156092515

Vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette étude. Cela n'influencera pas la qualité des soins qui vous seront prodigués.

Le début du protocole commencera le jour de l'intervention.

Vous pouvez également décider en cours d'étude d'arrêter votre participation sans avoir à vous justifier.

Nous vous remercions d'avoir pris le temps de lire cette lettre d'information. Si vous êtes d'accord pour participer à cette recherche, nous vous invitons à signer le formulaire de consentement ci-joint dans un délai de 24h.

## Annexe 7 Consentement

**FORMULAIRE DE CONSENTEMENT  
POUR LA PARTICIPATION A UNE ETUDE DE RECHERCHE COMPORTANT DES  
RISQUES ET CONTRAINTES MINIMES**

**Titre de la recherche :**

**Exploration des perturbations de l'homéostasie rénale liées à l'ischémie-reperfusion post-CEC chez l'homme. Association avec la pression de perfusion rénale per-CEC**

Version 2, date 19/12/2016

Je soussigné(e) .....(*nom et prénom*), accepte de participer à l'étude.

Les objectifs et modalités de l'étude m'ont été clairement expliqués par le Dr Bernard Cholley.

J'ai lu et compris la fiche d'information qui m'a été remise.

J'accepte que les documents de mon dossier médical qui se rapportent à l'étude puissent être accessibles aux responsables de l'étude et éventuellement aux autorités de santé. A l'exception de ces personnes, qui traiteront les informations dans le plus strict respect du secret médical, mon anonymat sera préservé.

J'accepte que les données nominatives me concernant recueillies à l'occasion de cette étude puissent faire l'objet d'un traitement automatisé par les organisateurs de la recherche. Je pourrai exercer mon droit d'accès et de rectification auprès du Pr Bernard Cholley.

J'ai bien compris que ma participation à l'étude est volontaire.

Je suis libre d'accepter ou de refuser de participer, et je suis libre d'arrêter à tout moment ma participation en cours d'étude. Cela n'influencera pas la qualité des soins qui me seront prodigués.

Mon consentement ne décharge pas les organisateurs de cette étude de leurs responsabilités. Je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Après en avoir discuté et avoir obtenu la réponse à toutes mes questions, j'accepte librement et volontairement de participer à la recherche qui m'est proposée.

Fait à Paris le .....

*Nom et signature de l'investigateur*

*Signature du patient*

**Formulaire de consentement  
en vue d'un examen des caractéristiques génétiques d'une personne**

Version 2, date 01/02/2017

Conformément aux articles L.1131-1 du code de la santé publique et 16-10 du code civil

Je soussigné(e) ....., reconnais avoir reçu par le  
Dr ..... les informations sur les examens génétiques réalisés dans  
mes urines.

L'objectif est de rechercher la présence de biomarqueurs urinaires susceptibles de s'exprimer  
secondairement à ma chirurgie cardiaque en rapport avec une éventuelle insuffisance rénale post opératoire.

Pour cela, je consens au prélèvement d'un échantillon d'urine pendant la chirurgie et au lendemain de  
l'intervention.

L'ensemble des données médicales me concernant seront protégées grâce à une anonymisation totale.  
Je suis conscient que cette étude ne sera sans aucun préjudice pour moi.

Après en avoir discuté et avoir obtenu la réponse à toutes mes questions, j'accepte librement et  
volontairement de participer à la recherche qui m'est proposée.

Fait à Paris le .....

*Nom et signature de l'investigateur*

*Signature du patient*



Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

journal homepage: [www.ebiomedicine.com](http://www.ebiomedicine.com)



Research Paper

## Real-Time and Non-invasive Monitoring of the Activation of the IRE1 $\alpha$ -XBP1 Pathway in Individuals with Hemodynamic Impairment



Baptiste Fohlen<sup>a,b,c,1</sup>, Quentin Tavernier<sup>c,e,1</sup>, Thi-mum Huynh<sup>a,b,c</sup>, Cédric Caradeuc<sup>c,d</sup>, Delphine Le Corre<sup>c,e</sup>, Gildas Bertho<sup>c,d</sup>, Bernard Cholley<sup>a,b,c</sup>, Nicolas Pallet<sup>b,c,e,f,g,\*</sup>

<sup>a</sup> Département d'Anesthésie et de Réanimation Cardiovasculaire, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

<sup>b</sup> Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Paris, France

<sup>c</sup> Université Paris Descartes, Paris, France

<sup>d</sup> Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS) U8601, Paris, France

<sup>e</sup> Institut National de la Santé et la Recherche Médicale (INSERM) U1147, Paris, France

<sup>f</sup> Service de Néphrologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

<sup>g</sup> Service de Biochimie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 November 2017

Received in revised form 7 December 2017

Accepted 19 December 2017

Available online 20 December 2017

#### Keywords:

Endoplasmic reticulum stress

Unfolded protein response

Acute kidney injury

Cardiopulmonary bypass

XBP1

IRE1 $\alpha$

### ABSTRACT

Many stressors that are encountered upon kidney injury are likely to trigger endoplasmic reticulum (ER) stress, subsequently activating transcriptional, translational and metabolic reprogramming. Monitoring early cellular adaptive responses engaged after hemodynamic impairment yields may represent a clinically relevant approach. However, a non-invasive method for detecting the ER stress response has not been developed. We combined a metabolomic approach with genetic marker analyses using urine from individuals undergoing scheduled cardiac surgery under cardiopulmonary bypass to investigate the feasibility and significance of monitoring the ER stress response in the kidney. We developed an original method based on fragment analysis that measures urinary levels of the spliced X-box binding protein 1 (sXBP1) mRNA as a proxy of inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ) activity because sXBP1 is absolutely sensitive and specific for ER stress. The early engagement of the ER stress response after ischemic stress is critical for protecting against tissue damage, and individuals who mount a robust adaptive response are protected against AKI. The clinical consequences of our findings are of considerable importance because ER stress is involved in numerous conditions that lead to AKI and chronic kidney disease; in addition, the detection of ER stress is straightforward and immediately available in routine practice.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### 1. Introduction

Medical conditions that ultimately lead to ischemic tissue injury, such as ischemic acute kidney injury (AKI), are accompanied by micro-environmental alterations (nutrients, growth factors and oxygen deprivation) and disturbances in cellular homeostasis (energetic failure) in the kidney, forcing cells to engage adaptive responses to reduce or eliminate the intensity of the stressor, initiate metabolic reprogramming, regulate the fate of the cell by activating both anti- and pro-apoptotic pathways, and activate communication networks with the immune system to signal a problem (Chovatiya and Medzhitov, 2014; Kotas and Medzhitov, 2015). These molecular and cellular adaptive responses occur very early after the initiation of a stressful condition, long before cell death and the initiation of

maladaptive repair processes (Bonventre and Zuk, 2004; Duffield, 2014; Ferenbach and Bonventre, 2015; Zuk and Bonventre, 2016). Therefore, the detection of their activation constitutes an opportunity for the early diagnosis of ongoing tissue injury, which is crucial for the development of preventive and therapeutic strategies in renal medicine.

Endoplasmic reticulum (ER) stress and its adaptive response, the unfolded protein response (UPR), represent an archetypal example of these adaptive stress responses. ER stress and the disruption of ER proteostasis or parts of the UPR that, for instance, affect epithelial cells, actively participate in the development of AKI and chronic kidney disease (CKD) (El Karoui et al., 2016; Inagi et al., 2014; Mami et al., 2016a; Mami et al., 2016b; Zuk and Bonventre, 2016). A wide range of cellular environments and events induce ER stress, including an autophagy deficiency, energy deprivation, limited or excess nutrients, dysregulated calcium levels, perturbations in redox homeostasis, inflammatory challenges and hypoxia, virtually all of which are encountered in medical situations that promote ischemic AKI (Walter and Ron, 2011). Under ER stress conditions, the aim of the UPR is to adapt to the changing environment and reestablish normal ER function by inducing

\* Corresponding author at: Service de Biochimie, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20, rue Leblanc, 75015 Paris, France.

E-mail address: [nicolas.pallet@parisdescartes.fr](mailto:nicolas.pallet@parisdescartes.fr) (N. Pallet).

<sup>1</sup> Baptiste Fohlen and Quentin Tavernier are co-first authors.



transcriptional, translational, and metabolic reprogramming (Walter and Ron, 2011; Wang and Kaufman, 2016; Gao et al., 2015; Wellen and Thompson, 2010). Three major mediators are involved in the UPR: ATF6 (activated transcription factor 6), IRE1 $\alpha$  (inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ ) and PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase).

Of particular interest in the UPR is the IRE1 $\alpha$ /X-box binding protein-1 (XBP1) axis. The ribonuclease activity of IRE1 $\alpha$  catalyzes the unconventional splicing of a 26 nucleotide intron from the mRNA encoding the transcription factor XBP1, creating a transcriptionally active spliced XBP1 (sXBP1). XBP1 protein translated from mammalian unspliced XBP1 mRNA acts as negative regulator by heterodimerizing with the transcription factor sXBP1 to promote its degradation. Genes that are regulated by sXBP1 enhance protein folding, transport, and degradation, expand protein secretory pathways, and rewire cellular energetic metabolism (Wu et al., 2015; Cubillos-Ruiz et al., 2015; Chen et al., 2014; Hetz and Glimcher, 2009). Therefore, the activation of the IRE1 $\alpha$ /XBP1 axis protects against ER stress. The clinical (yet unproven) consequence of the activation of this pathway would be that the robust production of sXBP1 induces (and could predict) protection against tissue damage and the detection of sXBP1 may have prognostic value. Since XBP1 splicing depends exclusively on IRE1 $\alpha$  activity, sXBP1 is only produced if and when ER stress occurs (with a rare exception), therefore reflecting the presence of ER stress with absolute sensitivity. In some specific cases, IRE1 $\alpha$  is not activated by the accumulation of misfolded proteins within the RE: Toll like receptors 2 and 4 activation by microbial products specifically promotes the phosphorylation of IRE1 $\alpha$  and the activation of XBP1 (Martinon et al., 2010). In turn, a lack of sXBP1 production virtually eliminates the possibility of activating the IRE1 $\alpha$  branch of the UPR.

We performed this proof of concept study to test and validate the hypothesis that the ER stress response to a renal ischemic insult can be non-invasively monitored and provides information about patients' risks of developing AKI. Therefore, we combined a metabolomic approach for monitoring metabolic reprogramming with an original method that measures urinary levels of the sXBP1 mRNA as a readout of IRE1 $\alpha$  activity to dynamically and non-invasively monitor renal ER stress. This prospective pilot study was performed in a cohort of individuals undergoing scheduled cardiac surgery under extracorporeal circulation using cardiopulmonary bypass (CPB), a procedure that promotes hemodynamic impairment and ischemic stress in the kidney.

## 2. Methods

### 2.1. Patients

From 17 February 2017 to 26 April 2017, 42 patients undergoing scheduled cardiac surgery with CPB were enrolled. The exclusion criteria were: an eGFR < 30 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, infusion of a radio contrast agent within the 24 h before surgery, a preoperative left ventricular ejection fraction < 40%, age < 18 years, pregnancy, and the inability to provide consent. AKI was diagnosed according to the KDIGO Clinical Practice Guideline for AKI criteria (<http://kdigo.org/>) using serum creatinine levels and urine output after the surgery.

### 2.2. Study Approval

This single-center, prospective, pilot study was approved by the French ethical committee on 7 February 2017 (CPP Sud Est III n° 2016-072 B) and registered under the EudraCT n° 2016-A01871-50. All patients provided written consent for study participation and for the biological analysis before inclusion.

### 2.3. Surgical Procedure

All medications acting on the renin-angiotensin system and all diuretics were stopped on the day before surgery. General anesthesia was induced according to the protocols of the Anesthesiology

Department. Anesthesia was induced and maintained in patients using target-controlled infusions of sufentanil and propofol. Atracurium was used for all anesthetics. Hemodynamic parameters were monitored with a radial artery catheter on a Philips Intellivue® MX 800. Tranexamic acid was injected before and after CPB. The CPB target flow rate was calculated using the following equation: flow (l/min) = 2.6 × body surface area. Heparin was infused before and during CPB to achieve and maintain an activated clotting time > 400 s. The protamine dose was calculated at a 1:1 rate of the heparin dose and infused at the end of CPB. Cardioplegia was applied at the discretion of the anesthesiologist based on clinical, echocardiographic and biological findings. After surgery, all patients were transferred to the cardiovascular intensive care unit (ICU).

### 2.4. Prospective Sample and Data Collection

Urine samples were collected from a urinary catheter at 3 different times: (1) after the induction of anesthesia and before the start of CPB, (2) at the end of the CPB procedure, and (3) on the day after surgery in the ICU. Urine samples were collected in Corning 50-ml conical tubes and centrifuged at 2000g for 20 min within 4 h of collection. Cell pellets were conserved in 300  $\mu$ l of RLT® buffer (Qiagen™, France) and stored until mRNA extraction. Supernatants and cell pellets were stored at –80 °C until analysis. Hemodynamic data were extracted from the Philips system using IXTREND® software version 2.1.0 FW14 (Ixellence GmbH, Germany). MAP values were recorded every 1.25 s during the CPB procedure. Clinical data were prospectively extracted from the hospital's electronic medical records. All clinical data and samples were de-identified.

### 2.5. <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy

Urine samples were prepared to obtain a final volume of 600  $\mu$ l (400  $\mu$ l of urine; 160  $\mu$ l of 200 mM phosphate buffer, pH 7.4; 1 mM trimethyl silyl propionate, sodium salt (TSP) as the NMR chemical shift reference, 6 mM Na<sub>3</sub>N; and 40  $\mu$ l of D<sub>2</sub>O). Urine <sup>1</sup>H NMR spectra were measured at 300 K on a Bruker Avance II® 500 MHz spectrometer (Bruker Biospin GmbH, Germany) equipped with a SampleXpress® automation sample changer and a standard 5 mm broadband inverse (BBI) probe with a Z-gradient. The spectra were acquired using a 1D nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) pulse sequence with presaturation for water suppression. The parameters used for the pulse sequence were: a relaxation delay of 1 s, a mixing time of 100 ms, an acquisition time of 1.36 s and a 90° pulse length of 8  $\mu$ s. Data points (32K) were collected during 64 scans with a spectral width of 20 ppm.

Preprocessing of the urine <sup>1</sup>H NMR spectra was performed with MestReNova® 8.0 software. A line-broadening factor of 0.3 Hz was applied prior to Fourier transform. The spectra were then phased, baseline corrected, and referenced to TSP. Each <sup>1</sup>H NMR spectrum (0.24 to 10.00 ppm) was reduced by an equidistant binning method with a bin width of 0.04 ppm to limit misalignment problems. The spectral regions corresponding to urea (5.52 to 6.04 ppm) and water (4.28 to 5.24 ppm) were deleted to remove variability because of the suppression of water. Integral normalization (typically a constant integral of 100) was performed on the remaining 210 bins. The resulting matrix was normalized with a commonly applied method for equidistant binned spectra, Pareto scaling, by dividing the mean-centered variables (bins) by the square root of their standard deviations.

### 2.6. Fragment Analysis of Urine sXBP1 and XBP1 mRNA Levels

RNA was extracted from the pellets using the RNeasy mini kit® (Qiagen™) and reverse-transcribed into cDNAs using TaqMan® Reverse



Transcription Reagents (Applied Biosystems™). Basically, the fragment analysis involved the following 3 steps:

- (1) Amplification of the sXBP1 and XBP1 cDNAs by PCR using fluorogenic oligonucleotide primers. Several differently colored fluorescent dyes are detectable in one sample. We designed the following fluorogenic oligonucleotide primers (tagged with hexachloro-fluorescein, HEX, green) for the fluorometric detection of sXBP1 and XBP1 mRNA levels: Forward primer: (5'-HEX)GGAGTTAAGACAGCGCTTGG and Reverse Primer: GAGATGTCTGGAGGGTGA. We performed PCR using HotStar Taq® DNA polymerase on a thermal cycler with the following program: 95 °C for 10 min; 40 cycles of 94 °C for 30 s, 59 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s; and a final step of 72 °C for 10 min.
- (2) Labeled fragments (amplicons) were separated by size using capillary electrophoresis and the fluorescence intensity was

**Table 1**  
Description of the cohort undergoing cardiac surgery.

Characteristics	All (n = 42)	AKI (n = 12)	No AKI (n = 30)	P value
Age (years)	62.1 ± 15.3	64.3 ± 4.4	61.3 ± 2.8	0.56
Men, n (%)	26 (62)	6 (50)	20 (66)	0.31
BMI (kg/cm <sup>2</sup> )	25.8 ± 4.9	27 ± 0.4	25.3 ± 0.9	0.31
Preexisting medical condition, n (%)				
• Hypertension	21 (50)	7 (58)	14 (46)	0.49
• Diabetes	2 (4.7)	1 (3)	1 (8)	0.5
• Obesity	7 (16)	2 (16)	5 (16)	1
• Atherosclerotic disease	6 (14.2)	2 (16)	4 (16)	0.78
• CKD	9 (21)	4 (33)	5 (16)	0.28
Preoperative characteristics				
• eGFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	73.9 ± 22.9	63 ± 6.3	78.3 ± 4	0.49
• Ejection fraction (%)	60.6 ± 9.4	62 ± 2.7	61.1 ± 1.7	0.57
• Cleveland score	2.5 ± 1.4	2.7 ± 0.4	2.4 ± 0.2	0.52
• Euroscore 2 <sup>a</sup>	2.7 ± 2.8	3.2 ± 0.8	2.5 ± 0.5	0.47
Preoperative medications, n (%)				
• RAS inhibitors	18 (43)	4 (33)	14 (46)	0.4
• Diuretics	12 (28)	7 (23)	5 (16)	0.27
• Beta blockers	22 (52)	8 (66)	14 (46)	0.26
Indications, n (%)				
• CABG	11 (26)	5 (41)	6 (20)	0.15
• Mitral valve	8 (19)	6 (20)	2 (16)	0.81
• Aortic valve	24 (57)	8 (66)	16 (66)	0.43
• Ascending aorta	6 (14)	1 (8)	5 (16)	0.46
• Others	6 (14)	1 (8)	5 (16)	0.46
Operative parameters				
• CBP length (min)	99.3 ± 22.9	109 ± 10.4	95 ± 6.5	0.25
• Aortic cross-clamp length (min)	75.1 ± 30.7	84 ± 8.8	71.6 ± 5.6	0.25
• Whole procedure length (min)	294.5 ± 45.2	311.6 ± 12.8	287.6 ± 8.1	0.12
• Fluid loading (ml)	1561.9 ± 708.8	1250 ± 198	1686.6 ± 125.7	0.07
• Blood loss (ml)	3014.9 ± 1382	3277.1 ± 419.4	2908.1 ± 267.7	0.46
• Cell saver (ml)	799.6 ± 620.8	692.2 ± 188.5	843.4 ± 120.3	0.5
• Per CBP urine output (ml/kg/h)	62.5 ± 87.5	64.7 ± 25.5	61.6 ± 16.1	0.9
• Per procedure urine output (ml/kg/h)	145 ± 106.5	162.1 ± 30.9	137.9 ± 19.9	0.51
Post-operative parameters				
• 24 h fluids administration (ml) <sup>b</sup>	2005 ± 737	2145 ± 214	1950 ± 135	0.5
• Catecholamine use (days) <sup>c</sup>	0.7 ± 1.1	1.2 ± 0.3	0.5 ± 1.1	0.05
• Dialysis, n (%)	3 (7)	3 (25)	0 (0)	0.004
• ICU stay (days)	3.5 ± 3.7	5.3 ± 1	2.8 ± 0.6	0.04
• Hospital stay (days)	15.3 ± 8.6	19.5 ± 9.5	13.7 ± 1.5	0.04
• Death, n (%)	2 (5)	2 (16)	0 (0)	0.02

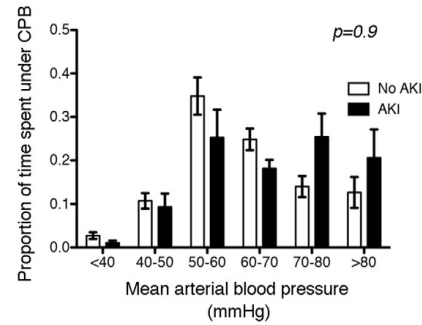
Plus-minus values are means ± standard deviation.

BMI denotes body mass index; DSA, donor-specific antibodies; CKD, chronic kidney disease; eGFR, estimated glomerular filtration rate; RAS, renin-angiotensin system; CABG, coronary artery bypass grafting; CPB, cardiopulmonary bypass; ICU, intensive care unit.

<sup>a</sup> Euroscore 2, [www.euroscore.org/calc.html](http://www.euroscore.org/calc.html).

<sup>b</sup> Includes albumin, Ringer's lactate, plasmion, or C5%.

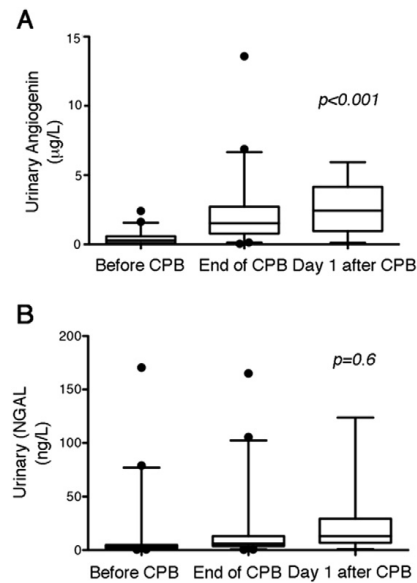
<sup>c</sup> Includes norepinephrine, dobutamine or adrenaline.



**Fig. 1.** Time spent at a given mean arterial blood pressure and acute kidney injury occurrence. Histograms present the proportions of time spent at a given mean arterial blood pressure during cardiopulmonary bypass registered in real-time using XTrend® software, according to the occurrence of acute kidney injury, which were compared using a two-way ANOVA.

measured using the Applied Biosystems™ 3730xl DNA Analyzer. One of the dye colors (GENESCAN® ROX 400 HD size standard, Applied Biosystems™, red) is used to detect a labeled size standard present in each sample. Fragments and ROX 400 HD are mixed with HiDi™ Formamide (Applied Biosystems™) prior to capillary electrophoresis.

- (3) The data were analyzed using GeneMapper® Software to determine the relative size of each dye-labeled fragment in the sample by comparing fragments with the standard curve for that specific sample.



**Fig. 2.** Expression of markers of Endoplasmic Reticulum stress in urines during the procedure. A. Box and whisker plots present the distribution of angiogenin concentrations in the urine of 42 individuals undergoing cardiac surgery before, at the end and the day after CPB, which were compared using one-way ANOVA. B. Box and whisker plots present the distribution of NGAL concentrations in the urine of 42 individuals undergoing cardiac surgery before, at the end and on the day after CPB, which were compared using one-way ANOVA.

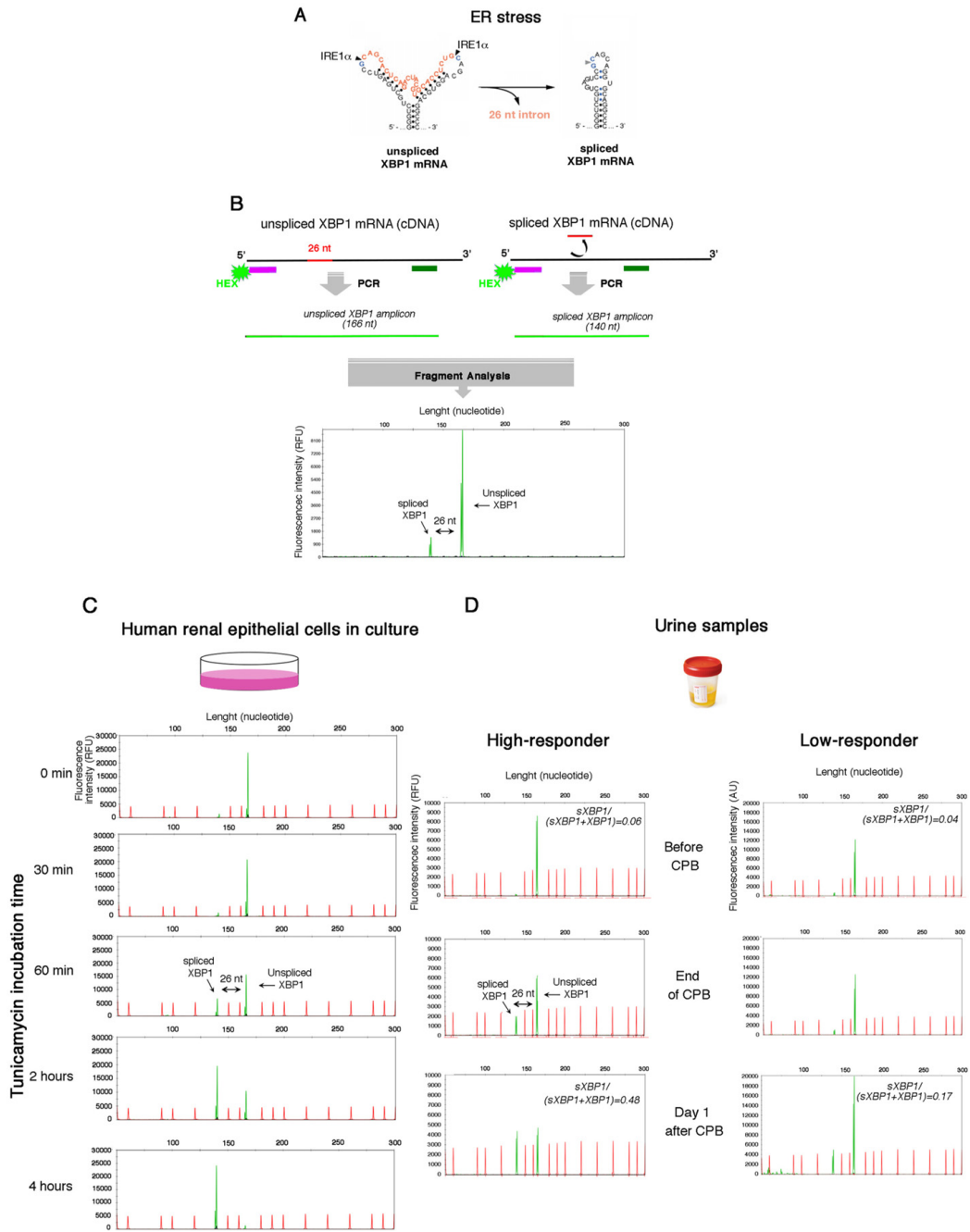


Fig. 3 (Caption on next page)

## 2.7. Urinary Angiogenin and NGAL Measurements

Urinary angiogenin and NGAL levels were quantified using the human Angiogenin and Lipocalin-2/NGAL Quantikine® ELISA Immunoassays (R&D Systems, USA), according to the manufacturer's protocol. Since the urinary angiogenin and NGAL concentrations were strongly correlated with their respective ratios with the corresponding urinary creatinine concentration (not shown), we did not adjust the values for the urinary creatinine concentration.

## 2.8. Statistical Analysis

Continuous variables are presented as the mean and standard deviation and categorical variables are presented as proportions. Student's *t*-test was used to analyze the variance of continuous variables between different groups. Dichotomous variables were compared using the chi-square test. One-way and two-way ANOVAs were used to compare multiple mean values. Statistical analyses were performed using JMP 10® software (SAS, USA). All tests were two-sided, and *P* values < 0.05 were considered to indicate a significant difference.

Unsupervised analysis of metabolomic data has been performed using the PCA method with the SIMCA® 13.0 software (Umetrics™ AB, Sweden). Quality controls of the data were performed by deriving the principal component and its corresponding limits for the Hotelling's  $T^2$  ellipse (strong outliers) and model residuals by using Distance in the Model in X space (DModX, moderate outliers) at the 99% confidence level. The models were evaluated with  $R^2X$  to estimate the goodness of the fit, and  $Q^2X$  estimate of the predictive ability of the model.

## 3. Results

### 3.1. Description of the Cohort and AKI Occurrence

We conducted a single-center, prospective study and enrolled 42 patients undergoing scheduled cardiac surgery with CPB. Baseline information, pre-operative parameters and post-operative outcomes are detailed in Table 1. The notable characteristic of this cohort is that AKI, as defined by the KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury criteria (<http://kdigo.org/>), occurred in 28% ( $n = 12$ ) of patients. Two patients died at least 7 days after surgery. The mean CPB duration was  $99 \pm 36$  min and the mean aortic cross-clamp duration was  $75 \pm 30$  min, but neither of these parameters were associated with AKI occurrence. Real-time mean arterial pressure (MAP) recordings collected during the CPB procedure using IXTREND® monitoring software indicated that the mean arterial blood pressure had no impact on the occurrence of AKI in our cohort (Fig. 1). As expected, baseline renal function (before CPB) influenced the occurrence of AKI. The mean estimated glomerular filtration rate (eGFR) was  $78 \pm 24$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> in individuals without AKI compared with  $63 \pm 13$ ,  $78 \pm 24$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> in individuals with AKI ( $p = 0.01$  with Student's *t*-test). None of the other parameters that could impact renal function after CPB did influence AKI occurrence in our cohort (Table 1).

### 3.2. Real Time Monitoring of ER Stress by the Detection of sXBP1 in Urine

The engagement of an adaptive program defined by early activation of the ER stress response could affect the amplitude of the injury and the

renal outcomes. We repeatedly measured the urine angiogenin concentrations (an indirect marker of the activity of the IRE1 $\alpha$ /sXBP1 axis) (Tavernier et al., 2017) and neutrophil gelatinase-activated lipocalin (NGAL), which is regulated by the PERK/ATF4 pathway (El Karoui et al., 2016), to obtain additional information about the activation of the UPR during the CPB procedure. Notably, there is no known non-invasive biomarker that is produced and secreted in urine under the control of ATF6. Urine angiogenin concentrations increased significantly over time (Fig. 2A), but NGAL concentrations did not (Fig. 2B), indicating that the IRE1 $\alpha$ /sXBP1 axis, rather than the PERK/ATF4 axis of the UPR appears to be activated in our cohort under these specific hemodynamic conditions.

We developed a method for measuring sXBP1 mRNA levels in urine (cell pellets) to provide definitive evidence that UPR activation following a hemodynamic impairment can be directly and non-invasively monitored. Because the XBP1 mRNA is 26 nucleotides longer than sXBP1 (Fig. 3A), we adopted a genetic marker analysis experiment (fragment analysis) to detect changes in the length of the XBP1 mRNA before and after splicing using PCR with fluorescent dye-labeled primers specific for the XBP1 coding sequence (Fig. 3B). Then, the PCR amplicons are separated according to their sizes and analyzed on a capillary electrophoresis-based DNA sequencing instrument. The fragment (amplicon) corresponding to the unspliced XBP1 mRNA is predicted to be 166 nucleotides, whereas the fragment (amplicon) corresponding to spliced XBP1 mRNA is predicted to contain 140 nucleotides (Fig. 3B).

We validated the biological relevance of this method *in vitro* using cultured human epithelial cells incubated with tunicamycin, a molecule that inhibits N-linked glycosylation and promotes ER stress (Marciniak et al., 2004). In untreated resting cells, sXBP1 was not detected. However, it progressively appeared after 60 min of tunicamycin exposure, and the intensity of the fluorescent peak increased for up to 4 h, and the intensity of the unspliced XBP1 peak progressively decreased (Fig. 3C).

We obtained similar profiles in the urine pellets of individuals undergoing CPB with an incremental increase in the peak intensities of sXBP1 (before, immediately after and one day after CPB), along with a parallel decrease in the intensities of the XBP1 peak (Fig. 3D, left panel). We also identified individuals in whom urinary sXBP1 levels with a much more moderate increase during the procedure, who were called "Low-responder" in Fig. 4D (right panel).

We calculated the ratio of sXBP1/(sXBP1 + XBP1) for each sample and used it as a proxy of the intensity of the UPR to determine the clinical relevance of the differences in the levels of sXBP1 among individuals undergoing CPB; one advantage is that this parameter does not depend on the urine concentration and does not require the use of a housekeeping gene for interpretation. These ratios significantly increased following CPB (Fig. 4A), confirming that hemodynamic impairments initiate ER stress and sXBP1 expression.

In addition, individuals who experienced AKI episodes exhibited a lower increase in sXBP1 ratios from the beginning to the end of CPB than individuals who did not experience AKI (Fig. 4B), suggesting that robust and early activation of the IRE1 $\alpha$ /sXBP1 axis likely protects against AKI. In line with this, no AKI episode was observed in patients with a CPB sXBP1/(sXBP1 + XBP1) ratio increased at least 2 fold before/after CPB (*c* statistic 0.82, 95%IC, 0.61 to 1) (Table 2). However, values below these cutoffs have a low discriminative value and cannot predict the occurrence of AKI in patients at risk. Together, these results indicate that the detection of a strong adaptive response by the mean of

**Fig. 3.** Real time monitoring of Endoplasmic Reticulum stress by the detection of sXBP1 in urine. A. Schematic representing the excision of a 26 nucleotide intron from the XBP1 mRNA by IRE1 $\alpha$  upon ER stress, resulting in the spliced form of XBP1, sXBP1. B. Graphical summarization of the principles of the fragment analysis used to detect XBP1 mRNA. C. The pattern of peaks resulting from the fragment analysis using capillary electrophoresis with GeneMapper®. Green peaks denote XBP1 (166 nucleotides) and sXBP1 (140 nucleotides) amplicons. Red peaks denote the size standards. The height of each peak corresponds to its relative fluorescence intensity. The x-axis denotes the fragment size. Total mRNAs were extracted from cultured renal epithelial cells that had been incubated with 2.5  $\mu$ g/ml tunicamycin for various periods of time to induce ER stress. D. The pattern of peaks resulting from the fragment analysis performed on mRNA extracted from urinary cell pellets in individuals undergoing CPB. "High-responder" patients show the incremental conversion of unspliced XBP1 to spliced XBP1 over time (left panel), but "Low-responder" patients fail to show significant increase in sXBP1/(sXBP1 + XBP1) levels (right panel).

urinary sXBP1 monitoring is predictive of a protection against AKI, but that a response of low intensity has a limited value for identifying patients who will develop AKI.

### 3.3. CPB Promotes Metabolic Reprogramming and Impacts Urinary Metabolomic Profiles

We postulate that the metabolic reprogramming processes within adaptive responses that are engaged early after the initiation of hemodynamic stress display distinct activation profiles, possibly resulting in different activities of the ER stress response. We compared the urinary metabolomic signatures (interpreted as a readout of ongoing cellular metabolic reprogramming in the kidney) of patients undergoing CPB using proton-based nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR) spectroscopy. This technique allows the rapid, reproducible and comprehensive characterization of small molecules in urine and generates metabolic fingerprints, but it is less effective than mass spectrometry-based methods at identifying specific molecules and potential biomarkers (Beckonert et al., 2007; Lindon and Nicholson, 2008; Barding Jr et al., 2012; Zhang et al., 2012). Principal component analysis (PCA) of the 126 (42x3) urinary metabolomes of the 42 patients before CPB (at the time of anesthesia induction, shown in green in Fig. 5A), at the end of the CPB (shown in blue in Fig. 5A), and on the day after the surgical procedure (shown in red in Fig. 5A) illustrates the displacement of the individuals along the 2 principal component axes due to qualitative metabolomic changes that occur within urine during the procedure. Thus, in a few hours (mean CPB,  $99 \pm 36$  min), CPB promotes renal metabolic reprogramming and profoundly alters the urinary metabolome. Notably, these profiles are not influenced by variations in urine concentration because each metabolome is completely normalized and compared as a whole.

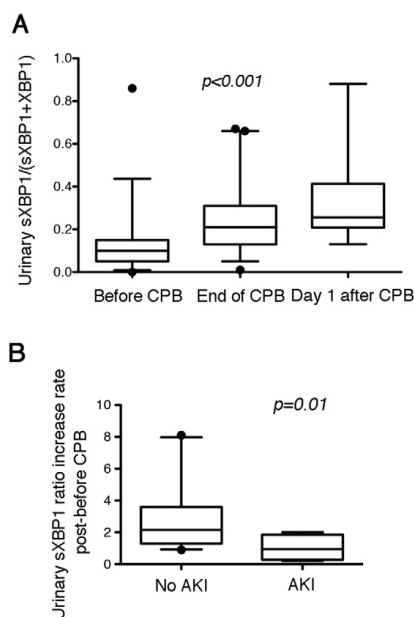
Moreover, a group of patients displayed extreme qualitative metabolomic changes from the beginning to the end of CPB (Fig. 5B, circled in pale red, and Fig. 5C, left panel). Since metabolic reprogramming is a hallmark of the activation of adaptive responses to ischemia and is contingent on ER stress, we tested whether variations in the ER stress response be associated with these metabolic changes. The group of patients (Metabo group 1,  $n = 14$ ), who displayed the highest metabolomic variations compared with their baseline values had significantly lower sXBP1/(sXBP1 + XBP1) ratio levels at the end of CPB compared the rest of the cohort (Fig. 5D), indicating that individuals who activate a robust ER stress response do not exhibit an early metabolic reprogramming.

Together, these results indicate that individuals differentially activate adaptive responses upon renal ischemic stress that are defined by early metabolic reprogramming and activation of the ER stress response. However, the relationship between ER stress and metabolic reprogramming, and the impact of ER stress in shaping cellular metabolic profiles, remain to be determined.

## 4. Discussion

We performed a biomarker analysis based on the assumption that biomarkers reflect specific biological processes occurring at the cellular level rather than serving primarily as tools to predict outcomes. Our interpretation of the qualitative and quantitative expression patterns described throughout the study is that specific adaptive responses occur very early after the initiation of CPB, a procedure potentially leading to AKI (which occurred in one-third of the patients in our cohort), regardless of the intensity and duration of the stress (for instance, the depth and duration of the hypotension during CPB). Instead, other parameters, such as the transient lack of arterial pulse pressure or CPB-induced inflammation, could be the main contributors to stress responses (Kumar and Suneja, 2011).

Our ER stress monitoring studies converge toward the concept that adaptive cellular responses that are engaged very early after an ischemic



**Fig. 4.** Urinary sXBP1 and acute kidney injury. A. Box and whisker plots present the distribution of sXBP1/(sXBP1 + XBP1) in the urine of 42 individuals undergoing cardiac surgery before, at the end and on the day after CPB, which were compared using one-way ANOVA. B. Box and whisker plots present the distribution of the sXBP1/(sXBP1 + XBP1) variation rate according to the occurrence of AKI in the urine of 42 individuals undergoing cardiac surgery after CPB compared to baseline, which were compared using Student's *t*-test.

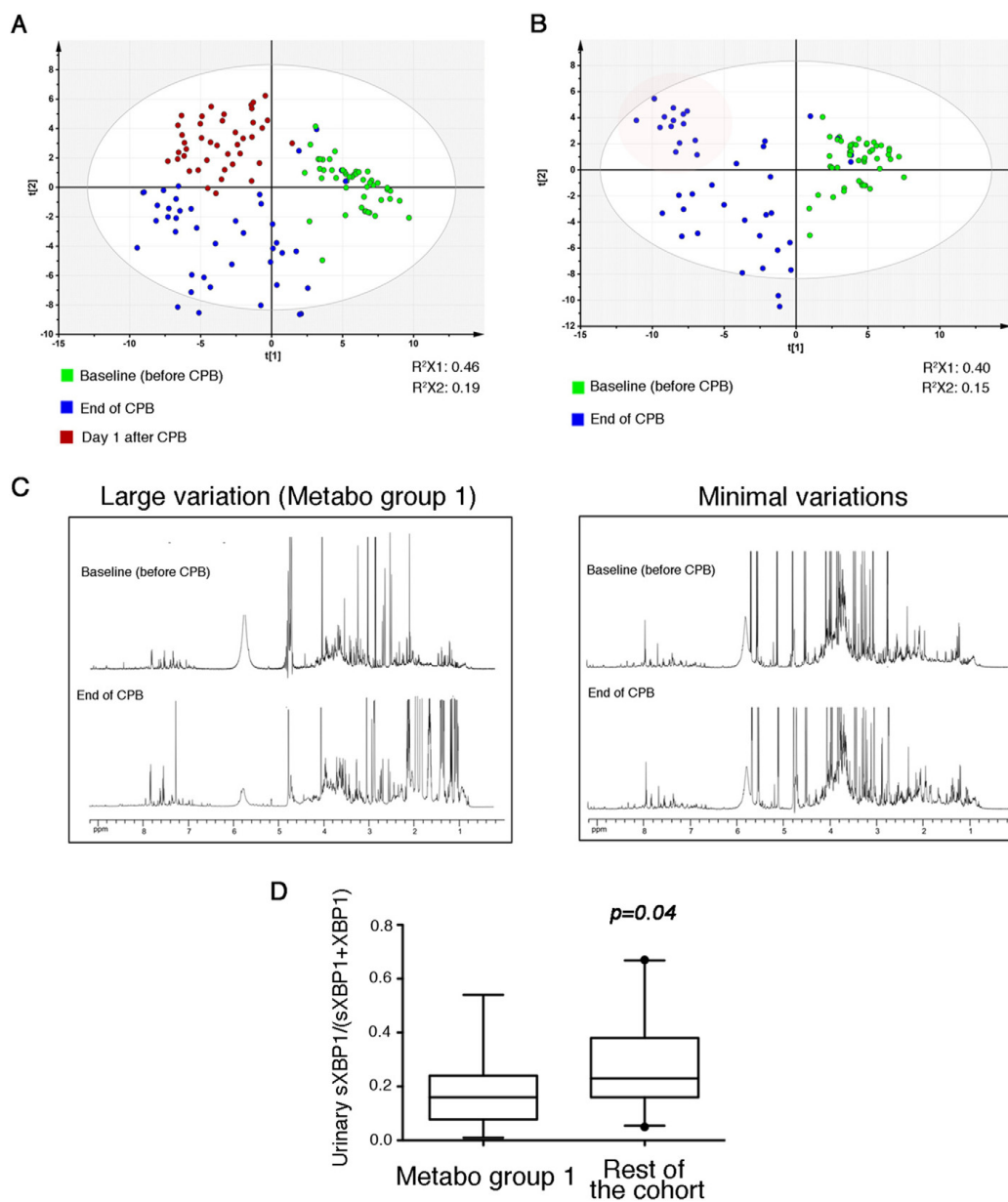
insult are required to protect against tissue damage (notably, cell death and tissue remodeling), and individuals who, for as yet unknown reasons, are not able to mount a robust adaptive response are less protected against AKI and have a worse renal prognosis. This concept is consistent with the "preconditioning" hypothesis in which repeated small insults (including those that promote ER stress (Inagi et al., 2008; Liu et al., 2016; Usuki et al., 2013)) prior to a major injury may afford protection to the target tissue, in part because adaptive responses are already engaged (Hertzberg et al., 2017; Stokfisz et al., 2017). An understanding of the ability to activate these early responses is critical to correctly identify individuals at risk, which is likely due to complex interactions between intrinsic factors (e.g., genetic and epigenetic factors), acquired structural lesions (e.g., CKD), and environmental triggers (the nature, intensity and duration of the stressor). Consistent with this hypothesis, individuals with tubular atrophy (as observed during CKD) are less responsive to acute injury because of a lack of adaptive

**Table 2**  
Performance of sXBP1 ratio and sXBP1 ratio increase rate to predict acute kidney injury.

Characteristics	Post-pre CPB sXBP1 ratio increase rate, % <sup>a</sup>
Sensitivity	100
Specificity	55
PPV	30
NPV	100

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

<sup>a</sup> post CPB sXBP1/(sXBP1 + XBP1) divided by pre CPB sXBP1/(sXBP1 + XBP1), for a cutoff value of 2.



**Fig. 5.** Impact of cardiopulmonary bypass on metabolic reprogramming and urinary metabolomic profiles. **A.** Principal component analysis (PCA) of 126 urine samples collected from 42 individuals (42 after the induction of anesthesia and before the start of cardiopulmonary bypass (CPB), 42 at the end of the CPB procedure, and 42 on the day after surgery in the intensive care unit). Each point represents a sample (210 buckets from the  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance spectrum, NMR). Green points represent urine samples at the time of anesthesia induction, blue points represent urine samples at the end of CPB, and red points indicate urine samples collected on the day after CPB. Model characteristics:  $R^2$ : 0.92;  $Q^2$ : 0.65. **B.** PCA of urine samples collected after the induction of anesthesia and at the end of CPB. Samples from 2 individual patients are highlighted in the PCA: patient A, with virtually no variation in the metabolome before and after CPB, and patient B, with a large variation in the metabolome before and after CPB. The red circle defines 13 samples with larger variations compared with the baseline. Model characteristics:  $R^2$  = 0.93,  $Q^2$  = 0.64. **C.** Representative  $^1\text{H}$  NMR spectra of urine from patients A and B before and after CPB. **D.** Box and whisker plots present the distribution of sXBP1/(sXBP1 + XBP1) ratio following CPB in the 42 individuals undergoing cardiac surgery, according to Metabo groups, which were compared using Student's t-test.

fitness due to permanent epithelial homeostatic disturbances and phenotypic changes (Chawla et al., 2014). Finally, these findings underscore the absolute need to appreciate the biological significance of biomarker monitoring and the timing of responses. The expression levels of markers of cell death, such as kidney injury molecule 1 (KIM-1), or markers of tissue remodeling, such as matrix metalloproteinase 7 (MMP7, a marker of the activation of the WNT- $\beta$  catenin pathway), are predictors of poor outcomes, including AKI (Alge and Arthur, 2015; Yang et al., 2017). The expression levels of markers of beneficial (but transient) adaptive responses, such as ER stress, are predictors of better outcomes. In line with this, the activation of other adaptive molecular pathways, such as the mammalian target of rapamycin complexes (MTOR) 1- and 2-mediated signaling pathways, are beneficial in patients with kidney injuries (Canaud et al., 2013; Godel et al., 2011; Inoki et al., 2011), although non-invasive markers of their activation still await development. The prognostic value of the markers of the ER stress response may also change with the duration of adaptive responses, which also reflect the length of the stress. Excessively prolonged ER stress responses promote cell death as a result of an imbalance in favor of proapoptotic pathways rather than antiapoptotic pathways as dynamic forces evolve over time toward the elimination of the stressed cell (Walter and Ron, 2011).

From a technological perspective, we report the first direct and non-invasive method for monitoring ER stress and the UPR. Since sXBP1 production exclusively depends on IRE1A, it is the best possible surrogate marker of ER stress. The protocol is simple, and inexpensive. More importantly, it has been exclusively performed within the Clinical Chemistry Department of the hospital, indicating that routine clinical applications are immediately feasible, provided that a molecular genetics platform is available. Considering the growing number of conditions in which ER stress is involved, including renal diseases (podocytopathies, interstitial fibrosis, nephrotoxicity, chronic proteinuria, autosomal dominant polycystic kidney disease, ischemic AKI, and kidney transplantation), our findings will undoubtedly pave the way for the implementation of translational applications.

In conclusion, this proof-of-concept study demonstrates the feasibility of the non-invasive detection of the ER stress response in urine in patients undergoing cardiac surgery under CPB and indicates that an early and robust adaptive response is critical for endogenous nephroprotection. The detection of urine sXBP1 levels is a straightforward method for monitoring renal ER stress. Larger studies will be performed to determine the clinical significance of monitoring ER stress with urinary sXBP1 levels as a proxy and will delineate the range of medical conditions that can be monitored with this detection tool.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.12.023>.

#### Funding Sources

This work was funded by grants from NP the Agence Nationale pour la Recherche et greffe ANR-16-CE14-0019-01, and l'Agence de la Biomédecine.

#### Conflicts of Interest

The authors have no conflict of interest to disclose.

#### References

- Alge, J.L., Arthur, J.M., 2015. Biomarkers of AKI: a review of mechanistic relevance and potential therapeutic implications. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10 (1), 147–155.
- Barding Jr., G.A., Salditos, R., Larive, C.K., 2012. Quantitative NMR for bioanalysis and metabolomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (4), 1165–1179.
- Beckonert, O., Keun, H.C., Ebbels, T.M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabolomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat. Protoc.* 2 (11), 2692–2703.

- Bonventre, J., Zuk, A., 2004. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int.* 66 (2), 480–485.
- Canaud, G., Bienaime, F., Viau, A., Treins, C., Baron, W., Nguyen, C., Burtin, M., Berissi, S., Giannakakis, K., Muda, A.O., Zschiedrich, S., Huber, T.B., Friedlander, G., Legendre, C., Pontoglio, M., Pende, M., Terzi, F., 2013. AKT2 is essential to maintain podocyte viability and function during chronic kidney disease. *Nat. Med.* 19 (10), 1288–1296.
- Chawla, L.S., Eggers, P.W., Star, R.A., Kimmel, P.L., 2014. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N. Engl. J. Med.* 371 (1), 58–66.
- Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M.B., Hatziaepostolou, M., Lim, E., Tam, W.L., Ni, M., Chen, Y., Mai, J., Shen, H., Hu, D.Z., Adoro, S., Hu, B., Song, M., Tan, C., Landis, M.D., Ferrari, M., Shin, S.J., Brown, M., Chang, J.C., Liu, X.S., Glimcher, L.H., 2014. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 $\alpha$  pathway. *Nature* 508 (7494), 103–107.
- Chovatiya, R., Medzhitov, R., 2014. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol. Cell* 54 (2), 281–288.
- Cubillos-Ruiz, J.R., Silberman, P.C., Rutkowski, M.R., Chopra, S., Perales-Puchalt, A., Song, M., Zhang, S., Bettigole, S.E., Gupta, D., Holcomb, K., Ellenson, L.H., Caputo, T., Lee, A.H., Conejo-Garcia, J.R., Glimcher, L.H., 2015. ER stress sensor XBP1 controls anti-tumor immunity by disrupting dendritic cell homeostasis. *Cell* 161 (7), 1527–1538.
- Duffield, J.S., 2014. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *J. Clin. Invest.* 124 (6), 2299–2306.
- El Karoui, K., Viau, A., Dellis, O., Bagattin, A., Nguyen, C., Baron, W., Burtin, M., Broueill, M., Heidt, L., Mollet, G., Druille, A., Antignac, C., Knebelmann, B., Friedlander, G., Bienaime, F., Gallazzini, M., Terzi, F., 2016. Endoplasmic reticulum stress drives proteinuria-induced kidney lesions via Lipocalin 2. *Nat. Commun.* 7, 10330.
- Ferenbach, D.A., Bonventre, J.V., 2015. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat. Rev. Nephrol.* 11 (5), 264–276.
- Gao, X.H., Krokowski, D., Guan, B.J., Bederman, I., Majumder, M., Parisien, M., Diatchenko, L., Kabil, O., Willard, B., Banerjee, R., Wang, B., Bebek, G., Evans, C.R., Fox, P.L., Gerson, S.L., Hoppel, C.L., Liu, M., Arvan, P., Hatzoglou, M., 2015. Quantitative H2S-mediated protein sulfhydrylation reveals metabolic reprogramming during the integrated stress response. *elife* 4, e10067.
- Godel, M., Hartleben, B., Herbach, N., Liu, S., Zschiedrich, S., Lu, S., Debrezeni-Mor, A., Lindenmeyer, M.T., Rastaldi, M.P., Hartleben, G., Wiech, T., Fornoni, A., Nelson, R.G., Kretzler, M., Wanke, R., Pavenstadt, H., Kerjaschki, D., Cohen, C.D., Hall, M.N., Ruegg, M.A., Inoki, K., Walz, G., Huber, T.B., 2011. Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. *J. Clin. Invest.* 121 (6), 2197–2209.
- Hertzberg, D., Ryden, L., Pickering, J.W., Sartipy, U., Holzmänn, M.J., 2017. Acute kidney injury—an overview of diagnostic methods and clinical management. *Clin. Kidney J.* 10 (3), 323–331.
- Hetz, C., Glimcher, L.H., 2009. Fine-tuning of the unfolded protein response: assembling the IRE1 $\alpha$  interactome. *Mol. Cell* 35 (5), 551–561.
- Inagi, R., Kumagai, T., Nishi, H., Kawakami, T., Miyata, T., Fujita, T., Nangaku, M., 2008. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates mesangiolipofuscin glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19 (5), 915–922.
- Inagi, R., Ishimoto, Y., Nangaku, M., 2014. Proteostasis in endoplasmic reticulum—new mechanisms in kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 10 (7), 369–378.
- Inoki, K., Mori, H., Wang, J., Suzuki, T., Hong, S., Yoshida, S., Blattner, S.M., Ikenoue, T., Ruegg, M.A., Hall, M.N., Kwiatkowski, D.J., Rastaldi, M.P., Huber, T.B., Kretzler, M., Holzman, L.B., Wiggins, R.C., Guan, K.L., 2011. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J. Clin. Invest.* 121 (6), 2181–2196.
- Kotas, M.E., Medzhitov, R., 2015. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell* 160 (5), 816–827.
- Kumar, A.B., Suneja, M., 2011. Cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury. *Anesthesiology* 114 (4), 964–970.
- Lindon, J.C., Nicholson, J.K., 2008. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabolomics and metabolomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto, Calif)* 1, 45–69.
- Liu, D., Liu, X., Zhou, T., Yao, W., Zhao, J., Zheng, Z., Jiang, W., Wang, F., Aikhionbare, F.O., Hill, D.L., Emmett, N., Guo, Z., Wang, D., Yao, X., Chen, Y., 2016. IRE1-RACK1 axis orchestrates ER stress preconditioning-elicited cytoprotection from ischemia/reperfusion injury in liver. *J. Mol. Cell Biol.* 8 (2), 144–156.
- Mami, I., Bouvier, N., El Karoui, K., Gallazzini, M., Rabant, M., Laurent-Puig, P., Li, S., Tharaux, P.L., Beaune, P., Thervet, E., Chevet, E., Hu, G.F., Pallet, N., 2016a. Angiogenin mediates cell-autonomous translational control under endoplasmic reticulum stress and attenuates kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27 (3), 863–876.
- Mami, I., Tavernier, Q., Bouvier, N., Aboukamis, R., Desbuissons, G., Rabant, M., Poindessous, V., Laurent-Puig, P., Beaune, P., Tharaux, P.L., Thervet, E., Chevet, E., Anglicheau, D., Pallet, N., 2016b. A novel extrinsic pathway for the unfolded protein response in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27 (9), 2670–2683.
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., Ron, D., 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 18 (24), 3066–3077.
- Martinon, F., Chen, X., Lee, A.H., Glimcher, L.H., 2010. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat. Immunol.* 11 (5), 411–418.
- Stokfisz, K., Ledakowicz-Polak, A., Zagorski, M., Zielinska, M., 2017. Ischaemic preconditioning—current knowledge and potential future applications after 30 years of experience. *Adv. Med. Sci.* 62 (2), 307–316.
- Tavernier, Q., Mami, I., Rabant, M., Karras, A., Laurent-Puig, P., Chevet, E., Thervet, E., Anglicheau, D., Pallet, N., 2017. Urinary angiogenin reflects the magnitude of kidney injury at the infrahistologic level. *J. Am. Soc. Nephrol.* 28 (2), 678–690.

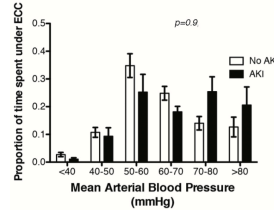


- Usuki, F., Fujimura, M., Yamashita, A., 2013. Endoplasmic reticulum stress preconditioning attenuates methylmercury-induced cellular damage by inducing favorable stress responses. *Sci. Rep.* 3 (2346).
- Walter, P., Ron, D., 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334 (6059), 1081–1086.
- Wang, M., Kaufman, R.J., 2016. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 529 (7586), 326–335.
- Wellen, K.E., Thompson, C.B., 2010. Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Mol. Cell* 40 (2), 323–332.
- Wu, R., Zhang, Q.H., Lu, Y.J., Ren, K., Yi, G.H., 2015. Involvement of the IRE1 $\alpha$ -XBP1 pathway and XBP1s-dependent transcriptional reprogramming in metabolic diseases. *DNA Cell Biol.* 34 (1), 6–18.
- Yang, X., Chen, C., Teng, S., Fu, X., Zha, Y., Liu, H., Wang, L., Tian, J., Zhang, X., Liu, Y., Nie, J., Hou, F.F., 2017. Urinary matrix metalloproteinase-7 predicts severe AKI and poor outcomes after cardiac surgery. *J. Am. Soc. Nephrol.* 28 (11), 3373–3382.
- Zhang, A., Sun, H., Wang, X., 2012. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: a systematic review. *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (4), 1239–1245.
- Zuk, A., Bonventre, J.V., 2016. Acute kidney injury. *Annu. Rev. Med.* 67, 293–307.

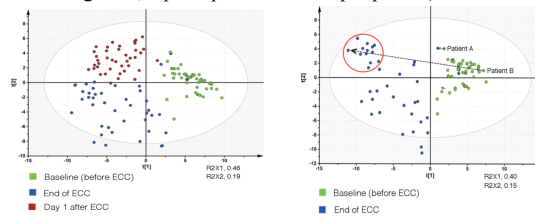
## Agression rénale aiguë pendant la circulation extracorporelle

B.Fohlen (1), T.M.Huynh (1), C.Latremouille (2), N.Pallet (3), B.Cholley (1)  
(1) Anesthésie réanimation, HEGP, (2) Chirurgie cardiovasculaire, HEGP, (3) Biochimie, HEGP (Paris)

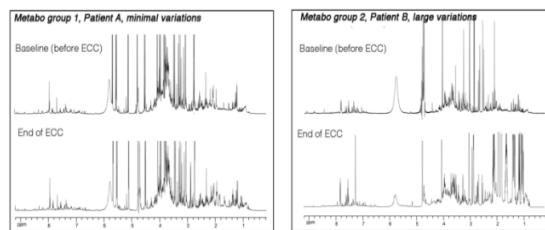
- **Objectifs:** Rechercher une association entre ARA post opératoire et le niveau de PAM per CEC  
Caractériser les variations du métabolome urinaire des patients développant une ARA.
- **Matériel et méthodes :**
  - Critère d'inclusion: Patients opérés d'une chirurgie cardiaque programmée sous CEC.
  - Critères de non inclusion:
    - DFG < 30 ml/ min,
    - Injection de produit de contraste iodé dans les 24 heures précédant la chirurgie,
    - FEVG pré opératoire < 40%.
  - Recueil de 3 échantillons urinaires par patient : Pré CEC, post CEC, à J1
  - Le métabolome de chaque échantillon a été analysé par spectrométrie avec résonance magnétique nucléaire basée sur les protons.
- **Résultats :**
  - 42 patients inclus, **28% d'ARA** selon les critères KDIGO, 7% dialysés (n = 3)
  - Euroscore 2= 3,2±0,8 dans le groupe ARA vs 2,5±0,5 sans ARA (p = 0,47)
  - Pas de différence entre les groupes concernant la durée et la sévérité des épisodes d'hypotension per CEC.



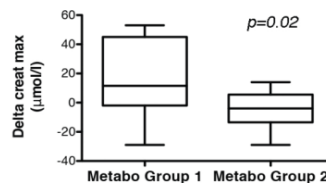
- Evolution du métabolome au cours de la CEC :
  - Le métabolome urinaire des patients évoluait au fil du temps (analyse par composante principale des spectres enregistrés, 1 point par échantillon par patient)



- Nous avons constitué 2 groupes au sein de la cohorte en fonction des variations du métabolome entre le début et la fin de la CEC.



- **Les patients qui modifiaient peu leur métabolome urinaire au cours de la CEC développaient une ARA (46% vs 10%, p = 0,02), indépendamment des autres facteurs.**



- Les patients n'ayant pas eu de réponse adaptative cellulaire sont donc ceux qui ont présenté une ARA post opératoire

**Conclusion :** Le développement d'une ARA postopératoire n'était pas associé à la sévérité ni à la durée de l'hypotension per CEC. L'analyse métabolomique urinaire montre une absence de réponse adaptative rénale chez les patients ayant une ARA postopératoire.



Caractéristiques métabolomiques et expression des biomarqueurs urinaires des patients développant une insuffisance rénale aiguë post circulation extracorporelle

Résumé (français) :

**Objectif:** L'agression rénale aiguë (ARA) est une complication majeure après une chirurgie cardiaque sous circulation extra corporelle (CEC). Les biomarqueurs prédictifs d'ARA ne semblent pas spécifiques après une CEC. L'analyse de la variation du métabolome urinaire pourrait ainsi être une approche diagnostique d'ARA. L'objectif principal de cette étude est de caractériser les variations du métabolome urinaire pendant la CEC. Les objectifs secondaires sont l'évaluation des facteurs de risques d'ARA post CEC et l'évaluation de l'angiogénine urinaire et du NGAL urinaire comme biomarqueurs d'ARA post CEC.

**Matériel et méthodes:** Tous les patients programmés opérés d'une chirurgie cardiaque sous CEC entre le 17/02/17 et le 26/04/17 ont été inclus. Le principal critère de non inclusion était un débit de filtration glomérulaire préopératoire inférieur à 30ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Un échantillon urinaire était prélevé en pré, post CEC et à J1. L'ARA était déterminée selon la classification KDIGO. Le métabolome urinaire était analysé par spectrométrie par résonnance magnétique. NGAL et l'angiogénine urinaire (ANGu) étaient dosés par méthode ELISA.

**Résultats:** 42 patients ont été inclus, 28% ont développé une ARA. Les facteurs de risque traditionnels d'ARA post CEC n'ont pas été retrouvés. Les patients qui modifiaient leur métabolome développaient une ARA (46% vs 10%, p = 0.02). Le NGAL urinaire ne variait pas au cours de la CEC. L'ANGu variait durant la CEC (p=0.001).

**Conclusion:** Les patients développant une ARA post CEC ont une variation moindre du métabolome urinaire. Le NGAL urinaire ne variait pas durant la CEC. Nous n'avons pas retrouvé les facteurs de risque habituels d'ARA.

**Mots clés (français) :** Agression rénale aiguë, circulation extra corporelle, biomarqueurs, hémodynamique, pression artérielle moyenne, métabolome urinaire.

**Titre en anglais :** Metabolomic characteristics and expression of urinary biomarkers in patients developing acute kidney injury after cardiopulmonary bypass

Abstract (english) :

**Objective:** Acute kidney injury (AKI) is a major complication after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CBP). Predictive biomarkers of AKI do not appear specific after CBP. An Analysis of the variation of urinary metabolomics changes could thus be a rapid diagnostic approach to AKI. The objective is to analyze urinary metabolomics variation and urinary biomarkers variations of patients developing AKI after CBP and to verify the risk factors for AKI.

**Material and methods:** All scheduled patients undergoing cardiac surgery under CBP between 17/02/17 and 26/04/17 were included. The main exclusion criterion was a preoperative glomerular filtration rate of less than 30ml / min / 1.73m<sup>2</sup>. Urinary samples were taken before, after and 1 day after CBP. AKI was determined according to the KDIGO classification. The urinary metabolites changes were analyzed by magnetic resonance spectrometry. Urinary NGAL and angiogenin were assayed by ELISA test.

**Results:** 42 patients were included, 28% developed an AKI. Traditional post-CBP AKI risk factors, including the level of MAP per CBP, were not found. Patients who modified their urine metabolites during CBP developed AKI (46% of AKI in patients not modifying their urinary metabolites compared to 10% in the rest of the cohort, p = 0.02). Urinary NGAL did not vary during the CBP (p=0.6). Urinary angiogenin did vary during the CBP (p=0.001).

**Conclusions :** A change in urinary metabolomics, indicating renal adaptation, characterized patients whose renal function did not deteriorate after CBP. Neither the per-CBP MAP level nor the NGAL post CBP values were associated with the occurrence of an AKI.

**Keywords (english) :** Acute kidney injury, cardiopulmonary bypass, biomarkers, hemodynamics, mean arterial pressure, urinary metabolomics.

Université Paris Descartes  
Faculté de Médecine Paris Descartes  
15, rue de l'Ecole de Médecine  
75270 Paris cedex 06

