

# Abréviations :

**aa** : Acides aminés.

**AAT1** : Alpha-1-antitrypsine.

**AGAT** : Arginine glycine amidinotransférase.

**ARN(m)** : Acide ribonucléique (messenger).

**A1M** :  $\alpha$ -1-microglobuline.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ADH** : Antidiurétique hormone (Hormone anti-diurétique).

**AINS** : Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

**AKIN** : "Acute kidney injury network".

**AMPK** : AMP-activated protein kinase.

**ANCA** : Antineutrophil cytoplasmic antibodies.

**APAF** : Apoptotic protease-activating factor .

**ATM** : Ataxia telangiectasia mutated protein.

**ATP** : Adénosine triphosphate.

**AUC/AUROC** : Area under the ROC curve (Aire sous la courbe sous entendue courbe ROC).

**BAK** : BCL2 homologous antagonist/killer.

**BAX** : BCL2 associated X apoptosis regulator.

**BCL2** : Apoptosis regulator B-cell lymphoma 2.

**BNIP3** : BCL2 interacting protein 3.

**B2M** :  $\beta$ -2-microglobuline.

**CAKUT** : Congénital anomalies of kidney and urinary tract (Anomalies congénitales des reins ou des voies urinaires).

**CBP** : Cardiopulmonary bypass (= CEC).

**CDH16** : Cadhérine 16.

**CDK** : Cyclin-dependent kinases.

**CEC** : Circulation extracorporelle (= CBP).

**CE-MS** : Capillary electrophoresis and mass-spectrometry (Electrophorèse capillaire suivi de spectrométrie de masse).

**CKD-epi** : "Chronic kidney disease – Epidemiology collaboration".

**CGR** : Concentrés de globules rouges.

**CIVD** : Coagulation intra-vasculaire disséminée.

**CPIA** : Contre-pulsion intra-aortique.

**DAMPS** : Damage associated molecular patterns.

**DFG(e)** : Débit de filtration glomérulaire (estimé).

**DKK3** : Dickkopf-related protein 3.

**DRP1** : Dynamin 1 related protein.

**EER** : Epuration extra-rénale (= RRT).

**EGF** : Epidermal growth factor.

**FAD** : Flavine adénine dinucléotide.

**GAMD** : Guanidinoacetate N-methyltransferase.

**GSDMD** : Gasdermin D.

**GSK3 $\beta$**  : Glycogen synthase kinase 3  $\beta$ .

**HIF1 $\alpha$ /1 $\beta$**  : Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  / 1 $\beta$ .

**HNF1 $\beta$ /1 $\alpha$ /4 $\alpha$**  : Hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$ /1 $\alpha$ /4 $\alpha$ .

**HR** : Hazard ratio.

**HRE** : Hypoxia response element.

**HSP** : Heat shock protein.

**HTA** : Hypertension artérielle.

**H<sub>1</sub>-RMN** : Résonance magnétique nucléaire du proton (Spectrométrie).

**iCRE** : Cre recombinase inducible.

**ICU** : Intensive care unit (= USI).

**IEC** : Inhibiteurs de l'enzyme de conversion.

**IGFBP7** : Insulin-like growth factor binding protein 7.

**IL18** : Interleukine 18.

**iPSC** : Induced pluripotent stem cells.

**IRA** : Insuffisance rénale aiguë (Acute kidney injury : AKI).

**IRI** : Ischemia reperfusion injury (Ischémie reperfusion).

**KAP2** : Kidney androgen protein 2.

**kDa** : kilodaltons

**KDIGO** : "Kidney disease improving global outcomes".

**KIF12** : Kinesin family member 12.

**KIM1** : Kidney injury molecule 1.

**LAP** : Latency-associated peptide.

**L-FABP** : Liver fatty acid binding protein.

**LPS** : Lipopolysaccharide.

**LTBP** : Latent TGF $\beta$  binding protein.

**MAT** : Microangiopathie thrombotique.

**MCP1** : Monocyte chemotactic protein 1 (= CCL2).

**MDRD** : "Modification of diet in renal disease".

**MFN** : Mitofusin.

**MLKL** : Mixed lineage kinase domain-like protein.

**MOMP** : Mitochondrial outer membrane permeabilization.

**MRC** : Maladie Rénale Chronique.

**Myo** : Myoglobine.

**NAD** : Nicotinamide adénine dinucléotide.

**NAG** : N-acetyl-b-D-glucosaminidase.

**NAM** : Nicotinamide.

**NGAL** : Neutrophil gelatinase-associated lipocalin.

**NK** : Lymphocytes natural killer.

**NLR** : Nod-like receptor.

**NO** : Monoxyde d'azote.

**NTIA** : Néphropathie tubule-interstitielle aiguë.

**NYHA** : "New-York Heart Association".

**OPA1** : Optic atrophy mitochondrial dynamin like GTPase.

**OR** : Odds-ratio (rapport des cotes).

**O<sub>2</sub>** : Dioxygène.

**PAMPS** : Pathogen Associated Molecular Patterns.

**PGC-1 $\alpha$**  : PPAR Gamma coactivator 1  $\alpha$ .

**PHD** : Prolyl hydroxylases.

**PINK** : PTEN-induced kinase 1.

**PNN** : Polynucléaire neutrophile.

**P2X1R** : Purinergic receptor P2X 1.

**QPRT** : Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase.

**RBP** : Retinol binding protein.

**RF** : Random forest.

**RFE** : Recursive feature elimination.

**RIFLE** : Risk, injury, failure, loss of kidney function and end-stage kidney disease classification.

**RIPK 1/3** : Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3.

**ROC** : Courbe ROC (Receiver operating characteristic curve).

**ROS** : Reactive Oxygen Species (Espèces reactive dérivées de l'oxygène).

**RRT** : Renal replacement therapy ( = EER).

**SLC** : Solute carrier.

**SOCS3** : Suppressor of cytokine signaling.

**SRAA** : Système rénine-angiotensine-aldostérone.

**SVM** : Support vector machine.

**TbRI/II** : TGF $\beta$  receptor I/II.

**TGF $\beta$**  : Transforming growth factor  $\beta$ .

**TIMP2** : Tissue inhibitor of metalloproteinases 2.

**TLR** : Toll like receptor.

**TNF $\alpha$**  : Tumor necrosis factor  $\alpha$ .

**TRAIL** : Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand.

**ULK** : Unc51-like autophagy activating kinase 1.

**USI** : Unité de soins intensifs (=ICU).

**VHL** : Von Hippel Lindau tumor suppressor.

**WT/Wt** : Wild-Type (sauvage).

# Table des matières

Remerciements .....	p. 13
Introduction .....	p.15
1. Généralités .....	p.15
A. Définition de l'insuffisance rénale aiguë (IRA) .....	p.15
B. Epidémiologie et étiologies .....	p.17
C. Evolution et importance clinique .....	p.19
2. Physiopathologie .....	p.22
A. Description physiopathologique schématique .....	p.23
A.1. Mécanismes lésionnels de l'agression rénale aiguë .....	p.24
A.2. Réponse tissulaire rénale à l'agression, de l'adaptation à la lésion .....	p. 32
A.3. Apparition d'une altération fonctionnelle .....	p.43
A.4. La réparation, séquelles et transition IRA-MRC .....	p.47
B. Régulation de l'adaptation à l'agression et de la réparation : un rôle pour HNF-1 $\beta$ ? .....	p.50
B.1. Description générale .....	p.50
B.2. Maladie liée aux anomalies du gène HNF1B .....	p.52
B.3. Rôles rénaux d'HNF-1 $\beta$ et la piste métabolique .....	p.56
3. Diagnostic et prédiction de l'IRA .....	p.58
A. Avantages et limites des critères diagnostiques actuels .....	p.58
B. Nouvelles approches d'optimisation du diagnostic de l'IRA .....	p.65
B.1. Les nouveaux marqueurs d'IRA .....	p.66
B.2. Les outils d'optimisation de la mise en œuvre des critères diagnostiques .....	p.80
B.3. Enjeux actuels et futurs de la recherche pour le diagnostic de l'IRA .....	p.82
C. Prédire l'IRA .....	p.83
C.1. Identification des facteurs de risque .....	p.84
C.2. Création de scores cliniques ou clinico-biologiques sur les données de routine .....	p.85
C.3. Identification des marqueurs prédictifs spécifiques et éventuelle combinaison aux scores .....	p.89

C.4. Prédiction automatisée et alertes .....	p.90
C.5. Enjeux actuels et futurs de la recherche pour la prédiction de l'IRA .	p.91
4. Conclusion .....	p.92
 Travaux de thèse .....	p.93
Axe 1 : Rôle du facteur de transcription HNF-1 $\beta$ dans les cellules épithéliales tubulaires proximales sur l'orientation du métabolisme en conditions basales et après agression .....	p.94
Axe 2 : Anomalies de la biosynthèse du NAD et efficacité d'une supplémentation alternative .....	p.147
Axe 3 : Utilisation des « Omics » dans le diagnostic précoce de l'IRA post-chirurgie cardiaque avec CEC .....	p.170
 Conclusion générale .....	p.218
 Références .....	p.219



# Références des illustrations

Figure 1 : Incidence et proportion de l'IRA chez les patients hospitalisés par régions à travers le monde	p.17
Figure 2 : Etiologies des IRA	p.19
Figure 3 : Représentation schématique de la cascade physiopathologique de l'IRA	p. 24
Figure 4 : Représentation schématique des mécanismes lésionnels initiaux et secondaires	p.25
Figure 5 : Représentation schématique de la réponse tissulaire à l'agression	p.33
Figure 6 : Stress et réponse métabolique épithéliale à la phase aiguë de l'agression comme un régulateur du comportement épithélial	p.34
Figure 7 : Représentation schématique des différentes voies du métabolisme bioénergétique cellulaire (eucaryote)	p.35
Figure 8 : Représentation schématique du cycle cellulaire et de ses régulateurs	p.39
Figure 9 : Représentation schématique des déterminant de l'altération fonctionnelle observable à l'occasion d'une IRA	p.44
Figure 10 : IRA et réserve fonctionnelle rénale	p.47
Figure 11 : Représentation schématique des mécanismes de régulation d'un gène cible par HNF-1 $\beta$ : extrapolation à partir de l'exemple <i>Pkhd1</i>	p.51
Figure 12 : « Bookmarking » et régulation des cibles d'HNF-1 $\beta$	p.52
Figure 13 : Représentation schématique des atteintes rénales et extra-rénales observées chez les patients porteurs d'une anomalie du gène <i>HNF1b</i>	p.53
Figure 14 : Evolution de la fonction rénale en fonction du temps chez des patients adultes porteurs d'une anomalie du gène <i>HNF1b</i>	p.54
Figure 15 : Représentation schématique du métabolisme de la créatinine	p.60
Figure 16 : Echec de la validation du KO tubulaire proximal d' <i>Hnf1b</i> dans la lignée murine KZH	p. 135
Figure 17 : Validation des anomalies métaboliques majeures dans la lignée HK2 <i>HNF1B</i> <sup>-/-</sup>	p. 137
Figure 18 : Réexpression de la protéine HNF-1 $\beta$ dans les cellules MCT et HK2 <i>HNF1b</i> <sup>-/-</sup>	p.138
Figure 19 : Phénotype pro-inflammatoire des cellules <i>Hnf1b</i> <sup>-/-</sup> comparées aux Wt : Focus sur la chimiokine Ccl7	p.141
Figure 20 : Vision schématique des voies de biosynthèse du NAD	p. 148
Figure 21 : Anomalies du tryptophane, du nicotinamide et du nicotinamide adénine dinucléotide dans les cellules MCT <i>Hnf1b</i> <sup>-/-</sup> en conditions basales et d'agression	p.167

Figure 22 : Différences d'expression relatives induites par l'inactivation d'Hnf1b des gènes codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse du NAD dans les cellules mIMCD3 en conditions basales ....	p. 169
Figure 23 : Signatures peptidiques réduites (a) et leurs performances dans la cohorte de validation (b) .....	p.209
Figure 24 : Anomalies métabolomiques urinaires associées à la survenue d'une IRA .....	p.211
Figure 25 : Utilisation de la peptidomique urinaire préopératoire pour la prédiction de la survenue d'une IRA post chirurgie cardiaque .....	p.216
Tableau 1 : Stade de l'IRA selon les critères KDIGO (KDIGO AKI Guidelines 2012) .....	p.16
Tableaux 2-3 : Tableau de synthèse des principaux nouveaux biomarqueurs de l'IRA .....	p. 67
Tableaux 4-5 : Tableaux de synthèse des scores prédictifs de la survenue d'une IRA après chirurgie cardiaque .....	p.87-88
Annexe 1 : Lignées cellulaires utilisées .....	P.143
Annexe 2 : Principes théoriques et pratiques de la H1-RMN spectrométrie .....	P.145

# Remerciements

- A Stan : Merci pour ta confiance. Merci également ton encadrement bienveillant qui a su me canaliser (pas facile souvent...) et orienter ce projet, tout en me laissant une grande liberté sur la gestion des expérimentations et en respectant mes choix de formation improbables (R, data mining, machine learning...). En espérant continuer à mériter ta confiance dans les années à venir.
- A Audrey : Merci déjà de m'avoir pris sous ton aile à mon arrivée au laboratoire en M2 et de m'avoir formé avec gentillesse et rigueur (venant de médecine on parlait de loin...). Je te dois probablement l'ensemble de ce que je sais faire aujourd'hui à la paillasse... Merci d'avoir ensuite supporté avec une grande patience et répondu à mes incessantes questions méthodologiques, d'analyses et parfois même métaphysico-biostatistiques. Enfin, merci pour ton aide précieuse dans la réalisation pratique des expérimentations sur les différents projets et de m'avoir suppléé pendant mes absences. (C'était parfait !)
- A Joost et Julie K. : Merci pour votre encadrement bienveillant, votre soutien, vos conseils et le partage de votre expertise. Votre aide a été précieuse tout au long de ces quatre années et j'espère pouvoir vous aider en retour dans les années à venir.
- A Béné, Didi et Colette : Merci pour vos conseils et questionnements tout au long de mon M2 et ma thèse, qui m'ont poussé sans cesse à la réflexion et à la remise en question, tant pour améliorer le raisonnement, les expérimentations menées ou leur présentation.
- A Julie B. : Merci pour ton aide, ta gentillesse et ta disponibilité durant ces trois années. En espérant pouvoir continuer à collaborer avec toi sur des projets fondamentaux et cliniques.
- Au Pr Dominique Chauveau : Merci pour m'avoir encouragé à entreprendre ce cursus de recherche et de m'avoir soutenu durant la réalisation de celui-ci.
- Au Pr Nassim Kamar : Merci pour m'avoir encouragé dans ce projet et d'avoir autorisé les aménagements pour le rendre possible et le poursuivre. Je vais faire le nécessaire pour être digne de ces marques de confiance.
- A David et Agnès Ribes : Merci pour votre soutien durant ce projet et les exsanguinations régulières.
- Au Pr Stéphane Decramer : Merci pour votre aide sur le projet HNF1b.
- A Ben : Merci pour ton implication notamment dans les projets « Omics » (ces milliers d'échantillons extraits et passés en CE-MS) et tes talents en support informatique. Merci également pour ta bonne humeur et ton humour qui participe grandement à la bonne ambiance du labo.
- A Mélinda : Merci pour ta rigueur et ton aide pratique précieuse (expérimentations animales et surtout les passionnant milliers d'aliquotages/dosages/extractions réalisés au pas de course). Merci

également pour nos discussions et ta bonne humeur communicative qui ont rendu plaisantes ces longues heures de manips.

- Guylène et Marie : Merci pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre patience au quotidien ; Merci également vos conseils experts et votre implication dans la mise au point et la réalisation des expérimentations notamment sur les divers modèles animaux.
- A Ophélie : Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Et surtout merci pour cette merveilleuse recette de gâteau que je dois toujours faire et dont je ne comprends un mot sur deux au maximum.
- A Adeline : Merci pour ta participation aux projets « Omics » notamment toutes ces extractions et échantillons analysés en CE-MS.
- A Éric : Merci pour ton aide précieuse dans la mise au point et la réalisation des expérimentations notamment de biologie moléculaire autour du projet HNF-1b.
- A Eloïse : Merci pour ton soutien psychologique, ta gentillesse et ton énergie contagieuse qui m'ont bien aidé à tenir durant ces quatre années.
- A Franck : Merci pour ton aide et tes conseils précieux lors de mes premières années d'utilisation de R, qui ont très probablement évité la déféstration de plusieurs ordinateurs. Merci également pour nos débats animés qui furent enrichissants même si aucun de nous deux ne se serait jamais laissé convaincre.
- A mes co-thésards (Ana, Camille, Lucille, Valérie, Snigdha) : Merci pour m'avoir supporté durant ces trois années et pour votre soutien dans les moments difficiles.
- A Clément et Sofiane : Merci pour votre soutien durant cette année passée ensemble exilés en recherche fondamentale.
- Aux divers collaborateurs des projets (Stéphane Balayssac, Stéphane Gazut, Amal Akkari, Alexandre Lucas, Elodie Riant, Frédéric Martins, Emeline Lhuillier, Justyna Siwy, Jason Iacovoni) : Merci pour votre aide et votre participation aux différents projets.
- A Hamid : Merci pour ton enseignement durant toutes ces années qui, au-delà de la pratique des Arts-martiaux, m'a inculqué la rigueur, l'exigence envers soi-même et le sens du travail. Valeurs qui sont pour beaucoup dans ma présence ici aujourd'hui.
- A ma famille : Merci pour votre présence et votre soutien durant toutes ces années de travail. Vous savez à quel point vous avez été essentiels pour l'aboutissement de ce projet et c'est un peu le vôtre aussi.

# Introduction :

## 1. Généralités :

- L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est définie actuellement selon les critères AKI KDIGO, comme une altération aiguë de la fonction de filtration rénale sur la base d'une élévation de la créatininémie ( $26.5 \mu\text{mol/L}$  ou 1.5 fois sa valeur de base) ou d'une réduction de la diurèse ( $< 0.5 \text{ mL/kg/h}$  pendant 6 heures).
- Ce syndrome est fréquent (15-30 % des patients hospitalisés) malgré des disparités géographiques.
- Ce syndrome regroupe en réalité un ensemble de situations extrêmement hétérogènes par leurs causes, leurs sévérités ou leurs évolutions sans en permettre la distinction.
- L'IRA est un syndrome grave responsable d'une importante morbi-mortalité à court et long termes en faisant un véritable problème de santé publique.

### A. Définition de l'insuffisance rénale aiguë (IRA) :

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) ou Acute Kidney Injury (AKI) dans sa dénomination anglaise, correspond à un concept nosologique regroupant l'ensemble des situations induisant une souffrance tissulaire significative au sein de cet organe sur une période réduite ( $< 7$  jours).

Malgré une définition théorique simple, trouver une définition clinique claire à ce syndrome s'avère complexe, l'évaluation de la souffrance tissulaire rénale pouvant reposer sur des marqueurs très divers et la frontière entre l'adaptation physiologique à un stress et les situations pathologiques étant difficile à définir <sup>1</sup>.

Avant 2004, si l'utilisation de critères diagnostiques basés sur la diurèse et des marqueurs plasmatiques de la fonction de filtration rénale était habituelle, aucune définition consensuelle n'était disponible, avec des variations importantes entre les centres, les pays et les études <sup>2,3</sup>. Un travail de standardisation au niveau international a été conduit au cours des deux dernières décennies afin de définir des critères diagnostiques cliniques et biologiques consensuels permettant d'harmoniser les pratiques et faciliter les activités de recherche. L'objectif était d'identifier des critères simples, compatibles avec la pratique courante (disponibles en routine, rapides et peu coûteux), permettant d'identifier de manière sensible et spécifique, une souffrance tissulaire rénale significative (associée à des conséquences pertinentes péjoratives à court et long termes) et d'en évaluer la gravité afin d'adapter la prise en charge <sup>1</sup>. Ainsi plusieurs définitions se sont succédées (RIFLE <sup>3</sup>, AKIN <sup>4</sup>) ces dernières années pour aboutir à la classification actuelle issue des recommandations AKI KDIGO de 2012 <sup>1</sup>. Cette définition n'est pour autant pas figée et est amenée à évoluer selon la progression de nos connaissances et des moyens technologiques à notre disposition.

A l'heure actuelle, l'IRA est consensuellement définie sur les bases de marqueurs fonctionnels se voulant un bon reflet de la fonction de filtration rénale (**Tableau 1**). Ainsi le diagnostic d'IRA peut être porté en présence d'au moins l'un de ces quatre critères :

- Augmentation de la créatinine sérique de plus de 26.5  $\mu\text{M}$  ou 0.3 mg/dL en moins de 48 heures ;
- Augmentation de la créatinine sérique à plus de 1.5 fois la valeur basale observée s'étant produite durant les 7 jours précédent ou présumée telle ;
- Réduction de la diurèse horaire ( $< 0.5 \text{ mL/kg/h}$ ) sur une durée minimale de 6 heures ;
- Nécessité de recours à l'épuration extra-rénale.

Ces recommandations fournissent également une stadification en fonction de sa sévérité basée sur :

- L'ampleur de l'élévation de la créatininémie par rapport à son niveau initial.
- L'intensité et la durée de la réduction de diurèse horaire.
- La nécessité de recours à l'épuration extra-rénale.

Stage	Serum Creatinine	Urine Output	RRT
0	SCr $< 1.5$ times baseline And SCr increase $< 26.5 \mu\text{M}$ (0.3 mg/dL)	$\geq 0.5 \text{ mL/kg/h}$	No
1	SCr 1.5-1.9 times baseline or SCr increase $\geq 26.5 \mu\text{M}$ (0.3 mg/dL)	$< 0.5 \text{ mL/kg/h}$ for at least 6 hours	No
2	SCr 2-2.9 times baseline	$< 0.5 \text{ mL/kg/h}$ for at least 12 hours	No
3	SCr 3 times baseline or SCr increase $\geq 353.6 \mu\text{mol/L}$ (4 mg/dL) or eGFR $< 35 \text{ mL/min per } 1.73 \text{ m}^2$ and $< 18$ year-old.	$< 0.3 \text{ mL/kg/h}$ for at least 24 hours Or Anuria for at least 12 hours	Yes

**Tableau 1 : Stade de l'IRA selon les critères KDIGO (KDIGO AKI Guidelines 2012).** Scr : Serum creatinine ; RRT : Renal replacement therapy (Epuration extra-rénale).

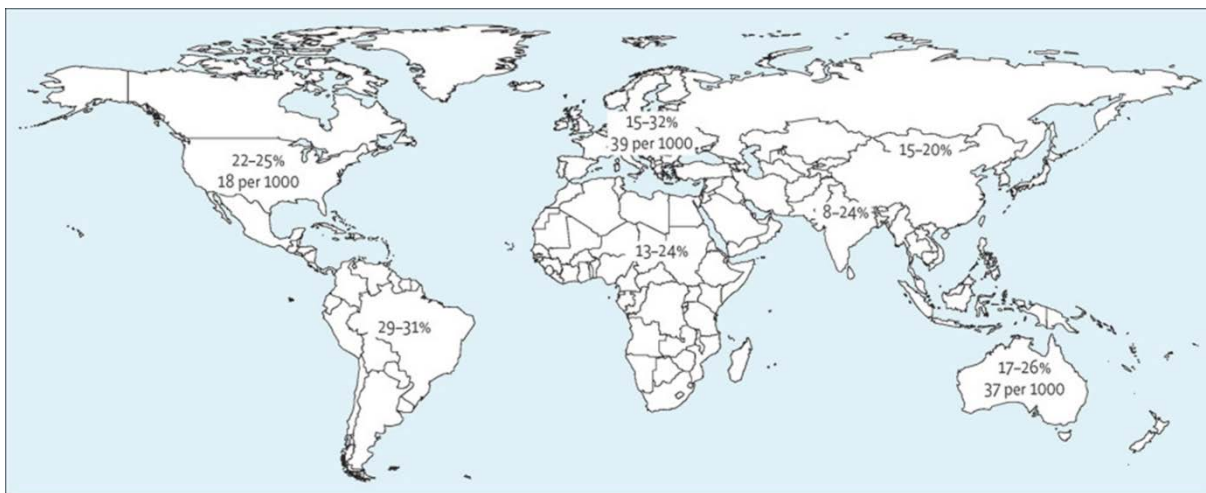
Comme nous le verrons plus tard cette classification bien que pratique et consensuelle, présente de nombreuses limites qui réduisent notre capacité à appréhender correctement l'IRA en clinique (diagnostic retardé de 24-48h par rapport à l'altération de la filtration, prise en compte seulement de l'altération de la filtration sans tenir compte des lésions, pas de distinction en fonction de la cause...).

## B. Epidémiologie et étiologies :

L'IRA est un syndrome fréquent et en augmentation constante avec une incidence, paradoxalement assez compliquée à évaluer, entre 2 et 15 pour 1000 habitants dans les pays développés suivant les études <sup>5-9</sup>.

Elle touche plus fréquemment certaines populations. Par exemple, elle est décrite comme touchant de 15-30% des patients hospitalisés <sup>8-13</sup>. De même son incidence augmente avec l'âge et les comorbidités jusqu'à atteindre 50 pour 1000 habitant après 65 ans dans certains registres <sup>6,9</sup>.

Bien que présente dans l'ensemble des régions du monde, il existe de grandes disparités géographiques en termes de recensement, d'incidence, d'étiologies, de contexte et de pronostic avec un clivage particulier entre les pays développés et les pays en voie de développement <sup>10,12-14</sup>. (**Figure 1**)



**Figure 1 : Incidence et proportion de l'IRA chez les patients hospitalisés par régions à travers le monde.**  
(Extrait de Ronco et al. 2019)

Cette appellation unique regroupe en réalité un ensemble extrêmement hétérogène de situations tant sur le plan de l'étiologie ou des mécanismes lésionnels que de la sévérité des lésions ou de l'altération fonctionnelle induite <sup>1,6,8,15</sup>.

Les causes d'IRA sont classiquement séparées en trois grandes catégories étiologiques <sup>15,16</sup>. On distingue ainsi :

- les *IRA fonctionnelles ou pré-rénales* sont liées à un défaut de perfusion rénale secondaire à une hypovolémie vraie ou efficace et la mise en jeu des mécanismes adaptatifs, induisant une chute de la pression de filtration et donc du débit de filtration glomérulaire. L'effet étant uniquement "mécanique" sans lésions

tissulaires associées, ces IRA sont donc immédiatement réversibles. Les modifications transcriptomiques diffèrent des formes organiques <sup>17</sup>. Leurs causes sont multiples mais regroupent : les hypovolémies vraies d'une part liée à une déshydratation ou un saignement ; les hypovolémies efficaces d'autre part, liées soit à une vasoplégie (anaphylaxie, hypertension portale...), une dysfonction cardiaque (Insuffisances cardiaques sévères avec débit cardiaque réduit, aiguës ou chroniques) ou encore une chute de la pression oncotique efficace sanguine (syndrome néphrotique, Kwashiorkor, syndrome de Clarkson...) <sup>15,16</sup>.

- Les IRA *obstructives ou post-rénales* sont liées à un obstacle en aval des reins, empêchant l'écoulement des urines. L'obstacle peut ainsi être vésical, sous vésical ou supra-vésical bilatéral ou supra-vésical unilatéral sur rein unique anatomique ou fonctionnel. Cet obstacle va entraîner une accumulation des urines en amont responsable d'une augmentation de la pression hydrostatique urinaire qui se propage de proche en proche jusqu'à la chambre urinaire bloquant ainsi la filtration glomérulaire <sup>15,16</sup>.

- Les IRA dites *intrinsèques ou parenchymateuses* liées à l'apparition de lésions tissulaires. Ce sont elles qui nous intéresseront principalement par la suite, les IRA pré-rénales ou post-rénales relevant d'un traitement assez évident et simple. Ces IRA parenchymateuses regroupent un ensemble hétérogène de pathologies dans lesquelles le parenchyme rénal va être directement lésé par un ou plusieurs mécanismes affectant un ou plusieurs compartiments rénaux parmi les glomérules, le tubulo-interstitium ou les vaisseaux. On sépare classiquement ces IRA intrinsèques en fonction du compartiment le plus affecté par l'agression. On distingue ainsi : les IRA glomérulaires (Vascularites primitives des petits vaisseaux dont les vascularites à ANCA, les maladies à dépôts de complexes immuns (cryoglobulinémies ou apparentés, lupus érythémateux disséminé, purpura rhumatoïdes, glomérulonéphrites post-infectieuses), ...), les IRA tubulo-interstitielles (nécrose tubulaire aiguë ischémique ou toxique, néphropathie immunoallergique, néphropathie infiltrative, pyélonéphrite, IRA post-chirurgie cardiaque...) et les IRA vasculaires (infarctus rénaux artériels ou veineux, HTA maligne, microangiopathies thrombotiques...) <sup>15,16</sup>.

Cette classification étiologique, résumée dans la **Figure 2**, montre bien l'extrême hétérogénéité existant au sein de ce syndrome et sert de base à la mise en place des stratégies diagnostiques et thérapeutiques.



### Prerenal

Sudden and severe reduction in blood pressure (shock) or interruption of blood flow to the kidneys from severe injury or illness

- Blood loss
- Dehydration
- Heart failure
- Sepsis
- Vascular occlusion

### Intrinsic Renal

Direct injury to the kidneys by inflammation, drugs, toxins, infection, or reduced blood supply

- Acute tubular necrosis
  - Drugs
  - Toxins
  - Prolonged hypotension
- Glomerulonephritis
- Acute tubular necrosis
  - Drugs
  - Toxins
  - Autoimmune disease
  - Infection
- Small-vessel vasculitis

### Postrenal

Sudden obstruction of urine flow due to enlarged prostate, kidney stones, bladder injury or tumor

- Benign prostatic hyperplasia
- Cervical cancer
- Meatal stenosis/phimosis
- Retroperitoneal fibrosis
- Prostate cancer
- Urinary calculi

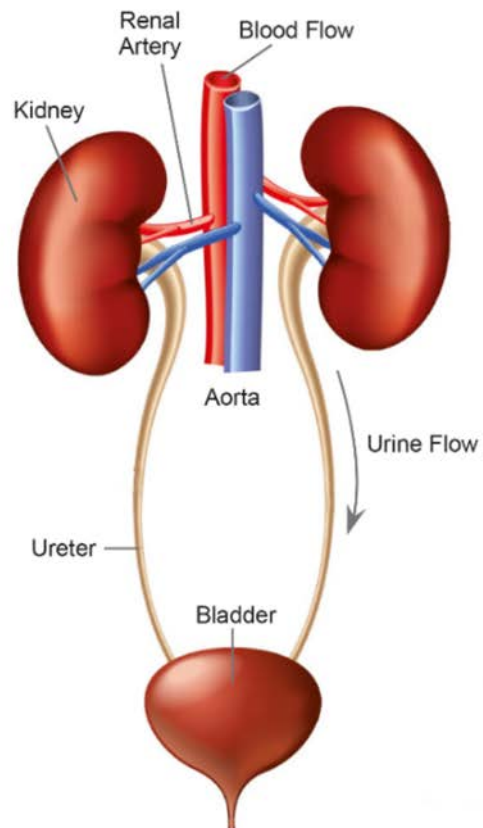


Figure 2 : Etiologies des IRA. (Extrait de Thongprayoon et al. <sup>18</sup>).

### C. Evolution et importance clinique :

Dans les suites d'une IRA, après résolution de l'agression, va débiter une phase de récupération rénale. Cette phase de récupération est moins comprise, la principale difficulté tenant à l'extrême hétérogénéité des définitions des profils évolutifs dans les diverses études malgré des tentatives récentes d'harmonisation <sup>19-</sup>

<sup>22</sup>.

La plupart des patients va récupérer au moins partiellement une fonction rénale après un délai extrêmement variable dépendant de la persistance de l'agression, de la prise en charge, du terrain et de la sévérité de l'IRA <sup>20,23</sup>. Ce processus de récupération associe la mise en jeu de mécanismes de régénération mais aussi de

cicatrisation. Ainsi un épisode d'IRA est souvent associé à l'apparition d'une véritable cicatrice rénale se caractérisant classiquement au niveau histologique par une fibrose tubulo-interstitielle dont l'étendue est corrélée à la séquelle fonctionnelle <sup>20</sup>.

Cette récupération peut sembler complète avec retour à des valeurs de créatininémie ou de DFG proche de la valeur pré-IRA. Ce profil évolutif a longtemps été considéré favorable avec restitution ad integrum sans conséquences ultérieures. Toutefois, même si elle ne s'accompagne pas d'anomalies visibles, cette évolution est potentiellement associée à des séquelles rénales avec amputation de la réserve fonctionnelle. D'autres patients par contre ne récupéreront pas complètement et garderont des séquelles visibles sur les examens de routine. Ces anomalies peuvent correspondre à une altération plus ou moins importante de la fonction de filtration, avec à l'extrême la persistance d'une dépendance à l'épuration extra-rénale, mais aussi des anomalies du filtre ou de la fonction de réabsorption tubulaire <sup>19,20,22,24</sup>.

Cette récupération peut suivre différentes trajectoires. Une part importante des patients va présenter une récupération rapide dans les 7 jours suivant l'agression (90%) avec un distinguo classiquement fait entre les récupérations immédiates (IRA transitoires, 70%) avant 48h et les récupérations retardées (21%) entre 48h et 7 jours <sup>23</sup>. Au-delà de ce délai, le patient change de cadre nosologique, on parle de maladie rénale aiguë en cas d'altération fonctionnelle persistant au-delà de 7 jours mais avant trois mois. Cette situation correspond à une part non négligeable jusqu'à 40% des IRA dans certaines études <sup>19</sup>. Enfin en cas de persistance au-delà de 3 mois post-agression, le patient bascule dans la maladie rénale chronique avec un potentiel de récupération nul <sup>22</sup>.

Il est important de noter que le profil évolutif n'est pas forcément linéaire avec de possibles rechutes à la faveur de nouvelles agressions qui sont alors de mauvais pronostic <sup>19,20</sup>.

L'IRA est un syndrome clinique grave pouvant mettre le jeu le pronostic vital et fonctionnel à cours et à long termes.

A la phase aigüe, elle peut aboutir à une altération fonctionnelle telle que le rein n'assure plus sa mission principale de filtration/épuration du milieu intérieur entraînant la rétention de "déchets" pouvant avoir un rôle toxique direct (toxines urémiques), une perte d'homéostasie hydrique, sodée, électrolytique et acido-basique, à l'origine de conséquences systémiques multiviscérales pouvant mettre directement en jeu le pronostic vital à très court termes. Dans les cas extrêmes (soit 2-5% du total), la mise en route d'un traitement de suppléance, parfois définitif, de la filtration rénale par dialyse est nécessaire pour éviter le décès <sup>9,10</sup>.

Néanmoins, les conséquences d'une IRA ne se limitent pas à cette accumulation aiguë pouvant requérir une suppléance en urgence, mais portent aussi sur les autres organes tels le cœur, le foie, les poumons ou le système nerveux central via des mécanismes non encore complètement compris (stress oxydatif,

inflammation systémique...). Ces conséquences sont responsables d'une bonne part de la morbi-mortalité associée à l'IRA.<sup>25,26</sup>

De plus, un épisode d'IRA induit des conséquences importantes au-delà de la phase initiale à moyen et long-termes. Cela est vrai même pour les formes légères d'insuffisance rénale et même en cas de récupération initiale<sup>27-29</sup>.

L'IRA est fortement associée à une surmortalité avec un Hazard Ratio (HR) voisin de 2 dans les plus grandes études. Cette surmortalité, variable suivant le contexte de survenue, est également corrélée à la sévérité telle qu'évaluée par la classification KDIGO : elle est ainsi présente dès le stade KDIGO 1 avec une augmentation pour chaque stade supplémentaire. A titre d'exemple dans leur méta-analyse de 2018, See et al. identifiaient une surmortalité évaluée à 2.05 morts par 100 personnes.années avec un hazard-ratio augmentant avec la sévérité du grade KDIGO (HR [IC95%] à 1.35 [1.27-1.44], 1.64[1.50-1.80] et 2.76[2.28-3.35] pour KDIGO 1, 2 et 3 respectivement). Ce surrisque est présent même en cas de récupération complète d'autant plus important que la récupération est retardée<sup>6,20,23,30,31</sup>. Cette surmortalité est certes précoce mais persiste dans le temps, jusqu'à plus de 10 ans après l'accident aigu<sup>6,10,11,27,32-46</sup>.

Au-delà de la mortalité, l'IRA est également fortement associée à un risque accru de survenue d'une maladie rénale chronique (MRC)<sup>34,47,48</sup> à fortiori terminale<sup>6,34,44,48</sup> même en cas de récupération complète apparente. Ce sur-risque est présent dès les faibles grades de sévérité et augmente avec ceux-ci. A titre d'exemple, Coca et al.<sup>48</sup> identifié un HR de survenue d'une maladie rénale chronique de 8.8 [3.1-25.5] avec une augmentation suivant les grades KDIGO (HR [IC95%] à 2.0 [1.4-2.8], 3.3 [1.7-6.2] et 28.2 [21.1-37.5] pour les grades KDIGO 1, 2 et 3 respectivement). Les mêmes constatations étaient faites pour la maladie rénale chronique terminale (HR à 3.1 [1.9-5.0], 2.3 [1.7-3.3], 5.0 [2.6-9.8] et 8.0 [1.3-48.6] pour l'IRA tout stade et les stade KDIGO 1,2 et 3 respectivement). Ce surrisque semble également dépendant de la récupération et de sa cinétique. Il est important de noter que ce surrisque existe même en cas de récupération initiale complète et qu'il est d'autant plus important que la récupération est retardée<sup>15,19,30,44</sup>.

Outre une surmortalité et un risque accru de maladie rénale chronique, après un épisode d'IRA, les patients présentent également un risque accru d'autres conséquences chroniques potentiellement invalidantes associées ou non à un surrisque de décès<sup>29,49</sup>. A titre d'exemple, la survenue d'un épisode d'IRA augmente le risque de maladie cardiovasculaire<sup>36,37,48,50,51</sup>, de maladies cérébro-vasculaires<sup>50,51</sup>, d'hypertension<sup>52,53</sup> ou encore de complications obstétricales type prééclampsie/prématurité/petit poids de naissance<sup>54</sup>.

La gravité de ce syndrome est aussi appréciable par son poids médico-économique. Ainsi la survenue d'un épisode d'IRA induit une augmentation importante de la durée d'hospitalisation initiale consommant les ressources de santé<sup>8,11,32</sup> et des coûts de prise en charge à court et long termes notamment la prise en charge des maladies rénales chroniques induites<sup>9,11,32</sup>.

Ce syndrome représente un enjeu de santé publique majeur aussi bien au niveau national qu'international, qui fait l'objet d'une initiative internationale particulière "Oby25" pour optimiser sa détection, son recensement et sa prise en charge avec pour objectif d'avoir 0 mort évitable par IRA en 2025<sup>12</sup>.

## 2. Physiopathologie

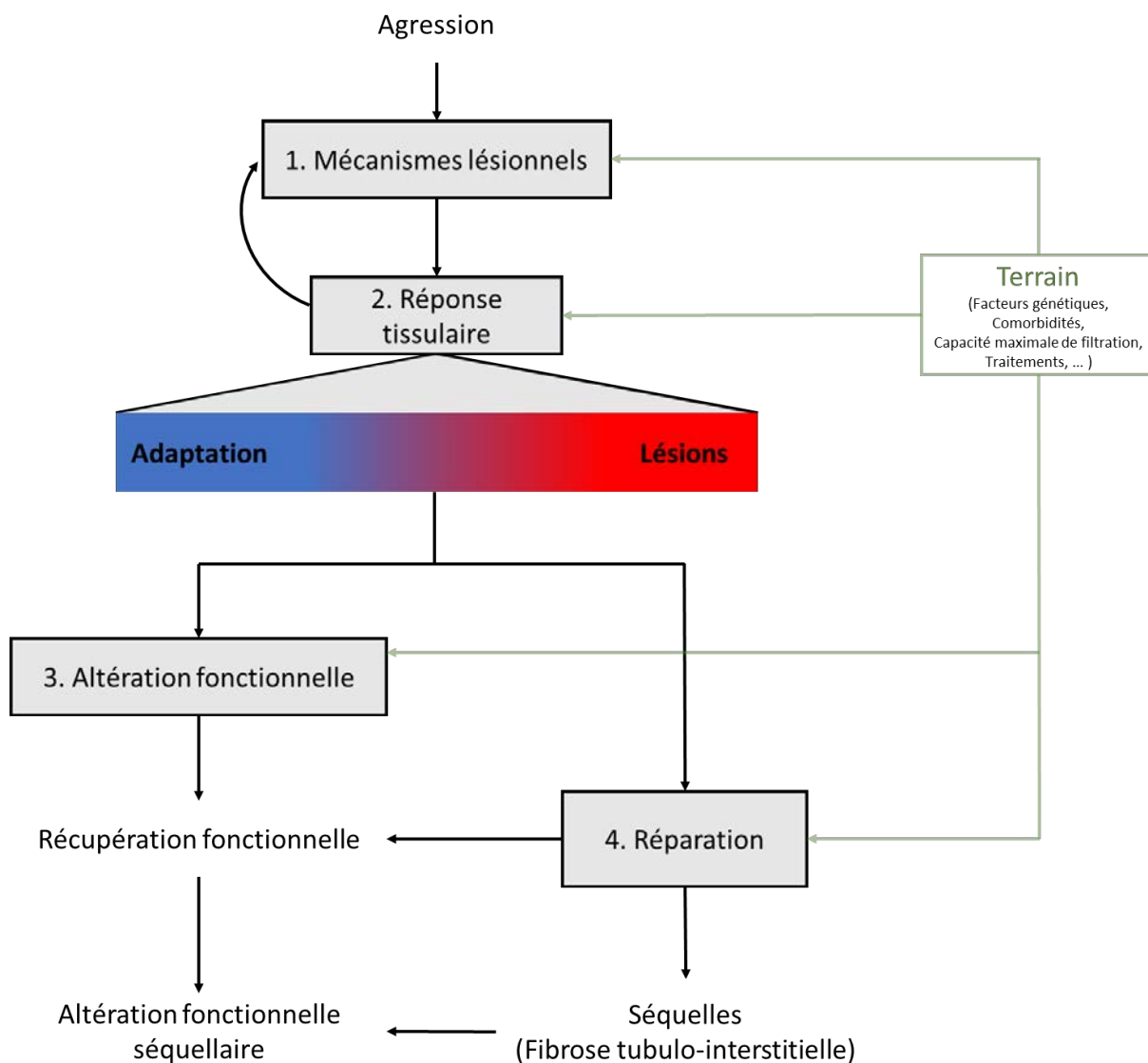
- La physiopathologie de l'IRA est complexe impliquant des éléments liés à l'agression mais avec une influence fondamentale du terrain.
- Elle implique l'ensemble des populations cellulaires rénales ou celles qui l'envahissent secondairement, qui interagissent entre elles pour déterminer la réponse tissulaire, avec un rôle clé de l'épithélium notamment tubulaire proximal.
- On peut schématiser chaque agression comme la somme d'un ou plusieurs mécanismes lésionnels élémentaires (ischémie, inflammation, cytotoxicité directe...) qui vont induire un stress, imposant ainsi une réponse cellulaire notamment métabolique, dont l'excès ou la pérennisation va conduire à la formation de lésions.
- Les lésions induites, en association avec des mécanismes adaptatifs ou non lésionnels, vont être à l'origine d'une altération fonctionnelle qui ne sera visible qu'après épuisement de la réserve fonctionnelle rénale physiologique.
- Après agression, une phase de récupération survient, permettant une récupération fonctionnelle plus ou moins complète. Pourtant il persiste souvent une séquelle sous la forme d'une fibrose tubulo-interstitielle pouvant amputer la capacité fonctionnelle maximale. La survenue de cette réparation fautive est en partie due à la persistance des anomalies épithéliales, notamment métaboliques.
- Une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques en jeu permet d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques
- HNF-1 $\beta$ , un facteur de transcription exprimé dans l'épithélium tubulaire rénal, via sa régulation de nombreux processus notamment le métabolisme énergétique cellulaire, pourrait avoir un rôle dans l'adaptation à l'agression et la réparation. Ce rôle pourrait expliquer une part du phénotype rénal des patients porteurs d'une anomalie de ce gène.

L'identification d'une cascade physiopathologique commune à l'ensemble des causes d'IRA est complexe en raison de l'hétérogénéité de ce syndrome. Il est néanmoins possible de définir un schéma général commun sans oublier que chaque étiologie va présenter des particularités que nous ne détaillerons pas ici en dehors de la chirurgie cardiaque avec circulation extra-corporelle. Dans cette partie nous essaierons, dans un premier temps, de fournir une vision schématique uniciste permettant de représenter une cascade physiopathologique commune à toutes les IRA en apportant une attention particulière au rôle de l'adaptation métabolique. Nous prêterons une attention particulière au modèle humain complexe d'IRA que représente la chirurgie cardiaque avec circulation extra-corporelle, qui a servi de modèle à nos études en pathologie humaine. Dans un second temps nous nous focaliseront sur un facteur de transcription épithélial tubulaire

(HNF-1 $\beta$ ), dont certaines fonctions suggèrent un rôle dans l'adaptation épithéliale à l'agression et la réparation tissulaire.

### **A. Description physiopathologique schématique :**

La survenue d'une IRA est déterminée par la survenue d'un ou plusieurs facteurs agresseurs induisant une réponse rénale de nature et d'intensité variable. Cette réponse tissulaire va déterminer le retentissement tissulaire rénal allant de la simple adaptation sans lésion à l'apparition lésions tissulaires sévères. En fonction des lésions induites et des phénomènes d'adaptation, une altération fonctionnelle d'organe peut intervenir en particulier quant à la fonction de filtration/épuration du rein qui sert actuellement de base au diagnostic de l'IRA. Au décours de l'agression, des mécanismes de réparation/régénération vont intervenir afin de tenter de récupérer une fonction d'organe suffisante. Le terrain sur lequel s'initie le processus d'IRA est un déterminant essentiel du retentissement avec une influence possible à tous les niveaux, de la superposition du processus agresseur principal avec d'autres facteurs aggravants, à l'altération fonctionnelle induite par des lésions données en passant par la réponse au facteur agresseur <sup>8,16,55</sup>. Dans cette partie nous étudierons successivement les différentes étapes de ce schéma physiopathologique (**Figure 3**) : **1.** l'agression et les mécanismes lésionnels, **2.** la réponse tissulaire, **3.** l'altération fonctionnelle et **4.** les processus de réparation.



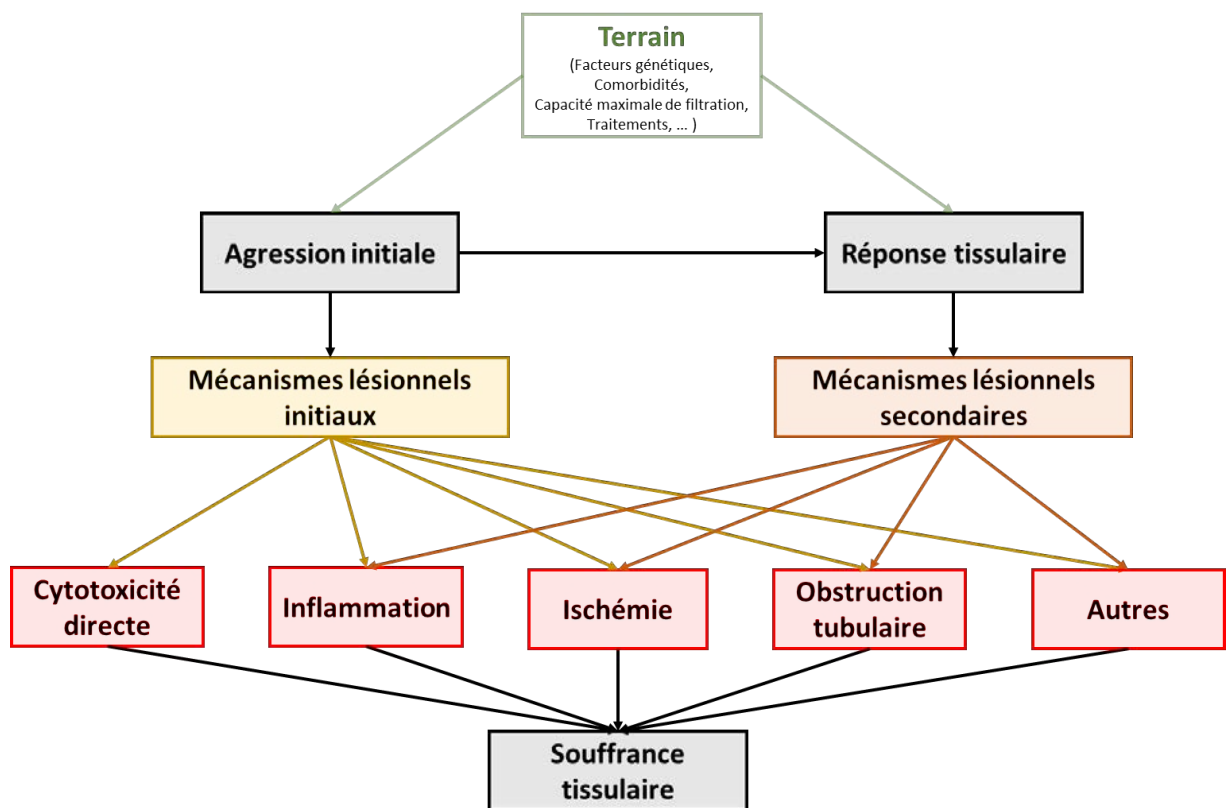
**Figure 3 : Représentation schématique de la cascade physiopathologique de l'IRA.**

### A.1. Mécanismes lésionnels de l'agression rénale aiguë :

La première étape dans la cascade générant une IRA correspond à l'exposition à un facteur agresseur. A des fins de simplification, on peut considérer que chaque contexte étiologique implique à part variable un nombre réduit de mécanismes lésionnels élémentaires responsables de la majorité des effets. Ces mécanismes lésionnels peuvent voir leurs effets potentialisés par des facteurs liés au terrain. Une représentation schématique est montrée (**Figure 4**). Au-delà de cette simplification purement didactique et théorique, en conditions réelles, les choses sont beaucoup plus complexes. Ainsi chaque situation d'IRA est particulière avec, intrication d'une ou souvent de plusieurs étiologies, à des timing différents, imposant

chacune un certain nombre de mécanismes lésionnels agressant le parenchyme rénal avec des interactions possibles entre eux et avec des facteurs liés au terrain.

Sur le plan chronologique, on distingue aussi classiquement deux phases successives dans l'agression : une phase dite d'initiation puis une phase d'amplification. Durant la phase d'initiation, la souffrance rénale est attribuable directement au facteur agresseur via un ou plusieurs mécanismes lésionnels spécifiques. Pendant la phase d'amplification, à l'inverse, la souffrance rénale résulte de nouveaux mécanismes lésionnels secondaires à la réponse tissulaire aux dégâts induits, même en l'absence de persistance du facteur lésionnel initial. Là encore cette séparation est artificielle, ces deux phases se superposant dans le temps et partageant certains mécanismes, raison pour laquelle nous n'opérerons pas de séparation ici <sup>55,56</sup>.



**Figure 4 : Représentation schématique des mécanismes lésionnels initiaux et secondaires.**

A titre d'exemple nous détaillerons 4 mécanismes lésionnels élémentaires simples représentant des acteurs majeurs dans les principales causes d'IRA : l'ischémie, la toxicité directe, l'induction d'une réponse inflammatoire locale et générale et la précipitation intra-tubulaire. Bien d'autres mécanismes pourraient être décrits avec des nuances pour chacun d'entre eux.

- Le mécanisme lésionnel élémentaire principal dans l'IRA correspond à l'apparition d'une ischémie secondaire à une hypoperfusion rénale globale ou locale.** Ce mécanisme est présent dans la plupart des étiologies d'IRA avec une place prépondérante, bien que non exclusive, dans la plupart notamment les plus fréquentes <sup>55,57-63</sup>. L'ischémie tissulaire rénale peut être secondaire à divers mécanismes inducteurs d'IRA qui s'associent souvent, à part variable dans chaque contexte et qui vont déborder le système d'autorégulation permettant habituellement de maintenir une perfusion suffisante <sup>16,55,63</sup>. Ainsi l'hypoperfusion peut être secondaire à une hypovolémie vraie (hémorragie, déshydratation...), une hypovolémie efficace (insuffisance cardiaque, vasoplégie avec séquestration volémique dans le secteur veino-capillaire en cas de cirrhose ou de choc anaphylactique/septique) ou une augmentation des résistances intra-rénales secondaires à des anomalies macro-vasculaires (obstruction macro-vasculaire artérielle ou veineuse...) ou microvasculaires (vasoconstriction en lien avec la mise en jeu des mécanismes de réponse au stress, micro-thrombi intravasculaires diffus dans des contextes de MAT ou CIVD, encombrement vasculaire par des cellules inflammatoires, dysfonction endothéliale diffuse...) voire périrénales (augmentation des pressions périrénales en lien avec syndrome du compartiment abdominal, un hématome intra-capsulaire ou un œdème tissulaire majeur) <sup>58</sup>. L'ischémie peut aussi n'avoir aucun lien avec une réduction du débit sanguin rénal mais être secondaire à une inadaptation de la distribution de celui-ci aux besoins tissulaires secondaires à des anomalies microvasculaires <sup>56,58,63,64</sup>. Bien que l'ischémie soit souvent l'un des mécanismes lésionnels initiaux, elle représente aussi un mécanisme d'amplification secondaire quel que soit le mécanisme initial de l'IRA <sup>56-58</sup>. Le tissu rénal siège de lésions va accumuler des altérations pourvoyeuses d'ischémie telles l'œdème interstitiel <sup>55-58,63</sup>, un infiltrat inflammatoire interstitiel ou vasculaire <sup>55-58</sup>, une vasoconstriction rénale secondaire à l'altération endothéliales (réduction du tonus vasodilatateur par exemple par réduction de la production de NO ou augmentation de la vasoconstriction via par exemple la production d'endothéline) <sup>55-58,65-67</sup> ou encore des microthromboses secondaires à une dysfonction endothéliale et/ou une coagulopathie locale <sup>55,56,63,68</sup>. Ainsi, au sein du parenchyme rénal lésé, une ischémie va apparaître, s'aggraver et souvent persister indépendamment du mécanisme lésionnel initial aggravant secondairement les lésions tissulaires <sup>55-58</sup>. Cette ischémie entraîne d'une part un défaut d'apport en substrats essentiels au fonctionnement cellulaire mais également un défaut d'élimination des déchets issus du métabolisme ayant des effets potentiellement toxiques (acides organiques...). Ces conséquences vont induire une souffrance des différents compartiments à laquelle les cellules vont tenter de s'adapter voire, quand les capacités d'adaptation sont dépassées, mourir <sup>55,58</sup>. C'est en particulier bien documenté pour le déficit d'apport en dioxygène, responsable d'une hypoxie tissulaire, un des acteurs majeurs de la physiopathologie des IRA mais aussi des MRC <sup>55-58,64</sup>. Celle-ci agit principalement en empêchant la production énergétique aérobie habituellement dominante dans certaines cellules notamment de



l'épithélium tubulaire<sup>57,69</sup>. Ce déficit de production énergétique va jouer un rôle clé dans l'apparition de multiples anomalies cellulaires (dédiﬀérenciation, mort cellulaire par apoptose voire nécrose, modulation de l'inflammation...) potentiellement responsable des lésions comme nous le détaillerons plus tard<sup>57</sup>. D'autres conséquences de l'ischémie existent (accumulation d'acide lactique, accumulation d'autres déchets organiques...) mais leur rôle dans la pathogénie de l'IRA est moins clairement étudié et semble moins prépondérant voire même protecteur. Les cellules épithéliales tubulaires proximale (S3) et de la branche ascendante large de l'anse de Henlé, située à la jonction cortico-médulaire sont particulièrement vulnérables aux conséquences de l'ischémie notamment l'hypoxie<sup>55,61,64,69</sup>. Cette vulnérabilité est principalement attribuable à leurs forts besoins énergétiques, dépendant d'une production essentiellement par métabolisme aérobie sans machinerie glycolytique capable de compensée<sup>55,57,64,69,70</sup>, leur permettant d'assurer la réabsorption active du sodium<sup>16,55,57,69,71</sup>. Néanmoins, elle est aussi attribuable à la précarité de l'apport en oxygène dans cette région secondaire à l'architecture vasculaire rénale (agencement en série, shunts vasculaires vrais, proximité artérioveineuse agencée à contre-courant permettant des shunts diffusifs, agencement 3D avec manque de proximité entre l'épithélium de ces régions et les structures vasculaires...) <sup>61,64,72-75</sup> et à des capacités d'adaptation réduites<sup>64,76</sup>. Les conséquences de l'ischémie tissulaire sont susceptibles d'être aggravées par des facteurs ou mécanismes associés en lien avec le terrain sur lequel survient l'agression. A titre d'exemple l'hypoxie tissulaire peut être aggravée par des facteurs réduisant le contenu sanguin en O<sub>2</sub> telle l'anémie<sup>57,77-79</sup> ou l'hypoxémie lié à une maladie respiratoire chronique ou encore des antécédents à l'origine d'une plus grande précarité vasculaire comme la présence d'une maladie rénale chronique avec fibrose et raréfaction capillaire sous-jacente<sup>64,80,81</sup>. De la même manière certains traitements jouent un rôle inhibiteur sur les mécanismes d'adaptation du rein à l'hypoperfusion, tels les AINS ou les antagonistes du SRAA ou encore les anti-calcineurines<sup>16</sup>, sensibilisant le rein à une éventuelle agression ischémique.

- ***Un deuxième mécanisme lésionnel fréquent correspond à une lésion toxique directe exercée par une substance anormalement présente dans ce contexte d'agression.*** Il correspond à un mécanisme lésionnel principal dans de nombreuses étiologies notamment la toxicité de certains médicaments (vancomycine, aminosides)<sup>82</sup>, la néphropathie induite par les produits de contrastes<sup>83</sup>, la rhabdomyolyse<sup>60,84</sup>, la tubulopathie myélomateuse<sup>59,85</sup> ou certains sepsis (endotoxines)<sup>63</sup>. Les substances toxiques en causes peuvent soit être endogènes (chaines légères, myoglobine...) soit exogènes (endotoxines bactériennes, médicaments, produit de contraste...). Cet effet toxique peut porter sur l'ensemble des populations ou structures cellulaires du néphron mais l'épithélium tubulaire notamment proximal est encore la cible principale<sup>59,60,82-85</sup>. Il est le premier segment au contact de la substance et présentent des capacités d'endocytose notamment dépendantes du couple Mégaline/Cubuline, qui induisent une importation massive de la substance toxique en

intracellulaire <sup>59</sup>. Le mécanisme le plus fréquent correspond à l'induction indirecte de lésions spécifiques, notamment via la production de ROS après accumulation lysosomale. Ces ROS vont induire diverses réactions cellulaires, par exemple une dédifférenciation avec dysfonction <sup>59</sup>, l'activation de la production de médiateurs inflammatoires exerçant des effets toxiques <sup>59,84,85</sup>, l'induction d'altérations mitochondriales et du métabolisme <sup>55</sup> ou encore l'induction de phénomènes de mort cellulaire programmée ou non <sup>82,84-87</sup>. La lésion peut aussi être secondaire à une action directe de la substance induisant des modifications délétères sur les composants des cellules cibles telle des peroxydations membranaires pour la myoglobine <sup>84</sup>. L'ensemble de ces lésions vont induire une souffrance épithéliale et tissulaire à l'origine de la cascade physiopathologique de l'IRA.

- **Un autre mécanisme lésionnel clé dans la physiopathologie de l'IRA est la survenue d'une inflammation intra-rénale** <sup>8,55,56,58-60,88</sup>. Cette inflammation est parfois un mécanisme lésionnel initial dans ces cas où le mécanisme d'agression correspond à l'action d'une substance endogène ou exogène jouant le rôle d'un DAMPS (Damage Associated Molecular Patterns) ou d'un PAMPS (Pathogen Associated Molecular Patterns) activant directement une inflammation intra-rénale. A titre d'exemple on pourra citer la rhabdomyolyse ou l'hémoglobininurie, la tubulopathie myélomateuse, ou encore certains sepsis <sup>8,55,56,58-60,88</sup>. Même en dehors de ces situations, l'inflammation est activée indirectement et joue toujours un rôle clé d'amplificateur des dommages. Le tissu rénal agressé, notamment l'épithélium, va libérer des DAMPS (ATP, HSP, ADN, Histone...) par sécrétion ou par libération de son contenu intracellulaire à la suite d'un processus de mort cellulaire, en particulier par nécrose <sup>88-90</sup>. Ces DAMPS/PAMPS vont activer une réponse inflammatoire innée locale, via des récepteurs (notamment des familles TLRs : Toll-Like Receptors/NOD-like R : Nucleotide Oligomerization Domain like Receptors) spontanément présents sur divers types cellulaires et induire une production, notamment par les cellules épithéliales et les cellules immunes résidentes (Cellules dendritiques, macrophages résidents), de médiateurs proinflammatoires et chémoattractants <sup>55,58,88,89</sup>. Ces médiateurs vont agir localement sur les différents acteurs cellulaires induisant une activation des cellules immunitaires innées ou adaptatives résidentes, des altérations endothéliales avec en particulier augmentation de l'expression de certaines molécules d'adhérence (ICAM1, Sélectines) ou encore induire une dédifférenciation ou la mort cellulaire des cellules épithéliales amplifiant le phénomène <sup>55,88,89,91</sup>. La libération de ces médiateurs, notamment les chémokines (Ccl2, Ccl5, CxCL1, CX3CL1...), en synergie avec les modifications locales notamment l'augmentation des capacités d'adhérence de l'endothélium, va aussi permettre le recrutement de cellules immunes circulantes initialement innées (PNN puis macrophages puis NK) puis également acquises (Lymphocytes T +/- B) qui infiltreront le parenchyme rénal <sup>55,56,88,89</sup>. Cette inflammation, impliquant tous les acteurs de l'immunité, va participer à la souffrance tissulaire et la formation des lésions par des mécanismes variés (libération de cytokines pro-inflammatoires génératrices de mort cellulaire

ou de dysfonction mitochondriale par exemple, ROS, cytotoxicité directe via perforine/Granzyme de certaines cellules...). Cela explique le bénéfice obtenu dans de nombreuses études expérimentales lors de la déplétion d'une ou plusieurs de ces populations cellulaires inflammatoires <sup>56,58,88,92-97</sup>. Un cas particulier d'IRA avec un mécanisme un peu différent et encore mal compris correspond aux néphropathies tubulo-interstitielles aiguës ou certaines maladies infiltratives tumorales (lymphome...) ou non (sarcoïdose...). Dans ces situations, l'afflux de cellules immunes induisant une inflammation locale est l'événement primaire sans participation initiale de DAMPS/PAMPS.

- ***Enfin, un dernier mécanisme lésionnel fréquemment rencontré en contexte d'IRA correspond à l'accumulation d'une substance pathogène, principalement dans la lumière tubulaire en contexte aigu (obstruction intra-tubulaire).*** Ce mécanisme lésionnel est en lien avec la précipitation intra-tubulaire d'une substance la plupart du temps endogène (hémoglobine, myoglobine, chaînes légères, bilirubine, cristaux oxaliques ou phosphocalciques ou uriques) plus rarement exogène (cristaux médicamenteux type indinavir, amoxicilline ou acyclovir) <sup>59,98,99</sup>. La substance peut provenir de la circulation via une filtration glomérulaire <sup>16,59,60,84,99</sup> mais aussi à une libération tubulaire directe <sup>16</sup>. Cette précipitation se déroule principalement dans le tubule distal en raison de la plus forte concentration et acidification des urines à ce niveau <sup>99</sup>. La précipitation est permise par le dépassement du seuil de saturation en lien avec la conjonction d'une concentration urinaire importante de la substance, d'un flux urinaire réduit (réduction filtration, augmentation de la réabsorption), de la présence de cofacteurs de précipitation comme l'uromoduline <sup>16,59,60</sup> et d'autres facteurs biochimiques locaux tels que le pH <sup>59,60,99</sup>. Ce mécanisme participe à la genèse initiale des lésions dans de nombreuses étiologies. On citera à titre d'exemple la rhabdomyolyse (précipitation de myoglobine dans la lumière tubulaire) <sup>60,84,98</sup>, les tubulopathies à cylindres myélomateux (précipitations de chaînes légères libres) <sup>59,98</sup> ou encore les néphropathies cristallines (précipitations de cristaux d'oxalate de calcium, d'urate monosodique, de phosphate de calcium ou de médicaments comme l'amoxicilline, l'indinavir ou l'acyclovir) <sup>98,99</sup>. Il sert également de mécanisme d'amplification des lésions dans la plupart des étiologies via la formation de cylindres épithéliaux secondaires à la souffrance tubulaire. En effet, les cellules épithéliales tubulaires peuvent subir un processus de mort cellulaire aboutissant à la libération de débris dans la lumière. Sans forcément mourir, les cellules tubulaires agressées peuvent également être libérées vivantes dans la lumière du fait d'une perte d'adhérence à la membrane basale secondaire à la désorganisation de leur cytosquelette d'actine et la mauvaise redistribution des intégrines membranaires. Ces débris et cellules non adhérentes peuvent s'accumuler et former de véritables cylindres épithéliaux intra-tubulaires présents dans la plupart des IRA <sup>16,100</sup>. La pathogénicité de ces précipitats ou cylindres tubulaires est claire dans la plupart des étiologies. Elle résulte de la combinaison d'un effet obstructif mécanique, d'un effet cytotoxique direct de la substance sur l'épithélium de voisinage ou encore d'un effet pro-

inflammatoire potentiellement majeur<sup>59,60,84,85,99</sup>. Plusieurs facteurs favorisants liés au terrain ou aux autres mécanismes lésionnels peuvent favoriser la formation de ces précipitats. A titre d'exemple on peut évoquer la réduction du flux urinaire (réduction filtration et augmentation réabsorption) secondaire à l'hypovolémie ou l'acidification des urines (apport alimentaire ou intra-veineux, augmentation de la charge acide)<sup>99</sup>.

Bien d'autres mécanismes peuvent être décrits au-delà de ces quatre grands mécanismes lésionnels élémentaires avec des rôles plus ou moins clairs dans la physiopathologie. De même des nuances peuvent être faites en fonction de chaque étiologie sur les moyens de mise en œuvre de ces mécanismes mais nous ne détaillerons pas cela ici. **Il convient également de garder à l'esprit que tous ces mécanismes sont étroitement intriqués et leur séparation est purement artificielle pour des besoins de simplification.**

### **Modèles expérimentaux d'IRA**

Pour explorer la physiopathologie des IRA, il est possible de s'appuyer sur des modèles expérimentaux d'agression associant à parts variables ces mécanismes lésionnels élémentaires. Ceux-ci restent imparfait mais offrent des possibilités d'exploration et d'intervention importantes. Le plus simple correspond aux approches *in vitro*, évaluant les effets de l'exposition de différentes populations cellulaires (épithéliales principalement d'origine tubulaire proximale, cellules immunitaires, cellules endothéliales...lignées ou cultures primaires, iPSC derived cells) à ces mécanismes lésionnels élémentaires censés mimer l'agression *in vivo* (hypoxie, DAMPS type myoglobine/hémoglobine, PAMPS type LPS, néphrotoxiques type gentamicine, cytokines inflammatoires)<sup>101-103</sup>. Ces expérimentations représentent des méthodes indispensables pour des explorations préliminaires ou des explorations mécanistiques<sup>101-103</sup>. Néanmoins ce type d'exploration, présente de nombreuses limites rendant leur interprétation difficile (cellules non physiologiques, absence d'interaction entre les populations cellulaires, absence d'architecture 3D, agression simpliste ne reflétant pas les multiples mécanismes impliqués *in vivo*...) <sup>101,102,104</sup>. De nouvelles techniques recréant des architectures tissulaires 3D plus proches du tissu rénal ont été développées<sup>101,102,105</sup>. Malgré tout, ces modèles restent très imparfaits n'assurant en rien une quelconque transférabilité, ce qui justifie la nécessité absolue d'une validation *in vivo*.

Un peu plus complexe, divers modèles animaux *in vivo* plus ou moins élaborés sont disponibles. Plusieurs animaux peuvent être utilisés de la classique souris, facile d'utilisation mais avec des différences physiologiques rénales notables par rapport à l'homme, à d'autres modèles se voulant plus proche mais plus lourds à mettre en place (chien, cochon...) <sup>3,102,103,106</sup>. Ces animaux peuvent être soumis à différents modèles, le plus classique étant l'ischémie reperfusion par clampage des artères rénales (IRI) mais d'autres sont possibles (glycérol, LPS, cisplatine...) <sup>63,102,103,106,107</sup>. Là encore, bien que plus proches de la réalité, ces modèles restent trop simplistes/purs comparativement aux agressions en pathologie humaine qui sont souvent multifactorielles. De plus, la volonté de constater une altération fonctionnelle, notamment sur certaines

espèces extrêmement résistantes à l'image de la souris, a abouti à l'utilisation de modèles agressifs d'IRA dans lesquels l'adaptation est forcément dépassée et qui ne correspondent pas à la réalité clinique observée chez l'homme. Il est important de garder à l'esprit que ces modèles expérimentaux sont des moyens intéressants de fournir des résultats préliminaires. Cependant ils demeurent insuffisants pour tirer des conclusions généralisables comme le montre leur contribution finalement assez faible aux progrès dans la prise en charge de l'IRA ces dernières années <sup>3,103,108,109</sup>.

### ***Application à la pathologie humaine : l'exemple de l'IRA après chirurgie cardiaque avec CEC***

En pathologie humaine, l'IRA peut aussi être considérée comme les résultats de l'association d'un ou plusieurs de ces mécanismes lésionnels élémentaires. Un exemple d'IRA, fréquemment utilisé en recherche clinique, notamment dans le cadre de cette thèse, correspond à la chirurgie cardiaque avec circulation extra-corporelle. Cette IRA présente plusieurs avantages en faisant un véritable modèle d'agression programmée particulièrement pratique pour les activités de recherche :

- ce sont des chirurgies relativement fréquentes permettant le recrutement de cohortes importantes avec un nombre même réduit de centres.
- l'incidence de l'IRA est variable suivant les critères mais souvent importante (20-30%) permettant d'obtenir un nombre d'événements correct sans nécessité d'une immense cohorte <sup>61,62</sup>.
- elle possède une grande importance clinique du fait de l'association au pronostic <sup>61,62</sup>.
- il s'agit d'un modèle multifactoriel complexe qui présente des caractéristiques communes avec de nombreuses autres causes d'IRA <sup>61,62</sup>.
- du point de vue logistique, il s'agit d'une agression programmée avec une procédure relativement standardisée comprenant un suivi étroit en réanimation facilitant la collection des informations et échantillons voire les interventions thérapeutiques.

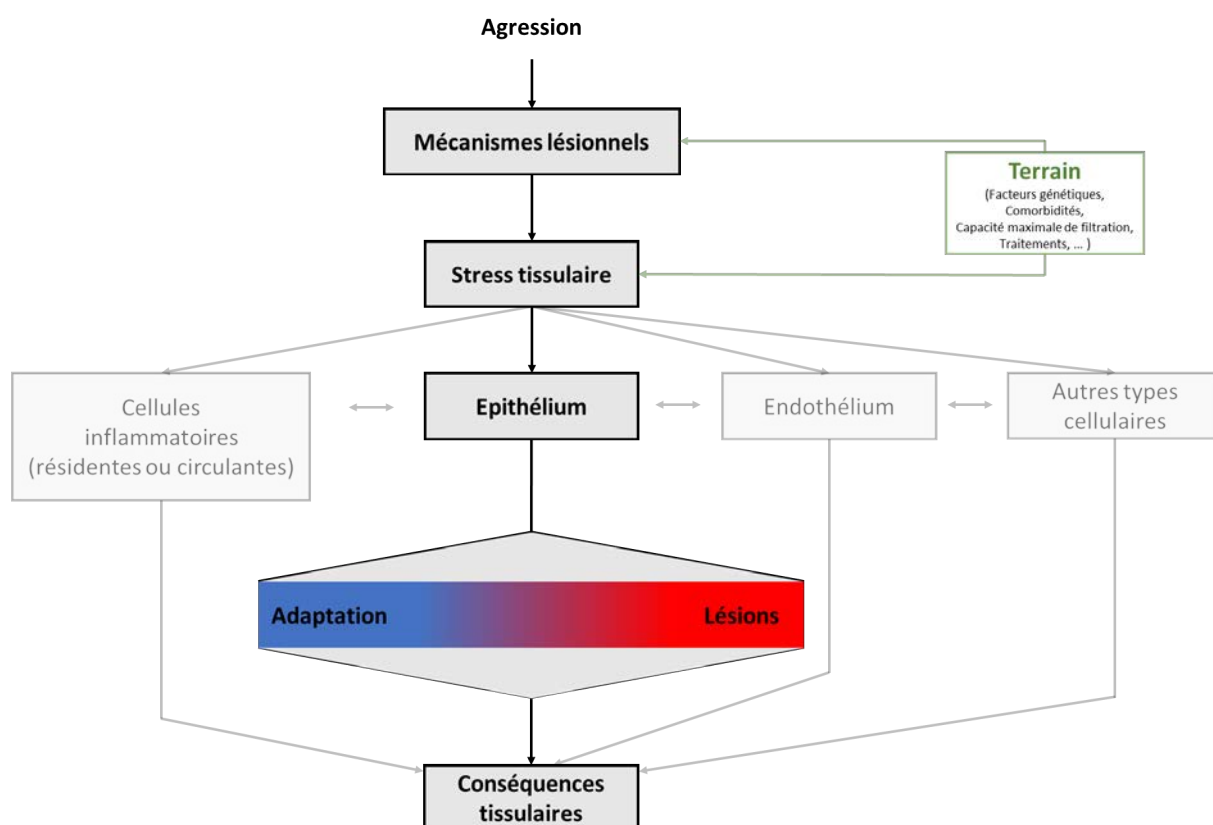
La physiopathologie de l'IRA secondaire à une chirurgie cardiaque sous CEC est encore incomplètement comprise. Comme toutes les étiologies en vie réelle, elle est relativement complexe avec implication de plusieurs mécanismes lésionnels élémentaires à la fois pendant la période per-opératoire mais aussi post-opératoire surtout en cas de complications <sup>8,61,62</sup>. L'induction d'une ischémie rénale est l'un des mécanismes principaux. Elle est secondaire à de multiples phénomènes agissant en synergie pour réduire globalement ou localement la perfusion rénale : hypotension peropératoire sur vasoplégie (inflammation, neurosédation...) ou hypovolémie (saignements), dysfonction cardiaque droite et gauche post-opératoire (bas débit et congestion veineuse), modification du régime de pression de perfusion per-CEC (continu vs pulsatile), mise en jeu spontanée ou pharmacologique des mécanismes de réponse au stress induisant une vasoconstriction rénale (catécholamines, SRAA, scavenging NO, endothéline 1...), microembols périphériques (thrombotiques ou de cholestérols) secondaires à la bio-incompatibilité du circuit de CEC (inflammation, activation de la

coagulation intrinsèque...) et aux manœuvres vasculaires (clampage, cathérisation...) ou encore la réduction du contenu sanguin en dioxygène secondaire à l'anémie (hémolyse, hémodilution, saignement)<sup>8,57,61,62,77–79,110</sup>. L'inflammation systémique et rénale est également un mécanisme essentiel. Son origine bien qu'incomplètement comprise est là encore plurifactorielle : bio-incompatibilité des composants du circuit de CEC, hémolyse avec stress oxydatif et lésions tissulaires génératrices d'inflammation, ischémie rénale et systémique avec inflammation secondaire. Elle induit l'activation des effecteurs circulant de l'inflammation (cytokines, complément, cellules immunes principalement innées...) provoquant notamment des lésions endothéliales. Elle induit également un infiltrat inflammatoire rénal aggravé par la production de signaux chémoattractants locaux secondaires à la souffrance tissulaire<sup>61,62</sup>. Enfin, un dernier mécanisme important correspond à une véritable néphropathie pigmentaire. Elle résulte de la libération massive d'hémoglobine libre secondaire à une hémolyse dans le circuit de CEC (incompatibilité, thrombus pariétaux et circulants, effet mécanique de cisaillement des pompes/tubulures/filtres). Cette hémoglobine libre va, après consommation complète de l'haptoglobine circulante empêchant habituellement sa filtration glomérulaire, passer dans l'urine et générer des lésions tubulaires par toxicité épithéliale directe (stress oxydatif lié à la structure héminique notamment) et formation de précipitats intra-tubulaires<sup>61,62</sup>. La participation d'autres mécanismes est certaine surtout en cas de complication associée à l'image de la toxicité médicamenteuse directe liée aux produits de contrastes en cas d'imagerie ou à certains antibiotiques en cas d'infection<sup>62</sup>.

Ce modèle complexe correspond donc à un bon exemple et une base d'exploration avant transfert à d'autres contextes. Néanmoins, chaque contexte pathologique étant particulier, notamment par les mécanismes mis en œuvre, il est fréquent que les conclusions obtenues ne soient pas généralisables.

## **A.2. Réponse tissulaire rénale à l'agression, de l'adaptation à la lésion :**

Exposé à cette agression de manière hétérogène, le tissu rénal va subir un stress variable touchant tous les compartiments cellulaires (endothélium, podocytes, épithélium tubulaire, péricytes, cellules immunitaires résidentes...). L'ensemble des cellules de chaque compartiment vont répondre à ces différents mécanismes lésionnels avec des moyens dépendant du type cellulaire, de l'agression et de la réponse des autres types cellulaires. Le terrain peut, là encore, avoir un rôle en favorisant ou limitant les capacités d'adaptation tissulaire. **(Figure 5)** Bien que chaque compartiment joue un rôle et interagisse avec les autres, l'épithélium tubulaire tient un rôle prépondérant en particulier celui du tubule proximal. C'est pour cela que nous nous sommes focalisés sur ce compartiment durant cette thèse<sup>55,56,89,111–113</sup>.



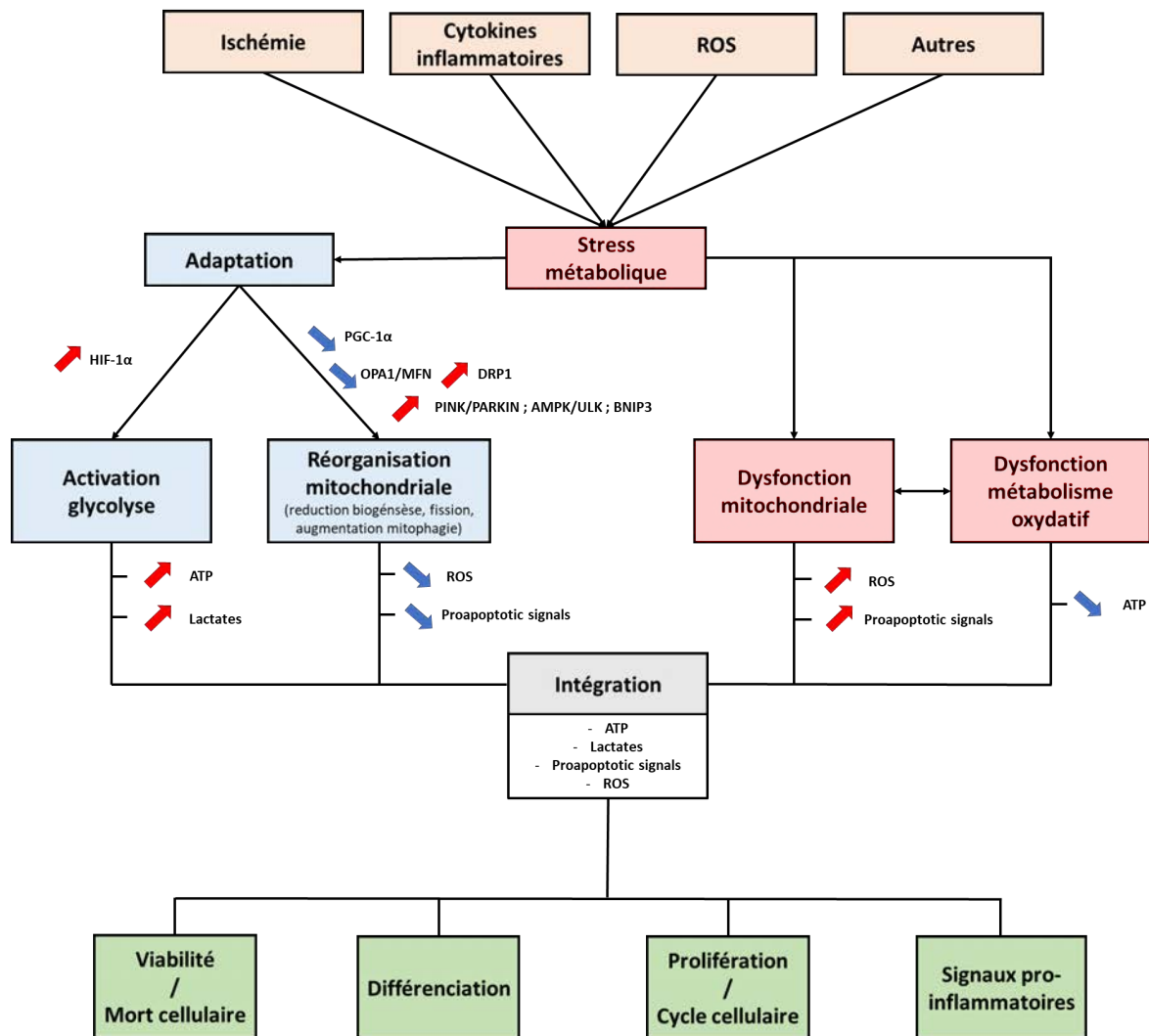
**Figure 5 : Représentation schématique de la réponse tissulaire à l'agression.**

Cette réponse essaie de limiter les lésions et l'altération fonctionnelle fixée qui lui est associée à l'échelle tissulaire. Cependant certains de ces mécanismes peuvent être à double tranchant. Pour limiter ces lésions, ils sont susceptibles d'être délétères à l'échelle cellulaire ou même d'aggraver l'altération fonctionnelle à court termes. De plus, quand ceux-ci sont mis en jeux de manière inadaptés ou sont dépassés, ils peuvent avoir un effet aggravant sur les lésions tissulaires. Ainsi, il existe un gradient continu de réponse entre l'adaptation physiologique au stress et le dépassement complet de celle-ci avec à l'extrême l'induction d'une mort cellulaire incontrôlée.

De nombreux mécanismes adaptatifs principaux peuvent être identifiés. Nous en avons choisi 4 en raison de leur lien potentiels avec le reste de l'exposé, mais d'autres pourraient être conceptualisés. Là encore, au-delà de la séparation artificielle forcée pour des besoins didactiques, ces mécanismes adaptatifs sont étroitement intriqués au cours de l'IRA et au final la réponse globale est un mélange à part variable de l'ensemble de ces mécanismes adaptatifs.

- **Un premier élément central de la réponse épithéliale à l'agression correspond à l'adaptation de son métabolisme notamment énergétique.**

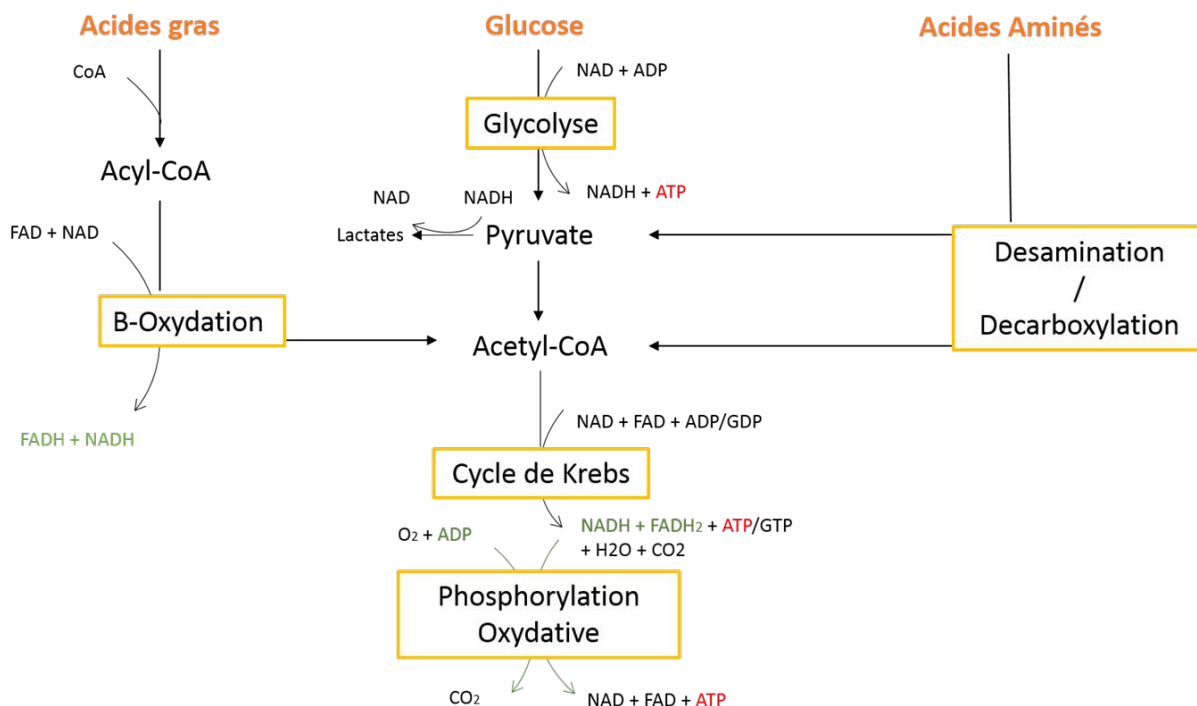
Ce domaine, longtemps négligé en contexte d'IRA notamment en raison de limites techniques, fait l'objet d'une attention croissante depuis quelques années. Au-delà de permettre de maintenir une production énergétique il est de plus en plus vu comme un élément important dans la régulation du comportement épithélial, jouant le rôle de chef d'orchestre des autres mécanismes adaptatifs. (**Figure 6**)



**Figure 6 : Stress et réponse métabolique épithéliale à la phase aiguë de l'agression comme un régulateur du comportement épithélial.** ROS : Reactive oxygen species ; ATP : Adénosine triphosphate ; HIF-1α : Hypoxia inducible factor 1 α ; PGC-1α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α ; DRP1 : Dynamin-related protein 1 ; OPA1 : Optic atrophy 1 ; MFN : Mitofusins ; PINK : PTEN-induced putative kinase 1 ; AMPK : AMP dependent kinase ; ULK : Unc51 like autophagy activating kinase ; BNIP3 : BCL2 interacting protein 3.



En condition normale, le rein est un organe avec une forte consommation d'ATP au même titre que le cerveau ou le coeur. Cette consommation est particulièrement importante au sein de l'épithélium tubulaire (notamment le tubule proximal), pour assurer ses fonctions de réabsorption actives <sup>69,114</sup>. La production énergétique peut être assurée via différentes voies dont la participation est variable suivant le type cellulaire et sa localisation. **(Figure 7)** Ainsi les cellules glomérulaires et endothéliales, principalement impliquées dans des phénomènes passifs de filtration s'appuient essentiellement sur la glycolyse. Il en va de même pour le tubule distal ou le canal collecteur mais là, plus pour des raisons de faible disponibilité en dioxygène dans ces régions. Le tubule proximal et la branche ascendante large de l'anse de Henlé, du fait de leurs fortes demandes énergétiques, utilisent principalement une production aérobie par phosphorylation oxydative mitochondriale avec les acides gras comme substrat principal mais non exclusif <sup>69,115</sup>. La production énergétique de chaque segment est permise par la présence d'une machinerie adaptée. Ainsi les cellules glycolytiques possèdent un réseau mitochondrial réduit, fragmenté et une forte expression des enzymes glycolytiques. A l'inverse, les cellules oxydatives, notamment tubulaire proximales, possèdent une machinerie glycolytique réduite mais un réseau mitochondrial très développé et ramifié dont la bonne fonction est maintenue par un équilibre dynamique étroitement régulé entre biogénèse, dynamique mitochondriale (fusion, fission) et mitophagie <sup>69,114,115</sup>.



**Figure 7 : Représentation schématique des différentes voies du métabolisme bioénergétique cellulaire (eucaryote).**

A noter que seule la glycolyse suivie de fermentation lactique, est indépendante de la mitochondrie et de la présence de dioxygène.

Lors de la plupart des formes d'agressions, les cellules subissent un stress métabolique intense sous l'effet des modifications du micro-environnement notamment l'hypoxie tissulaire mais aussi d'autres facteurs (cytokines pro-inflammatoires ou PAMPs altérant la fonction mitochondriale) entraînant un blocage de la chaîne respiratoire. Ce stress métabolique va imposer le recours à une production énergétique reposant sur un métabolisme glycolytique anaérobie prédominant ou exclusif. Sans effet majeur sur les cellules glycolytiques en conditions basales, ce stress impose une réorientation (ou switch) métabolique majeure aux cellules oxydatives, dont les cellules épithéliales tubulaires proximales.

La tentative d'adaptation fait intervenir divers mécanismes dont la plupart n'ont pas d'effets immédiats, ce qui limite les capacités d'adaptation cellulaires à une agression aiguë. C'est dans cette optique qu'un pré-conditionnement permettant l'adaptation de l'appareil en amont peut théoriquement avoir un bénéfice. Plusieurs travaux ont montré le potentiel bénéfice de telles approches <sup>116-118</sup>. Un premier mécanisme, probablement le plus connu, repose sur le système HIF (Hypoxia inducible factor). En condition normale HIF-1 $\alpha$ , spontanément exprimé, est immédiatement hydroxylé par les prolylhydroxylases (PHD) permettant sa reconnaissance par l'ubiquitine ligase VHL (von-Hippel-Lindau) et son adressage au protéasome pour dégradation. Lors d'une hypoxie, l'activité des PHD est inhibée, induisant la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . Après dimérisation avec HIF-1 $\beta$ , il est transporté vers le noyau et agit sur des séquences régulatrices spécifiques (Hypoxia Response Element HRE) modulant l'expression des gènes cibles. Cette voie peut aussi être activée de manière indépendante de l'hypoxie par certains DAMPs/PAMPs/cytokines via une stimulation de la traduction, dépassant les capacités d'élimination par le protéasome. L'activation de ce système module l'expression d'un grand nombre de gènes. Notamment il induit l'expression de différentes enzymes clés de la glycolyse permettant d'adapter la machinerie bioénergétique <sup>57,69,115,119,120</sup>.

Un autre également de grande importance correspond à PGC-1 $\alpha$ . Celui-ci voit son expression étroitement régulée en contexte d'IRA avec une diminution d'expression initiale puis réactivation pendant la phase de récupération. Cette régulation est dépendante de nombreux facteurs notamment le système HIF mais aussi l'effet de certaines cytokines pro-inflammatoires par exemple. Il possède des fonctions multiples mais joue en particulier un rôle clé dans la stimulation de la biogénèse mitochondriale (notamment via l'expression des enzymes du métabolisme énergétique). La baisse de son expression participe à la réduction du pool mitochondrial mais favorise aussi l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles <sup>69,114,121</sup>.

Dans les cellules oxydatives, ce switch métabolique s'accompagne d'une réorganisation de l'appareil mitochondrial. Ainsi le réseau arborescent et dense basolatéral va se fragmenter, diminuer en volume et accumuler un certain nombre de mitochondries anormales (effacement des crêtes, gonflement) <sup>69,114,119,121,122</sup>. La réorganisation du réseau mitochondrial est secondaire à la survenue simultanée de plusieurs mécanismes à la fois adaptatifs et lésionnels. Certaines agressions (stress oxydatif, hypoxie) induisent des

dégâts mitochondriaux directs rendant les mitochondries potentiellement délétères (perte de potentiel membranaire, induction d'apoptose, production de ROS). Des mécanismes adaptatifs sont aussi mis en jeu pour tenter d'adapter cet appareil avec des effets parfois ambigus (réduction de la biogenèse empêchant le renouvellement mais aussi la "réparation" mitochondriale avec une place prépondérante de PGC-1 $\alpha$ , changement la dynamique mitochondriale au profit de la fission aboutissant à la fragmentation du réseau en lien avec l'augmentation de l'activité DRP1 et réduction de l'activité mitofusines/OPA1, mitophagie accrue réduisant le pool mais insuffisante pour éliminer toutes les mitochondries dysfonctionnelles produites)<sup>69,114,119,121</sup>.

Cette réorganisation complète du métabolisme énergétique et de l'appareil mitochondrial a pour objectif principal d'éviter le développement d'un déficit énergétique cellulaire et l'accumulation de mitochondries altérées condamnant la cellule à une perte fonctionnelle complète voire à la mort cellulaire. Au sein des cellules glycolytiques à l'état de base, les changements sont marginaux et l'adaptation est souvent bonne. Par contre, au sein des cellules oxydatives, l'adaptation est rapidement dépassée ne pouvant compenser la perte de production énergétique en raison d'une machinerie cellulaire inadaptée pour une glycolyse intensive et remanier efficacement l'importante machinerie mitochondriale. Ces cellules vont donc voir leur production énergétique s'effondrer induisant un déficit intracellulaire en ATP, mais aussi l'accumulation de précurseurs (acides gras non estérifiés) /métabolites terminaux (lactates) ou encore accumuler un grand nombre de mitochondries altérées aux effets délétères (libération cytochrome et déclenchement des phénomènes de mort cellulaires)<sup>69,114,115,123,124</sup>. Au-delà de permettre la survie cellulaire en cas d'adaptation efficace, la réorientation du métabolisme est désormais considérée comme un régulateur important des autres fonctions épithéliales (régulation des changements phénotypiques et de la différenciation, régulation de la prolifération via l'apport de précurseurs indispensables, acidification du milieu et augmentation de la résistance cellulaire) la plaçant comme un chef d'orchestre de la réponse épithéliale. Néanmoins, cette réorientation, même sans se retrouver dépassée, peut avoir des effets latéraux délétères (accumulation de précurseurs toxiques à l'images des acides gras non estérifiés, modification de la disponibilité en substrat de l'environnement modulant le phénotype des cellules avoisinantes notamment inflammatoires...)<sup>69,114,125,126</sup>.

Après cette phase d'adaptation, les cellules survivantes vont devoir être capables de retourner vers un profil métabolique normal nécessitant la reconstitution d'un appareil mitochondrial fonctionnel. C'est à ce stade que PGC-1 $\alpha$  jouerait un rôle majeur<sup>69,118,121</sup>. L'absence de réorientation, comme nous le verrons plus tard est associé à l'émission de signaux pro-fibrosant et la transition vers la MRC<sup>69,115,119</sup>.

- ***Une deuxième réponse épithéliale à l'agression correspond à une modification de l'état de différenciation.***

Cette réponse est mise en œuvre rapidement après l'agression, quelle que soit la nature de celle-ci. Elle touche l'épithélium de manière très inhomogène en fonction notamment du compartiment tissulaire, du

segment d'origine (principalement le tubule proximal) mais aussi entre les cellules au sein d'un même segment <sup>55,127,128</sup>. L'origine de ce changement de différenciation est secondaire à de multiples mécanismes certains actifs (signaux spécifiques induits par le stress type HIF/HSP, signaux environnementaux...) d'autres subis, comme le déficit énergétique lié à la réorientation métabolique <sup>55,69</sup>. Le changement de différenciation est souvent résumé à une dédifférenciation avec simple perte des caractéristiques épithéliales <sup>69</sup>. La réalité est plus complexe car ces cellules en acquièrent parfois aussi de nouvelles, originales, faisant de leur état plus un nouveau phénotype par transdifférenciation (« mixed cells ») qu'une simple dédifférenciation <sup>127</sup>.

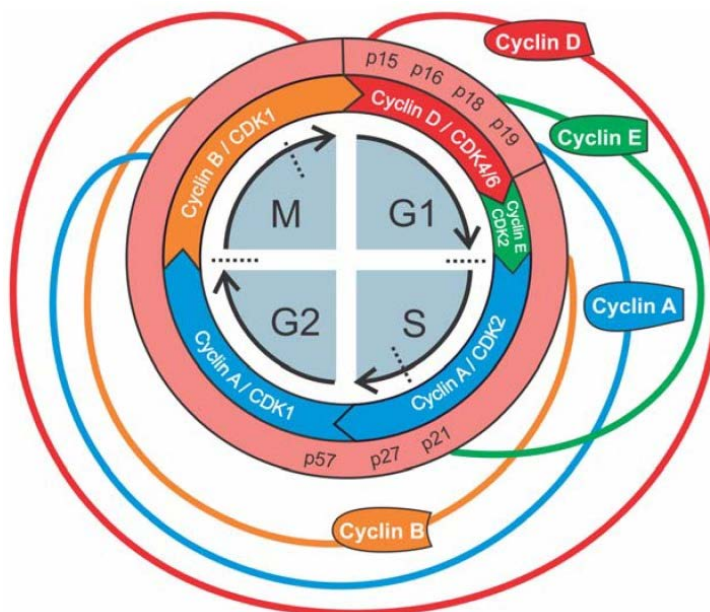
Ces changements cellulaires comprennent une perte de certaines caractéristiques notamment la perte des marqueurs épithéliaux traditionnels <sup>127,129</sup>, la disparition de la bordure en brosse et des villosités par fragmentation et régression <sup>55,58,100,111</sup>, la perte d'expression des transporteurs <sup>111,127</sup>, la perte de l'organisation cytosquelette et de la polarisation <sup>55,111,130</sup> ou encore la perte des propriétés d'adhérence intercellulaire et avec la membrane basale en lien avec des altérations d'expression des molécules d'adhérence et d'organisation cellulaire <sup>55,129-133</sup>. Ces anomalies, potentiellement bénéfiques (réduction demande énergétique notamment), sont à l'origine de changements morphologiques (perte bordure en brosse, morphologie arrondie, décollement intercellulaire et de la membrane basale, libération de cellules ou de débris dans la lumière tubulaire) et d'une perte de fonction (perte de l'effet barrière, perte des propriétés de réabsorption/sécrétion, décollement cellulaire et formation de cylindres épithéliaux). Cependant, ces pertes s'associent à l'acquisition de nouvelles propriétés avec une orientation variable suivant le contexte. A titre d'exemple, ces cellules vont pouvoir acquérir des propriétés phagocytaires via notamment l'expression du récepteur KIM1 <sup>127,134,135</sup> ou des propriétés pro-inflammatoires productrices de chimiokines et cytokines <sup>127,136</sup>. On citera encore les propriétés de prolifération et migration à l'image des cellules développementales <sup>127</sup> et bien d'autres. Il est important de noter que le nouveau phénotype obtenu n'est pas strictement homogène mais représente un continuum de variations possibles entre l'état de différenciation épithélial normal et différents pôles de transdifférenciation (phagocytaire, pro-inflammatoires...) <sup>127</sup>.

Cette modulation de l'état de différenciation permet donc une réponse épithéliale adaptée pour tenter de contrer au mieux les mécanismes lésionnels initiaux ou aggravant au prix d'une perte fonctionnelle. Là encore, lorsque l'atteinte est trop sévère ou étendue, la capacité d'adaptation est dépassée et ce mécanisme participe grandement à l'altération fonctionnelle.

- ***Un autre mécanisme d'adaptation épithéliale à l'agression correspond à l'arrêt du cycle cellulaire.***

La prolifération des cellules eucaryotes se fait via la progression dans un cycle divisible en plusieurs étapes successives (**Figure 8**). En conditions normales, la très large majorité des cellules notamment rénales sont quiescentes, en phase dite G0. Lors de l'initiation d'un cycle de prolifération, les cellules passent en phase G1 durant laquelle elles croissent et mettent en place la machinerie nécessaire pour la réplication de l'ADN.

Cette réplication est opérée durant la phase S. Une fois l'ADN correctement répliqué, la cellule rentre en phase G2 permettant la duplication des autres composants cellulaires. Une fois cela réalisé, elles entrent en phase M séparant le contenu nucléaire équitablement entre les deux cellules filles avant la séparation des deux cellules (appelée cytotéière). La transition entre les différentes phases est étroitement régulée par un système de contrôle dynamique permanent, mais qui peut être schématisé par la présence de "checkpoints" à la jonction des différentes étapes où le cycle peut être interrompu. On distingue classiquement cinq checkpoints : G0/G1, G1/S, G2/M, intra-S et intra-M. Le franchissement des checkpoints est principalement le fait de couples CDK (Cycline Dependent kinases) /Cyclines, capable de phosphoryler des effecteurs (Rb), autorisant l'activation du programme génique propre à chaque étape. Les CDK sont exprimés constitutivement mais ne s'activent qu'après liaison aux cyclines, dont l'expression, variable et étroitement régulée, conditionne la progression dans ce cycle. L'activité de ces couples est également régulée plus ou moins directement par des inhibiteurs (Cycline dependent Kinase Inhibitors : p21, p53...) pouvant bloquer le cycle, en cas de problème détecté par des "sensors" spécifiques. Ce blocage donne alors à la cellule le temps d'opérer les réparations nécessaires avant la reprise du cycle. En cas d'impossibilité de réparation, la cellule subit généralement un processus de mort cellulaire programmé <sup>137,138</sup>.



**Figure 8 : Représentation schématique du cycle cellulaire et de ses régulateurs.**

(Extrait de Moonen et al. 2018 <sup>137</sup>)

En condition basale, la prolifération de l'épithélium rénal est faible mais présente, notamment au niveau du tubule proximal, pour permettre le renouvellement cellulaire. Cette prolifération est par contre fortement induite après agression pour permettre la réparation/régénération tissulaire <sup>137</sup>. Lors de la phase initiale

d'une agression, la progression dans le cycle cellulaire est inhibée. Plusieurs signaux de stress cellulaires (lésions de l'ADN, stress inflammatoire/hypoxique/oxydatif) sont détectés par des sensors plus ou moins spécifiques (ATM ou Ataxia Telangiectasia Mutated par exemple pour les lésions de l'ADN). Ces sensors vont recruter des inhibiteurs du cycle tels la Checkpoint kinase 2, p53 ou P21 entraînant le blocage du cycle au niveau de plusieurs checkpoints notamment G1/S et G2/M<sup>137,139-143</sup>. Ce blocage adaptatif du cycle cellulaire aurait un rôle cytoprotecteur à court terme pour limiter la souffrance tissulaire initiale. En effet, la progression dans le cycle cellulaire est énergivore, consomme beaucoup de composants essentiels (acides aminés, bases ADN ...) et peut aboutir à des cellules anormales en cas de dégâts non réparés. En contexte d'agression avec induction de divers dégâts cellulaires et de carence en énergie voire en d'autres ressources, la poursuite de ce cycle aggraverait la souffrance cellulaire, la mort cellulaire et l'inflammation intra-rénale<sup>137,139-143</sup>. Cependant, la persistance du blocage est délétère avec apoptose, apparition d'un phénotype épithélial pro-inflammatoire et pro-fibrosant pouvant participer à l'aggravation secondaire des lésions et la réparation fautive<sup>137,144</sup>.

- ***Enfin, un dernier mécanisme adaptatif correspond aux processus de mort cellulaire***

La mort cellulaire est souvent à tort considérée comme le terme d'un dépassement des mécanismes adaptatifs. Même si elle représente en effet parfois l'aboutissement d'un échec de la réponse épithéliale à l'agression, elle correspond aussi à un processus contrôlé avec un rôle adaptatif propre à l'échelle tissulaire<sup>55,145</sup>. En effet, outre l'élimination cellulaire, ce processus peut avoir des rôles bénéfiques dans de nombreuses situations notamment le développement ou la réparation/régénération. Ainsi certaines formes de mort cellulaire permettent un turn-over épithélial, d'anticiper une mort cellulaire inévitable en évitant une destruction incontrôlée de la cellule très pourvoyeur d'inflammation, de limiter l'étendue de la souffrance tissulaire en réduisant les besoins par élimination de certaines cellules voire même d'induire des signaux stimulant la prolifération et la réparation tissulaire (prolifération, mobilité cellulaire). Ce n'est que lorsqu'ils surviennent de manière excessive ou via des mécanismes anormaux, notamment fortement pro-inflammatoires, qu'ils participent à la genèse des lésions, à l'aggravation de celles-ci et à l'altération fonctionnelle induite<sup>55,145,146</sup>. Dans le cadre des IRA, des événements de mort cellulaire sont observés dans la plupart des contextes, même s'ils ne sont pas toujours au premier plan comme le laisserait penser les dénominations histopathologiques. Ces phénomènes semblent jouer un rôle important dans la constitution des lésions et l'altération fonctionnelle induite<sup>55,145,147</sup>. Parfois leur organisation temporelle est décrite en vague successive à l'image de ce qui est décrit dans d'autres modèles de régénération/réparation<sup>148</sup>. Il est cependant important de noter que sur ce point, il existe des discordances entre ce que l'on observe en pathologie humaine et les modèles animaux, notamment une mort cellulaire fortement accrue dans les modèles murins<sup>55,103</sup>. Les événements observés en contexte d'IRA sont attribuables à divers mécanismes. Historiquement, ces événements ont longtemps été séparés en apoptose et nécrose. Cependant des avancées récentes ont permis d'identifier 12 types de mort cellulaires. On sépare classiquement l'apoptose, les

nécroses régulées (pyroptose, nécroptose, ferroptose...) et la nécrose passive, beaucoup de ces mécanismes semblant être mis en jeu à part variable dans l'IRA <sup>55,147,149,150</sup>.

*L'apoptose est le mécanisme le plus anciennement identifié et le mieux étudié dans l'IRA.* Ce processus de mort cellulaire est actif et nécessite la consommation d'énergie sous forme d'ATP. Il s'accompagne de la destruction organisée des structures cellulaires (dégradation ADN par DNase, fragmentation organelles, perte de polarité et organisation membranaires...) responsable de changements morphologiques (condensation nucléaire, encoches membranaires et bebbing). Il aboutit à une fragmentation contrôlée de la cellule en corps apoptotiques. Ces derniers, libérés dans l'environnement, sont rapidement éliminés par les phagocytes car porteurs de signaux de ciblage ("Eat me") <sup>55,145,147,151,152</sup>. Cette modalité de mort cellulaire contrôlée, a un profil peu inflammatoire en raison de l'absence de déversement du contenu cellulaire et des organelles dans le milieu environnant, expliquant les moindres effets délétères sur le tissu adjacent <sup>145,147,151-153</sup>. Elle joue également un rôle actif via la libération de certains médiateurs à effets paracrines qui permettent d'adapter le comportement des cellules environnantes. Suivant le contexte et l'environnement, les signaux émis peuvent induire la mort cellulaire, la prolifération ou faciliter la mobilité cellulaire nécessaire à la réparation <sup>145,151,152</sup>. L'apoptose est initiée dans l'IRA via les deux voies disponibles, intrinsèque et extrinsèque <sup>55,145,152</sup>. L'activation de l'apoptose par voie intrinsèque fait intervenir un ensemble de mécanismes initiateurs résultants d'une souffrance cellulaire (lésion de l'ADN génomique, stress oxydatif, déplétion modérée en ATP, altération mitochondriale...). Ces mécanismes agissent via la modulation directe ou indirecte (p53, GSK3 $\beta$ ) de la balance entre des facteurs pro (Bax, Bak) ou anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-XL...) de la superfamille BCL2. La perturbation de la balance est intégrée par la mitochondrie, organelle clé dans la régulation intrinsèque de l'apoptose. Ainsi, quand la balance pro-apoptotique bascule en faveur de l'induction d'une apoptose, il y a convergence de plusieurs mécanismes (assemblage d'un complexe de perméabilisation membranaire externe (MOMP) mitochondrial, dépolarisation membranaire, augmentation de l'activité des transporteurs) autorisant la libération de facteur pro-apoptotique notamment le cytochrome C. Celui-ci, après combinaison avec APAF1 dans le cytosol, lie l'une des caspases initiateurs intrinsèques (Caspase 9) <sup>55,145,147,151-154</sup>. L'activation de l'apoptose par voie extrinsèque est en lien avec la présence d'un ou plusieurs signaux inducteurs dans l'environnement de la cellule, soit portés par certaines cellules (FasL...) soit solubles (TNFa, TRAIL...). Ces ligands se fixent sur un récepteur spécifique appartenant à la famille des Death Receptor (DR : Fas/CD95, TNFR1, TRAILR12...). Les récepteurs activés par liaison se trimérisent permettant le recrutement, via le death domain intracellulaire, de protéines adaptatrices. Celles-ci lient alors directement les caspases initiateurs extrinsèques (Caspase 8/10) et permettant leur activation par auto-clivage. L'activation de ces récepteurs et la formation de ces complexes a également un effet modulateur sur la disponibilité de certains facteurs anti-apoptotiques (Bcl2) facilitant aussi l'activation de l'apoptose par voie intrinsèque <sup>55,145,147,151-153</sup>. Après initiation par de l'une des deux voies, les caspases initiateurs activées vont

cliver et activer des caspases effectrices (Caspase 3/7) qui vont activer les mécanismes terminaux impliqués dans l'apoptose (fragmentation de l'ADN...) <sup>55,145,147,151-153</sup>.

*Un autre groupe de mécanismes de mort cellulaire correspond aux nécroses régulées.* Ces entités sont de découverte plus récente <sup>152</sup> et correspondent à un ensemble de mécanismes régulés. Cependant ils génèrent une mort cellulaire avec rupture membranaire et libération du contenu intracellulaire et aussi de médiateurs (cytokines, lipides peroxydés...), les rendant extrêmement pro-inflammatoires <sup>146,149,155,156</sup>. Certains de ces mécanismes sont présents au cours des IRA et, bien qu'utilisés dans d'autres contextes (défense anti-infectieuse...), jouent un rôle aggravant sur les lésions et l'altération fonctionnelle <sup>146,148,149,155-161</sup>. A titre d'exemple on citera d'abord la pyroptose, dont l'implication est prouvée dans plusieurs types d'IRA (platine, Ischémie/reperfusion, toxique...). La mort par pyroptose résulte généralement de la détection de DAMPS ou PAMPS induisant l'assemblage de l'inflammasome épithélial et l'activation de la caspase 1. Celle-ci clive la Gasdermin D (GSDMD) permettant l'assemblage membranaire, formant une pore facilitant la sécrétion de cytokines (IL1b, IL18) mais aussi le déversement du contenu intra-cellulaire dans l'environnement à l'origine d'une inflammation majeure <sup>146,152,157-162</sup>. Un autre exemple correspond à la nécroptose dont l'implication est également prouvée dans de nombreuses causes d'IRA (Ischémie Reperfusion, Toxique) <sup>148,149</sup>. Celle-ci résulte de l'activation via des PAMPS ou des cytokines de RIPK1 qui active et se combine avec RIPK3. Ce complexe phosphoryle MLKL qui polymérise et vient là encore créer des pores dans la membrane plasmique avec les mêmes conséquences que précédemment <sup>148,149,152,156</sup>.

*Enfin un dernier mécanisme, dont l'existence pourrait être remise en cause à mesure que la régulation de la mort cellulaire est explorée, correspond à la nécrose non régulée.* Ce dernier mécanisme est considéré comme passif, principalement attribué à un déficit bioénergétique profond induisant une réduction importante de l'ATP disponible ou une destruction directe des membranes cellulaires. Ces événements enclenchent divers mécanismes aboutissant à la destruction de la cellule (influx de Na et d'eau suite à la réduction d'activité des Na-K-ATPase induisant un gonflement cellulaire aboutissant à une rupture membranaire, accumulation intracytosolique de calcium par dysfonction des Ca<sup>2+</sup>-ATPase et de l'effondrement du gradient électrochimique en sodium induisant l'activation de médiateurs cytotoxiques secondaires...). La cellule meurt alors avec rupture membranaire, libération du contenu des organelles dans le cytosol et du cytosol dans le milieu extracellulaire, rendant ce mécanisme-là encore fortement pro-inflammatoire <sup>55,147</sup>.

En réalité, le type de mort cellulaire correspond plus à un continuum qu'à des entités distinctes. Ainsi chaque événement de mort cellulaire correspond à un assemblage unique et variable suivant chaque cellule des différents mécanismes schématisés avec souvent un mécanisme dominant <sup>55,145,147,149,150,152</sup>. Ainsi il n'est pas rare d'observer plusieurs types de morts cellulaires dans un même organe, à un même moment, et après une même agression. La décision individuelle de mort cellulaire et le mécanisme mis en jeu sont dépendants de l'intégration par la cellule de divers signaux internes et environnementaux <sup>55,145-147,149,150,152</sup> avec une place centrale accordée au contenu intra-cellulaire en ATP, à la mitochondrie et donc à l'adaptation métabolique



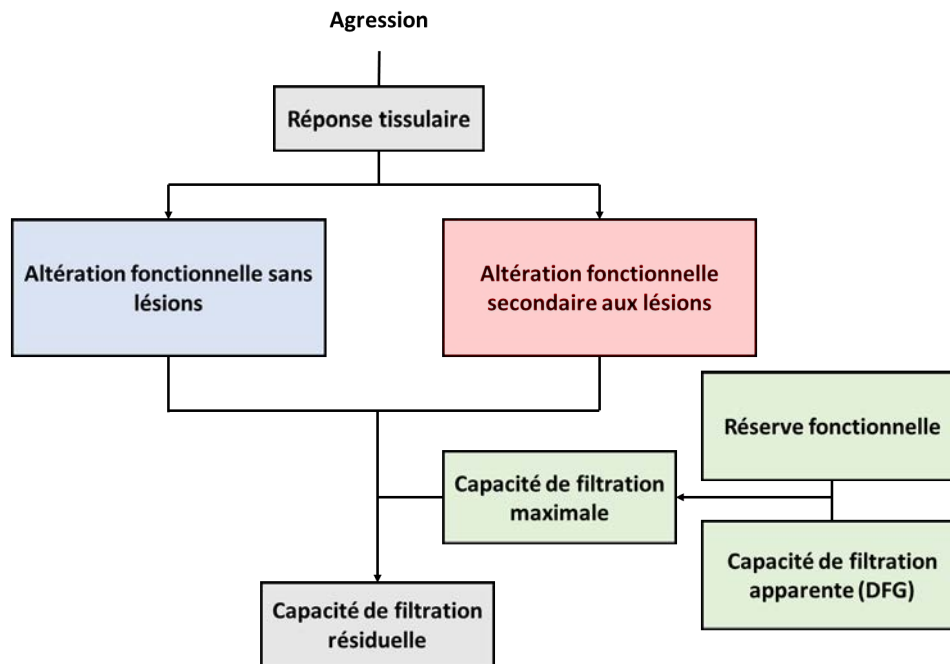
à l'agression<sup>55,147</sup>. Cette intégration fait intervenir divers systèmes de régulation (inducteurs, inhibiteurs et modulateurs) dont certains sont partagés par différents mécanismes<sup>55,146,147,149,152</sup>. La mort cellulaire programmée par apoptose pouvant être considérée comme un mécanisme d'adaptation tissulaire, dans une situation où la mort cellulaire est fortement probable. Cette mort cellulaire limiterait l'extension des dégâts lié à l'inflammation en évitant une mort cellulaire par nécrose mais pourrait aussi avoir des bénéfices latéraux sur la régénération. Les nécroses programmées résultent probablement d'une adaptation fautive via des systèmes habituellement impliqués dans la réponse inflammatoire physiologique (anti-tumorale, anti-infectieuse...) mais qui activés ici sont délétères. La nécrose passive, ultime catastrophe, serait rencontrée dans les situations où les autres mécanismes ne peuvent être mis en œuvre (cinétique, agression trop importante avec notamment déficit profond en ATP) aboutissant à une mort cellulaire extrêmement inflammatoire et délétère pour le tissu environnant.

La mort cellulaire aboutie à une désorganisation de l'épithélium avec notamment rupture de la barrière épithéliale et altération fonctionnelle, mais les dégâts peuvent être bien plus lourds en cas de mort cellulaire inflammatoire avec propagation de la mort cellulaire et induction d'un infiltrat inflammatoire jouant le rôle de mécanisme lésionnel aggravant.

**Au total**, l'ensemble de ces réponses épithéliales vont permettre une part d'adaptation au prix d'une perte de fonction et éventuellement de lésions fixées. L'adaptation métabolique est désormais considérée comme un mécanisme actif de régulation des autres processus adaptatifs et non pas une simple conséquence de l'agression. Au-delà de l'épithélium que nous avons détaillé, les autres populations cellulaires vont également répondre à l'agression en particulier l'endothélium ou les cellules inflammatoires résidentes ou circulantes recrutées. Les réponses des divers compartiments s'intriquent et s'influencent les unes les autres pour aboutir à une réponse tissulaire globale plus ou moins efficace pour s'adapter à ce stress tissulaire<sup>55</sup>. On remarquera que certains de ces mécanismes de réponse lorsqu'ils sont excessifs, inadaptés ou dépassés sont potentiellement à l'origine de nouveaux mécanismes lésionnels (inflammation, cylindres épithéliaux tubulaires, dysfonction endothéliale et aggravation de l'ischémie par phénomène microvasculaire...) jouant un rôle d'amplificateur de l'agression au-delà de l'agression initiale. C'est l'ensemble de ces dommages qui vont déterminer l'altération fonctionnelle comme nous allons le voir par la suite.

### **A.3. Apparition d'une altération fonctionnelle :**

L'apparition d'une altération fonctionnelle sert actuellement de base au diagnostic d'IRA, suivant les critères AKI KDIGO. Cependant une altération détectable de la fonction rénale n'est pas liée seulement à l'étendue et la sévérité des lésions tissulaires. Ainsi, l'altération de la fonction de filtration rénale, est déterminée par la balance entre les lésions induites, une éventuelle altération fonctionnelle adaptative sans lésions mais également par le terrain sur lequel survient ces lésions et notamment la capacité fonctionnelle maximale disponible avant l'agression. (**Figure 9**)



**Figure 9 : Représentation schématique des déterminant de l'altération fonctionnelle observable à l'occasion d'une IRA.**

La première source d'altération fonctionnelle est simplement en lien avec des phénomènes vasomoteurs secondaires à la mise en jeu des mécanismes adaptatifs ou les mécanismes lésionnels. Ils aboutissent à une réduction de la pression de filtration trans-glomérulaire, responsable d'une part de l'altération fonctionnelle potentiellement réversible sans séquelles <sup>163,164</sup>. Le rein en condition normale fait l'objet d'une autorégulation permettant de maintenir le DFG et le débit sanguin rénal dans une large fenêtre de pression artérielle. Cette autorégulation est classiquement attribuée à un réflexe myogénique des cellules musculaires lisses de l'artériole afférente et au feedback tubulo-glomérulaire. Ce dernier correspond à une adaptation du tonus vasculaire artériolaire afférent au débit tubulaire distal en chlorure de sodium : celui-ci augmente en cas de livraison sodée/chlorée distale excessive réduisant ainsi le DFG et donc la livraison sodée distale et inversement. Il implique notamment la libération d'ATP par la macula densa lors de l'augmentation de la livraison distale de NaCl. L'ATP induit directement via P2X1R, et indirectement via sa dégradation en adénosine et la liaison à A1, une vasoconstriction de l'artériole afférente au glomérule réduisant ainsi la pression de filtration et donc la filtration glomérulaire. D'autres mécanismes de régulation viennent moduler la pression de perfusion en jouant sur le différentiel de vasoconstriction entre artériole afférente et efférente (SRAA, catécholamines, système nerveux autonome...) <sup>16</sup>. Une part fonctionnelle est associée à la plupart des causes d'IRA, notamment quand le mécanisme d'hypoperfusion est impliqué (initial ou amplification). L'autorégulation et les mécanismes modulateurs de réponse au stress sont alors mise en œuvre mais se

retrouvent dépassés ne parvenant pas à prévenir l'effondrement de la pression de filtration glomérulaire<sup>8,16,56</sup>. Ce dépassement de l'autorégulation peut être favorisé par une dysfonction de l'autorégulation liée à une souffrance directe de l'appareil artériolaire péri-glomérulaire, de certains éléments du terrain (âge, MRC) ou de certains traitements (IEC, AINS...) <sup>16,56</sup>. Le rétrocontrôle tubulo-glomérulaire, peut également jouer un rôle supplémentaire en cas d'altération fonctionnelle tubulaire. Dans ces situations, la réabsorption tubulaire proximale de sodium et de chlore est réduite induisant une augmentation de leur livraison distale activant la libération d'ATP, et donc une vasoconstriction de l'artériole afférente (activation de la macula densa) avec réduction de la pression de filtration et donc du DFG. Ce mécanisme induit donc une altération réversible de la fonction de filtration et aurait un intérêt de protection tubulaire en réduisant leur consommation énergétique liée à la réabsorption <sup>16,56,111,164</sup>. De nombreuses tentatives thérapeutiques ont été menées pour reverser cette part fonctionnelle (dopamine, inhibiteur de l'endothéline...) sans véritable bénéfice prouvé en raison de la multiplicité des mécanismes en jeux.

La deuxième part de l'altération fonctionnelle provient directement des lésions tissulaires. Plusieurs mécanismes peuvent concourir à l'altération fonctionnelle. On peut définir schématiquement :

- L'altération de la pression de perfusion glomérulaire secondaire à divers facteurs (œdème tissulaire, infiltrat inflammatoire, obstruction artérielle ou capillaire glomérulaire, dysfonction endothéliale...) <sup>16</sup>.
- Augmentation de la pression urinaire (obstruction tubulaire, inflammation et œdème tissulaire) <sup>16,100</sup>.
- Destruction du filtre glomérulaire avec moindre perméabilité de la barrière : prolifération extra-capillaire, dysfonction endothéliale... <sup>16</sup>
- Réabsorption trans-tubulaire d'urines non sélectives : rétrodiffusion sur épithélium tubulaire lésé avec perte liaisons intercellulaires, perte polarisation cellulaire (et redistribution transporteurs) ou décollement cellulaire avec mise à nue de la membrane basale tubulaire (dédifférenciation ou mort cellulaire) <sup>16,100,131</sup>.

L'ampleur de cette part de l'altération est dépendante de la sévérité des lésions, de leur étendue et du type de lésions avec une place prépondérante des lésions tubulaires <sup>113</sup>. Celle-ci est non immédiatement réversible et implique des phénomènes de réparation et régénération avant une reprise de fonction normale.

La perte fonctionnelle va se confronter à la capacité maximale de filtration disponible du patient pour déterminer l'apparition d'une IRA détectable. **(Figure 10a)**

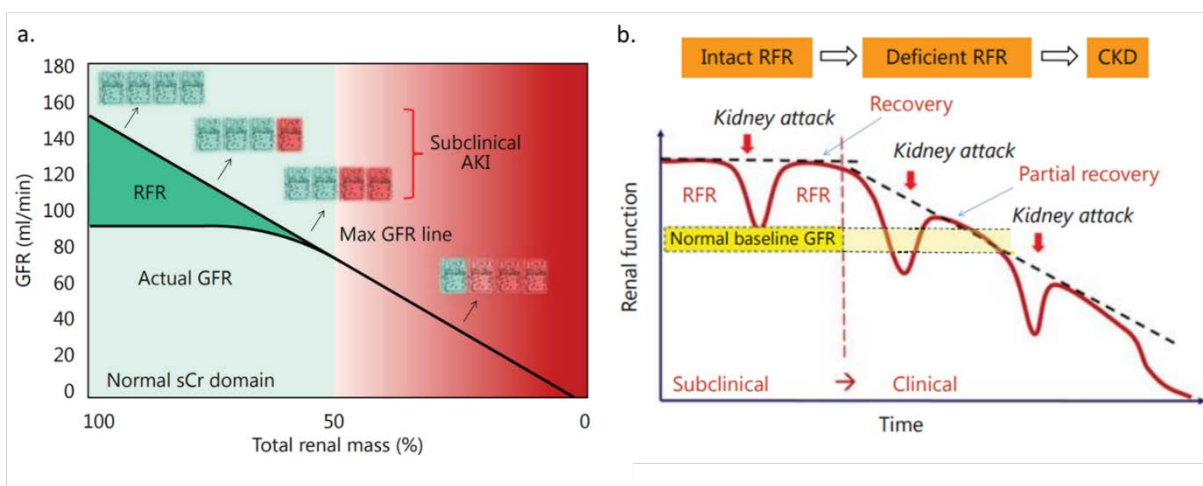
La capacité maximale de filtration disponible est la somme de la fonction de filtration rénale apparente initiale (DFG) et de la réserve fonctionnelle disponible. Le concept de capacité maximale de filtration et de réserve fonctionnelle rénale correspond au fait que, en conditions basales physiologiques, le rein n'utilise

pas son plein potentiel fonctionnel de filtration avec persistance d'une réserve non apparente qui peut être mobilisée sous l'effet de stimulations spécifiques. Bien que non nécessaire en conditions basales, cette réserve permet l'adaptation à des situations spécifiques en physiologie (grossesse, apports alimentaires augmentés...) et pathologique (maintien d'une fonction en contexte de lésions rénales) <sup>165,166</sup>. Il a été décrit pour la première fois en 1983 par Bosch et al. <sup>167</sup>, quand ils ont observé une augmentation du DFG mesurée par technique de référence après une épreuve de charge orale en protéines. Par la suite d'autres situations de stress physiologiques ou pathologiques ont été associées à la réquisition de cette réserve notamment la grossesse <sup>165,166,168,169</sup>. Ce potentiel fonctionnel "dormant" en conditions basales physiologiques, est lié à la présence dans le rein, parmi les unités fonctionnelles physiologiques ou néphrons (environ 1,000,000 - 1,500,000 par rein à la naissance <sup>16,170,171</sup>) qui le composent, d'une part d'un recrutement seulement partiel à un instant donné et d'autre part d'une filtration moyenne sous-maximale de chaque unité fonctionnelle par des mécanismes physiologique régulant la pression hydrostatique capillaire glomérulaire <sup>166</sup>. Quand cela est nécessaire, il est possible de recruter la masse néphronique habituellement non fonctionnelle (recrutement spatial) mais également d'augmenter la filtration moyenne de chaque unité (recrutement fonctionnel) <sup>166</sup>. Les mécanismes sont encore incomplètement compris et probablement différents en fonction des situations <sup>165,166</sup>. En condition d'adaptation physiologique au stress, ils feraient intervenir une réduction des résistances vasculaires intra-rénales par vasodilatation touchant notamment les artérioles glomérulaires à la fois afférentes et efférentes. Cela entraînerait une augmentation du lit vasculaire rénal et donc principalement le nombre de néphron recrutés sans modification de la fraction filtrée. En conditions pathologiques pourrait s'ajouter l'augmentation de la filtration de chaque sous unité par modulation directe de la pression hydrostatique capillaire glomérulaire soit par effet direct d'augmentation de la pression de perfusion soit par déséquilibre de vasodilatation entre artériole afférente et efférentes. Plusieurs médiateurs pourraient être impliqués (NO, prostaglandines, dopamine, glucagon, Enzyme de conversion...) sans qu'un schéma de régulation clair ne soit pour l'instant identifié <sup>165-167,172</sup>. Cette réserve est mesurable par détermination de la fonction de filtration rénale avant et après épreuve de stress (principalement par une charge protéique ou en acides aminés ou dopamine) mais ce type de mesure n'est pas compatible avec le contexte aigu <sup>165-167,169,173</sup>. D'autres méthodes de mesure non invasives non encore validées pourraient permettre d'évaluer cette réserve fonctionnelle comme par exemple la mesure de l'index de résistance intra-rénal par échographie <sup>174</sup>.

Cette réserve fonctionnelle peut être réduite en conditions basales surtout par diminution de la fonction de filtration rénale maximale. (**Figure 10b**) Ainsi sous l'effet de divers facteurs tels l'âge <sup>165,166,169,175</sup>, la réduction néphronique congénitale ou acquise <sup>169,176,177</sup> ou surtout l'existence d'une maladie rénale chronique <sup>165,166,178</sup>. Dans une moindre mesure celle-ci peut également être partiellement utilisée dans certaines situation physiologique ou pathologique induisant une hyperfiltration telle la grossesse <sup>165,166,168</sup>, les apports hydrosodés ou protéiques importants <sup>165,166</sup> ou encore certaines néphropathies surtout à leur phase initiale

(néphropathies diabétiques, néphroangiosclérose) <sup>165,166,169</sup>. A l'extrême, celle-ci peut être complètement consommée, ce qui s'observe notamment en cas d'insuffisance rénale chronique <sup>165,178</sup>.

Lors d'une IRA, c'est d'abord cette réserve fonctionnelle qui va se réduire entraînant une diminution de la fonction de filtration rénale maximale sans réduction observable du DFG. On parle d'IRA infracliniques qui ne sont malheureusement pas détectables par les critères KDIGO. Ce n'est que lorsque cette réserve rénale est complètement consommée que l'IRA devient apparente <sup>165,166</sup>. Ainsi, schématiquement, chez un sujet jeune en bonne santé, on estime qu'une agression induisant des lésions sévères touchant au moins 50% de la masse néphronique totale, est nécessaire pour induire une altération fonctionnelle détectable par les critères AKI KDIGO <sup>165,166</sup>. Dans ces situations où la réserve fonctionnelle est réduite voire absente, la capacité maximale de filtration (DFG max) est proche de la fonction de filtration basale (DFG basal) limitant les capacités d'adaptation à une agression induisant une réduction adaptative ou lésionnelle de la fonction de filtration. Dans ces situations, une agression plus modérée suffira à induire une altération fonctionnelle détectable par ces mêmes critères KDIGO <sup>165,166</sup>.



**Figure 10 : IRA et réserve fonctionnelle rénale. a.** Altération apparente du DFG en fonction de la sévérité de l'IRA chez un patient avec réserve fonctionnelle rénale normale. **b.** Altération apparente du DFG en contexte d'IRA en fonction de la réserve fonctionnelle rénale existante et concept de cicatrice fonctionnelle.

(Extrait de Sharma et al. 2014 <sup>165</sup>)

#### A.4. La réparation, séquelles et transition IRA-MRC :

Dans les suites d'une agression, lorsque les mécanismes lésionnels initiaux et aggravant ont cessé, le tissu rénal va amorcer une phase de récupération tissulaire qui concerne les différents compartiments et types cellulaires. Nous focaliserons là encore notre exposé sur l'épithélium tubulaire, notamment tubulaire

proximal, car principalement étudié dans notre travail et jouant un rôle majeur dans les séquelles post-IRA<sup>55,179</sup>. Cette phase de récupération associe des phénomènes de réparation cellulaire, de régénération tissulaire et de cicatrisation<sup>180,181</sup>. Seule la dernière modalité, dite “inadaptée”, est pourvoyeuse de séquelles.

### *La réparation cellulaire*

La réparation cellulaire correspond à la récupération à l'échelle d'une cellule d'un phénotype normal sans prolifération ou remplacement cellulaire. La cellule, profitant de la disparition des mécanismes lésionnels, va éteindre les voies de réponses au stress ce qui va permettre de stopper les mécanismes actifs précédemment détaillés. On considère que le simple arrêt de ses cascades de signalisation permet de réactiver, passivement, le programme habituel associé à l'état de différenciation de la cellule.

A cette occasion, la cellule va d'abord réactiver son métabolisme énergétique aérobie habituel. Pour cela, la cellule va reconstituer un appareil mitochondrial fonctionnel via l'activation massive de la biogénèse mitochondriale, sous la dépendance principale de PGC1 $\alpha$ , et une rééquilibration de la balance fusion/fission. Une fois cette machinerie disponible, la cellule va réassurer une production énergétique adaptée via un métabolisme oxydatif notamment la  $\beta$ -oxydation des acides gras. De manière concomitante, l'activité glycolytique de la cellule se réduit secondairement à l'arrêt de l'expression des enzymes et régulateurs clés, induits pas l'agression (HIF1 $\alpha$ , AMPK...). La récupération d'une homéostasie énergétique normale est un prérequis indispensable aux autres avènements énergivores de la phase de récupération<sup>55,69,118,182</sup>. L'amélioration de la disponibilité énergétique et la réactivation du programme cellulaire habituel, va permettre à celle-ci de réorganiser son cytosquelette ce qui permet le retour à une morphologie et à une organisation cellulaire normale notamment la polarisation et la reconstitution de la bordure en brosse apicale<sup>55</sup>. La cellule va également réactiver l'expression des marqueurs de différenciation à l'image de certains transporteurs ou des molécules d'adhérences permettant la ré-acquisition des propriétés épithéliales habituelles (effet barrière, réabsorption...) <sup>55,129,131</sup>.

### *La régénération épithéliale*

La récupération va également faire intervenir une régénération épithéliale. Elle va permettre, après une période de détersion initiale (assurée par l'épithélium et certaines cellules immunitaires notamment les macrophages), le remplacement des cellules épithéliales perdues. Cette régénération va s'appuyer sur les cellules épithéliales résiduelles qui vont se différencier, proliférer, migrer avant de se redifférencier de manière habituelle reconstituant un épithélium fonctionnel<sup>55,183-185</sup>. Ce phénomène fait intervenir divers mécanismes moléculaires encore en cours d'élucidation. A titre d'exemple, on pourra citer l'EGF (Epithelial growth factor) qui par voie paracrine et autocrine permet l'engagement des cellules épithéliales dans ce processus<sup>55,144</sup>. Agir sur ces voies pour optimiser cette régénération représente une piste thérapeutique intéressante<sup>186</sup>.

## La cicatrisation

Cependant, au-delà de ses mécanismes permettant une restauration fonctionnelle totale, la récupération peut faire intervenir un phénomène de cicatrisation générateur de séquelles. Contrairement à l'idée habituelle, la réparation complète avec restitution *ad integrum* est rare et ces séquelles sont quasiment toujours présentes notamment en cas d'agression avec IRA détectable<sup>6,24,187</sup>. Ce mécanisme de réparation permet certes une résolution des lésions, prévenant une aggravation supplémentaire, mais au prix d'une absence de restauration de la structure et la fonction tissulaire constituant une véritable "cicatrice rénale"<sup>6,24,181,187,188</sup>. Cette cicatrice correspond à l'apparition d'une fibrose tubulo-interstitielle associée à une destruction de l'architecture tissulaire habituelle à l'image de la raréfaction capillaire ou l'atrophie tubulaire<sup>181,188</sup>. Elle est associée à l'altération fonctionnelle à long terme, soit sous la forme d'une réduction du DFG, soit sous la forme d'une simple amputation de la réserve fonctionnelle<sup>24,181</sup>. Même si elles ne sont pas toujours visibles par les techniques habituelles, elles amputent la capacité maximale de filtration et peuvent aboutir au développement ultérieur d'une maladie rénale chronique<sup>34,47,48</sup>.

L'activation de ce mécanisme de récupération fautif, est de déterminisme complexe. Elle dépend à la fois du terrain, des caractéristiques de l'agression (lésions sévères ou agressions répétées/persistantes, cause) ou encore des interventions thérapeutiques mises en place<sup>179,181,187</sup>. Au niveau moléculaire, les mécanismes menant à cette cicatrisation fautive sont encore mal compris et font l'objet d'une recherche intensive ces dernières années en raison du bénéfice thérapeutique potentiel. Le premier moteur décrit est la persistance d'anomalies épithéliales de diverses natures qui sont probablement intriquées<sup>55,181,188</sup>. La première décrite correspond à la persistance d'une dysfonction mitochondriale avec déficit de phosphorylation oxydative et de  $\beta$ -oxydation et glycolyse persistante. Comme nous l'avons détaillé plus haut, il y aurait un rôle essentiel pour un défaut de réactivation de PGC1 $\alpha$  après cessation des mécanismes lésionnels<sup>69,118,181,182,189</sup>. D'autres anomalies sont décrites, dont le blocage persistant du cycle cellulaire en phase G2/M<sup>144,181,190</sup> ou encore l'incapacité des cellules à se re-différencier, dans un contexte de sénescence<sup>191</sup>. La présence et/ou la persistance d'une inflammation intra-parenchymateuse favorise également le développement d'une fibrose<sup>55,181,188</sup>. Cet infiltrat persistant peut être le fruit de la présence excessive ou la persistance de signaux épithéliaux pro-inflammatoires et chémoattractants. Une population particulièrement étudiée correspond aux macrophages de sous type M2 permettant certes la résolution de l'inflammation mais au prix du relargage de facteurs pro fibrosant. Leur présence en excès ou persistante semble jouer un rôle clé dans l'initiation de cette transition vers la fibrose<sup>92,192,193</sup>.

L'ensemble de ces populations cellulaires anormales produisent des facteurs pro-fibrosant dont le plus connu est probablement TGF- $\beta$ <sup>55,92,144,181,188</sup>. Ces facteurs pro-fibrosants vont permettre le recrutement par action paracrine des péricytes, leur différenciation en myofibroblastes et leur activation<sup>194-197</sup>. A titre d'exemple, le TGF- $\beta$  est sécrété notamment par les cellules épithéliales stressées ou inflammatoires activées, notamment les macrophages M2. Le TGF- $\beta$  sécrété est complexé (Latent associated protein LAP, Latent TGF- $\beta$  binding

proteine LTBP) sous forme inactive dans le domaine extracellulaire. Sous l'effet de certains facteurs, il est libéré permettant une action paracrine sur des récepteurs spécifiques (TbRI/II) notamment présent sur les péricytes et les myofibroblastes. Sa liaison à ce récepteur active une cascade de transduction intra-cellulaire impliquant les protéines Smads permettant l'activation de l'expression de gènes cibles divers notamment impliqués dans la fibrose<sup>195-197</sup>. Ces myofibroblastes activés vont alors sécréter massivement de la matrice extra-cellulaire collagénique et en limiter la dégradation. L'accumulation de cette matrice désorganise le tissu formant la cicatrice fibreuse tubulo-interstielle<sup>194-197</sup>.

Au-delà de l'accumulation de matrice, cette fibrose va aussi s'accompagner d'une désorganisation tissulaire à l'image d'une raréfaction capillaire péritubulaire. Celle-ci va fragiliser le lit vasculaire rénal à l'origine d'une hypoxie chronique, ou du moins d'une plus grande susceptibilité à ce type d'agression. Cette raréfaction est secondaire à divers mécanismes notamment l'incapacité à obtenir une réparation complète de l'endothélium agressé en lien avec le potentiel prolifératif réduit de ces cellules la perte de soutien des péricytes voire à un encombrement spatial par la matrice extracellulaire<sup>55,80,81,180,181,188,198</sup>. De la même manière, la fibrose s'accompagne d'autres anomalies telle l'atrophie tubulaire ou la glomérulosclérose que nous ne détaillerons pas ici<sup>181</sup>.

## **B. Régulation de l'adaptation à l'agression et de la réparation : Une place pour HNF-1β ?**

Comme nous l'avons vu plus haut, même si quelques régulateurs de la réponse à l'IRA sont identifiés, ils n'expliquent pas l'ensemble des anomalies observées. Dans cette optique le facteur de transcription HNF-1β correspond à un bon candidat. Un tel rôle permettrait, d'une part d'en faire une cible potentielle dans le contexte de l'IRA générale, mais d'autre part de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie liée à des anomalies de son gène.

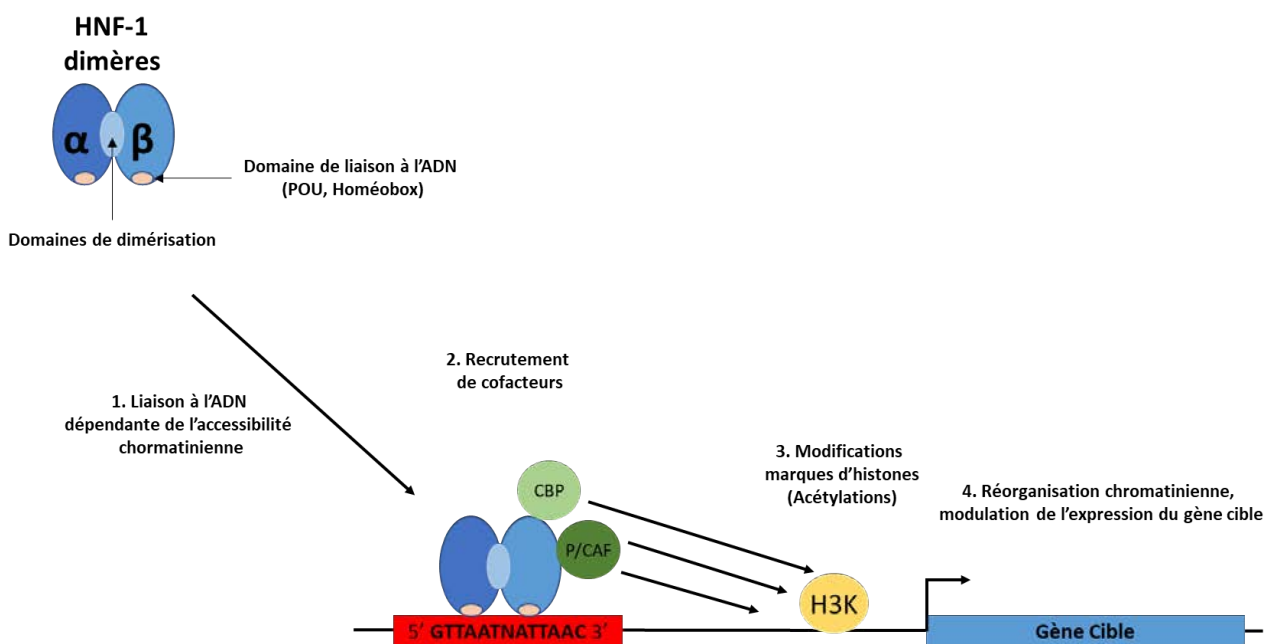
### **B.1 Description générale :**

HNF-1β (Hepatocyte Nuclear Factor-1β, aussi nommé vHNF1/TCF2/LFB3), est un facteur de transcription, appartenant au groupe HNF au sein de la grande famille des homéobox protéines. Au sein de ce groupe, HNF-1β est particulièrement proche structurellement de HNF-1α (Hepatocyte Nuclear Factor-1α, aussi appelé HNF1 ou LFB1), avec lequel il partage de nombreuses cibles<sup>199,200</sup>. HNF-1β est codé par un gène composé de 9 exons et 8 introns, très étendu sur le génome (55-58 kb), situé chez *Homo sapiens* sur le chromosome 17 et chez *Mus musculus* sur le chromosome 11<sup>201,202</sup>. Ce facteur de transcription, identifié initialement au sein d'un tissu tumoral hépatique<sup>203,204</sup>, est physiologiquement exprimé dans de nombreux épithélium à structure tubulaire au sein de différents organes (foie, rein, voies urinaires, pancréas...) dès les stades précoces du



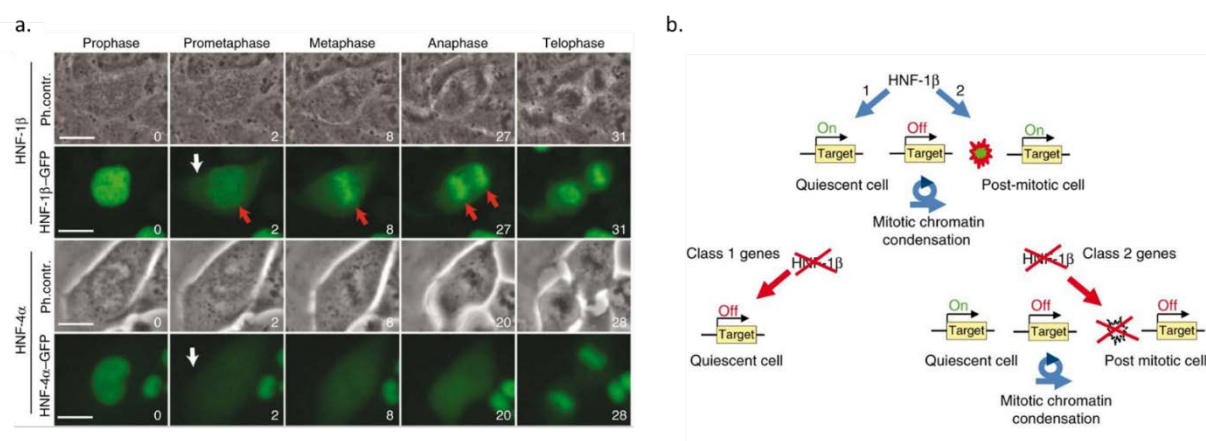
développement (E6.5) avec une persistance dans certaines structures en post-développementales<sup>205–207</sup>. L'expression de HNF-1 $\beta$  est anormale dans de nombreux tissus tumoraux, avec dans certains un rôle pro-oncogène identifié<sup>208–213</sup>. HNF-1 $\beta$  module directement l'expression de nombreux gènes cibles, dont certains (HNF-4 $\alpha$ , lncRNA codant pour le cluster miR-200b/miR-200a/miR-429, *Ppargc1a* codant pour PGC-1 $\alpha$ ) agissent eux-mêmes sur des cibles géniques secondaires. Ainsi HNF-1 $\beta$  se retrouve à la tête d'un vaste réseau transcriptionnel, lui conférant une fonction centrale dans de nombreux processus biologiques<sup>214,215</sup>. HNF-1 $\beta$  agit via la formation d'homodimères ou d'hétérodimères avec HNF-1 $\alpha$ <sup>199</sup> permettant sa liaison à l'ADN, via les domaines homéobox (HD) et HNF, spécifiquement sur une séquence cible semi-palindromique riche en TA (5'GTTAATNATTAAC3') présente dans les régions promotrice ou régulatrices du gène cible<sup>203,216</sup>.

Une fois fixé, HNF1 $\beta$  va jouer le rôle d'une "docking protein", via sa région trans-activatrice COOH terminale, permettant le recrutement de cofacteurs qui vont moduler la transcription et assurer son effet<sup>216–218</sup>. Le recrutement de ces cofacteurs est déterminé par leur expression, leur nucléarisation mais aussi l'architecture de la région chromatinienne de voisinage. Ces cofacteurs, comme CBP (CREB Binding Protein) et P/CAF (P300/CBP associated factor), agissent notamment en modifiant les marques d'histones des promoteurs/régulateurs. Ce mécanisme indirect fournit une explication aux effets activateurs ou inhibiteurs de cette protéine, observés en fonction des gènes cibles au sein d'une même cellule ou pour un même gène entre différents types cellulaires ou différents contextes<sup>216–218</sup>. A titre d'exemple, au sein de l'épithélium rénal adulte, HNF-1 $\beta$  active l'expression de gènes cibles comme *Cdh16*<sup>219</sup>, *Pkhd1*<sup>216</sup>, *Ppargc1a*<sup>214</sup>, *Pcsk9*<sup>220</sup>, ou plus rarement à un effet inhibiteur, par exemple sur les gènes *Socs3*<sup>217</sup> et *Twist2*<sup>221</sup>.



**Figure 11: Représentation schématique des mécanismes de régulation d'un gène cible par HNF-1 $\beta$  : extrapolation à partir de l'exemple *Pkhd1*. (Inspiré de Hiesberger et al 2005<sup>216</sup>).**

*In vivo*, HNF-1 $\beta$  semble exercer ses effets de deux manières différentes. Pour certains gènes, HNF-1 $\beta$  régule leur expression indépendamment du contexte. C'est par exemple le cas du gène *Umod* dans la lignée mIMCD3 murine. Mais pour d'autres gènes cibles, HNF1 $\beta$  jouerait un rôle de « Book Marker » mitotique, ne déterminant pas leur expression basale, hors prolifération, mais permettant de maintenir celle-ci active en contexte de prolifération. En restant fixé sur la chromatine condensée pendant la mitose, il permettrait d'éviter l'apparition de marques d'hétéro-chromatine au niveau de ces gènes cibles et ainsi de restaurer rapidement leur activité transcriptionnelle en post-mitose. (**Figure 12**) Cela a été démontré après une agression rénale aiguë (ischémie-reperfusion) mais pourrait également jouer un rôle au cours du développement, période de prolifération cellulaire intense. Un exemple de gène avec ce mode de régulation correspond à *Pkhd1* dans cette même lignée <sup>222-224</sup>.



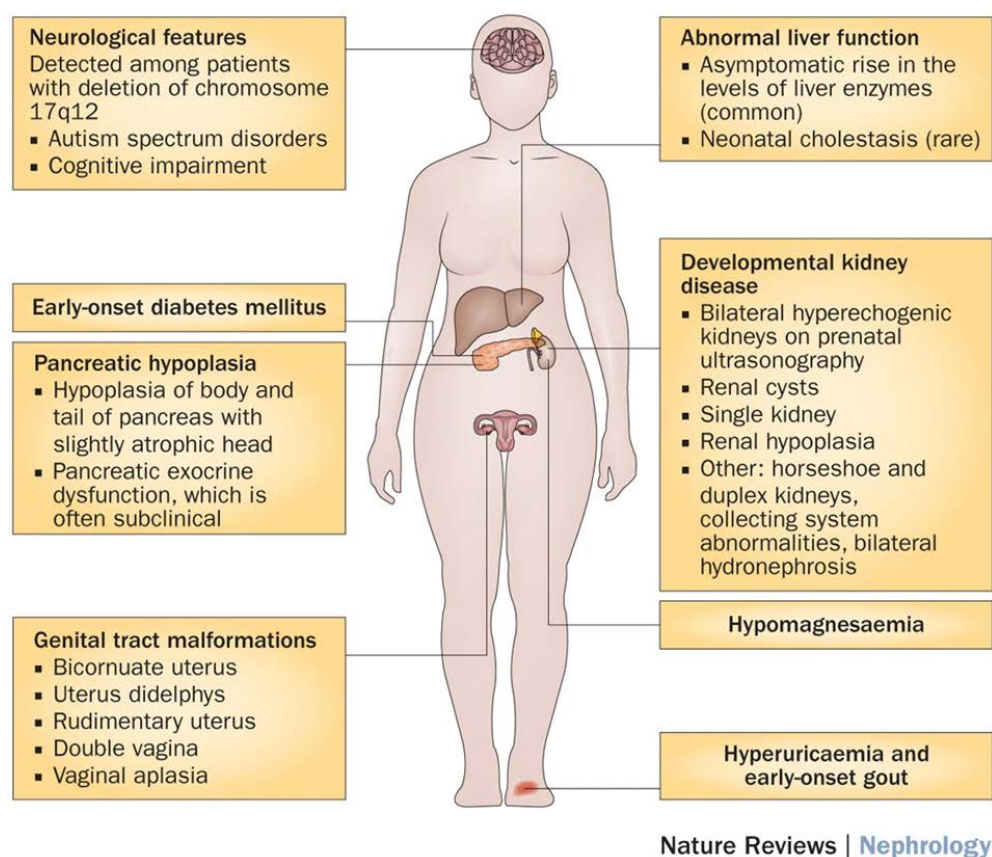
**Figure 12 : « Bookmarking » et régulation des cibles d'HNF1b.** a. Image en microscopie à fluorescence de cellules mIMCD3 exprimant une protéine de fusion fluorescente (GFP, HNF-1 $\beta$  ou HNF-4 $\alpha$ ) au cours de la mitose. b. Concept de « Bookmarking » et séparation des deux groupes de gènes cibles en fonction de ce mode de régulation. (Extrait de Verdeguer et al. 2010 <sup>222</sup>)

Le contrôle qu'il exerce sur ses diverses cibles lui confère de nombreux rôles biologiques, au cours <sup>206,222,225-228</sup>) et après le développement embryonnaire (<sup>214,220-222,229-231</sup>).

## B.2. Maladie liée aux anomalies du gène HNF1b :

Les anomalies du gène HNF1B sont responsables, chez l'homme, d'une maladie autosomique dominante, à pénétrance incomplète et à présentation phénotypique variable, caractérisée par une extrême hétérogénéité phénotypique <sup>232</sup>.

La prévalence exacte de cette maladie est mal connue mais est estimée entre 1/50.000 à 1/80.000 habitants avec un sexe-ratio voisin de 1<sup>233</sup>. Cette maladie multi-viscérale à présentation phénotypique variable se manifeste principalement par une atteinte uro-néphrologique, d'âge de révélation variable, à laquelle peut s'associer des atteintes extra-rénales (diabète type MODY 5 ; anomalies chroniques des tests hépatiques ; malformation du tractus génital...). (**Figure 13**) Les phénotypes ressemblent par certains aspects à ceux des cytopathies mitochondriales<sup>234</sup>.

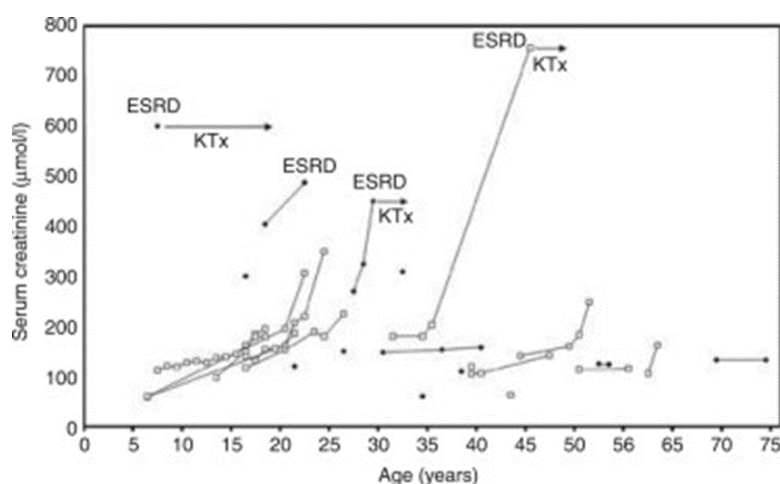


**Figure 13 : Représentation schématique des atteintes rénales et extra-rénales observées chez les patients porteurs d'une anomalie du gène HNF1b.**

(Extrait de Clissold et al. 2015<sup>232</sup>)

L'atteinte uro-néphrologique est la plus fréquente (90-95%) et est souvent au premier plan. Elle peut se révéler dès la période pré-natale par des anomalies échographiques notamment sous la forme de rein hyperéchogènes dont elle est la principale cause génétique, ou alors d'autres anomalies morphologiques diverses du tractus urinaires (agénésie rénale, hypoplasie rénale, de duplicité uretérale...) <sup>232,235</sup>. Mais ces anomalies sont souvent découvertes en période post-natale. Les anomalies associent à part variables des anomalies morphologiques avec notamment des kystes, une insuffisance rénale chronique et des stigmates

de dysfonction tubulaire. Les anomalies morphologiques sont quasi systématiques et peuvent prendre des aspects variées (dysplasie multikystique, hypoplasie, rein unique, rein en fer à cheval, duplicité urétérale, syndrome de la jonction pyelo-urétérale) mais la forme la plus classique correspond à la présence de kystes corticaux multiples avec des reins de taille normale<sup>232,236-240</sup>. L'insuffisance rénale chronique, présente possiblement de manière indépendante des anomalies morphologiques, est extrêmement variable en intensité avec une augmentation de la prévalence avec l'âge<sup>232,236</sup>. Le tableau est celui d'une insuffisance rénale de profil tubulo-interstitiel (protéinurie de faible débit ou absente, pas hématurie, HTA généralement absente, stigmates de tubulopathie associés). Les anomalies histologiques sont rarement documentées mais associent de manière variable différents éléments non spécifiques, notamment une fibrose tubulo-interstitielle avec un éventuel contingent inflammatoire et une atrophie tubulaire. La détérioration de la fonction rénale, indépendante de l'évolution des anomalies morphologiques en particulier des kystes, est généralement lentement progressive (- 2-3mL/min/1.73m<sup>2</sup>/an dans les cohortes adultes, - 0.3-0.4 mL/min/1.73m<sup>2</sup>/an dans les cohortes pédiatriques)<sup>236,241</sup>. Certains patients présentent, avec parfois un facteur déclenchant identifiable, des aggravations brutales et irréversibles de leur fonction rénale, qui les précipitent en dialyse. **(Figure 14)** Ces profils évolutifs, différents des autres maladies kystiques suggèrent d'une part un mécanisme de progression de l'insuffisance rénale indépendant de celui déterminant les anomalies morphologiques mais aussi une réponse inadaptée aux agressions<sup>236</sup>.



**Figure 14 : Evolution de la fonction rénale en fonction du temps chez des patients adultes porteurs d'une anomalie du gène *HNF1b*.** (Extrait de Faguer et al. 2011<sup>236</sup>)

Les stigmates de tubulopathie sont fréquents et prennent des aspects variables là encore. La plus fréquente de cette anomalie est l'hypomagnésémie retrouvée dans 20-70% des patients, avec une apparition progressive avec l'âge<sup>230,240,242</sup>. L'hypomagnésémie est souvent asymptomatique mais peut être responsable de complications plus ou moins sévères : neurologiques (asthénie, nervosité, tétanie...), musculaires

(crampes) et cardiaques (Troubles du rythme) <sup>229</sup>. Cette anomalie peut parfois révéler la maladie mais est souvent découvert après le diagnostic de celle-ci. Une hypokaliémie (< 3.5mM), est aussi présente dans 30 à 50% des cas adultes signant une dysfonction plus globale du tubule distal type syndrome de Gitelman<sup>236</sup>. Son profil évolutif semble être identique avec une apparition pendant la deuxième partie de l'enfance et peut persister malgré l'apparition d'une insuffisance rénale parfois même jusqu'à la mise en dialyse <sup>230,236</sup>. La plupart du temps modérée, elle peut néanmoins chez certains patients être profonde (<3mM). L'existence d'un trouble de la concentration des urines a également été documenté dans des modèles murins <sup>231</sup>. Quelques cas de syndrome de Fanconi, avec signes de dysfonction plus au moins complète du tubule proximal ont été décrits (protéinurie tubulaire, aminoacidurie, glycosurie normoglycémique, hypercalciurie, hyperphosphaturie, acidose tubulaire, hypokaliémie, hypocalcémie...) associée à de nombreux événements lithiasiques. Ce tableau semble assez rare par comparaison avec d'autres maladies proches (HNF1A...) et les autres anomalies tubulaires <sup>236</sup>.

Néanmoins la maladie s'accompagne souvent d'autres atteintes extra-rénales notamment digestives (diabète type MODY V, perturbation du bilan hépatique chronique...), génitales (utérus didelphe, utérus bicorne, agénésie utérine, syndrome de Mayer-Rokitanski-Küster-Hauser, cryptorchidie, agénésie déférentielle...), ou encore, bien que plus débattues, neurologiques <sup>212,232,243</sup>.

L'anomalie génétique la plus fréquemment en cause correspond à une délétion complète d'*HNF1B* dans le cadre d'une délétion chromosomique plus étendue (classiquement voisine de 1,3 Mb) au sein de la région 17q12. Elle représente 55-60% des cas. Les autres patients présentent une mutation ponctuelle (exonique ou sur un site d'épissage), ou plus rarement une délétion/duplication d'un exon, voir une duplication de l'ensemble du gène. Plus de 50 mutations pathogènes ont été décrites. Celles-ci sont principalement localisées en regard des régions codant pour les domaines fonctionnels essentiels (HD, domaine HNF, domaine de dimérisation, domaine de transactivation) ou sur des sites régulant l'épissage du transcrit <sup>232,235,236,244,245</sup>. La pathogénicité de ces anomalies chez l'homme est attribuée principalement à un simple phénomène d'haplo-insuffisance bien que pour certaines mutations un effet dominant négatif du variant protéique produit a pu être mis en évidence. Cependant, il faut noter que ce type de déterminisme génétique ne permet pas d'expliquer l'extrême hétérogénéité des phénotypes observés. Il est probable que le déterminisme des atteintes soit beaucoup plus complexe impliquant des phénomènes d'empreinte ou d'extinction allélique, d'autres variations génétiques associées voire des facteurs environnementaux <sup>216,223,232</sup>. Les mutations / délétions d'*HNF1B* sont pour moitié héritées d'un parent porteur de l'anomalie, connue ou non, et pour moitié *de novo* <sup>232,235-238</sup>. A noter, il existe une certaine corrélation génotype/phénotype sur les divers aspects de la maladie. Ainsi, les mutations semblent induire un phénotype rénal plus sévère que les délétions complètes. A l'inverse, les délétions sont associées à une fréquence accrue de diabète et d'anomalies neurologiques <sup>232,239,245</sup>. Cela pourrait être le fruit, soit d'un effet dominant négatif

de certains variants protéiques lors de mutations, soit un effet protecteur au niveau néphrologique de la perte d'autres gènes situés dans la région lors d'une délétion large 17q12 <sup>246</sup>.

### B.3. Rôles rénaux d'HNF-1 $\beta$ et la piste métabolique :

HNF-1 $\beta$  est exprimé très précocement au cours de la vie embryonnaire où il joue un rôle indispensable dans les premières étapes du développement notamment la bonne différenciation de l'endoderme, expliquant une léthalité précoce des invalidations complètes. <sup>206</sup>

Au niveau rénal, son expression débute tôt avec un rôle important pour de multiples étapes développementales de l'appareil uro-génital : la différenciation des structures Wolffiennes et Mulleriennes via la régulation de *Pax2* et *Lim1* <sup>225</sup> ; induction, extension, ramification du bourgeon uretéral et induction du blastème métanéphrogène via la régulation des gènes *Wnt9b/Socs3/Gndf/Ret* <sup>217,225</sup> ; régulation de la polarisation planaire des cellules épithéliales et de l'orientation des mitoses via la régulation de *Pkd2/Pkhd1/Polaris/Nphp1/Umod* <sup>226</sup>. Une grande partie des anomalies rénales notamment les anomalies morphologiques (kystes, hypodysplasie, CAKUT...), et uro-génitales (anomalies utérines, cryptorchidie, agénésie déférentielle...) s'explique bien par les conséquences développementales du déficit en HNF-1 $\beta$  sur ces différentes étapes <sup>216,217,222,225,226</sup>. Cependant, ces rôles développementaux essentiels ne permettent pas d'expliquer l'ensemble du phénotype rénal.

Ce facteur présente également des rôles post-développementaux, moins étudiés, permettant d'expliquer certaines autres anomalies phénotypiques rénales. Par exemple, HNF-1 $\beta$  régule l'expression de *Fxyd2*, la sous-unité  $\gamma$  des NaK-ATPase baso-latérales impliquées dans la réabsorption, notamment tubulaire distale et collectrice, du magnésium, permettant d'expliquer certains troubles hydro-electrolytiques (hypomagnésémie, hypermagnésurie, hypocalcémie) <sup>229</sup>. Plus récemment, il a été montré que l'invalidation d'HNF1B induit, via une désinhibition de l'expression de *Twist2*, une trans-différenciation et la surproduction épithéliale de médiateurs pro-fibrosants notamment TGF- $\beta$ 2, expliquant au moins en partie, à l'âge adulte, l'insuffisance rénale chronique avec fibrose <sup>221</sup>.

Une part encore incomplètement inexpliquée du phénotype correspond aux épisodes d'aggravation brutale de l'insuffisance rénale parfois à la faveur d'un événement précipitant. Cette évolution suggère qu'HNF-1 $\beta$  pourrait tenir un rôle clé dans l'adaptation et la réparation rénale après agression rénale aiguë <sup>236</sup>. Ce rôle clé dans la réparation rénale est soutenu par l'existence d'une modulation d'HNF-1 $\beta$  en réponse à différentes formes d'IRA <sup>129,214,247-250</sup>. Dans les suites d'une agression, quelques études ont déjà montré un effet protecteur de *Hnf1b* vis à vis des dégâts rénaux soit sur des critères fonctionnels <sup>247,250</sup> soit morphologiques <sup>222</sup> en lien avec la régulation de l'apoptose <sup>247,250</sup>, l'inflammation <sup>250</sup> ou la tubulogénèse <sup>222</sup>. Cependant,

concernant certains axes mécanistiques, les preuves apportées ne sont pas encore parfaitement convaincantes.

L'un des mécanismes intermédiaires potentiels pourrait être la régulation du métabolisme épithélial notamment énergétique. En effet, HNF-1 $\beta$  est connu pour réguler le métabolisme dans certains tissus tumoraux, notamment le carcinome ovarien à cellules claires, où son expression est associée à un effet Warburg. Cette réorientation métabolique permet de favoriser les phénomènes anaboliques nécessaires à la prolifération, mais aussi l'adaptation à l'hypoxie et la réduction de la production d'espèces réactives de l'oxygène nocives dans un environnement ovarien très oxydant <sup>251,252</sup>. Au niveau rénal, HNF-1 $\beta$  régule aussi le métabolisme énergétique et la biogenèse mitochondriale notamment dans les cellules tubulaires proximales cependant avec un effet qui semble paradoxalement inverse. Cela passerait par la stimulation directe de *Ppargc1a*, le gène codant pour PGC-1 $\alpha$ , un stimulateur essentiel de la biogénèse mitochondriale <sup>214</sup>. La mitochondrie est l'organelle majeur de la production énergétique par métabolisme oxydatif, dominant dans les cellules tubulaires proximales. La présence d'une biogénèse secondaire à un déficit d'activité HNF-1 $\beta$ , laisse supposer un déficit du métabolisme énergétique mitochondrial avec réorientation vers la glycolyse en condition aérobie (effet Warburg) <sup>69</sup>. HNF-1 $\beta$  est également connu pour réguler d'autres aspects du métabolisme rénal à l'image de l'internalisation et la biosynthèse du cholestérol, un composant essentiel des membranes cellulaires <sup>220</sup>.

Comme nous l'avons détaillé plus haut, ces anomalies métaboliques, notamment énergétiques, sont au centre de l'adaptation épithéliale à certains mécanismes lésionnels mais aussi à la réparation tissulaire ultérieure. Ainsi cette réorientation métabolique pourrait participer à une amplification des lésions, de l'altération fonctionnelle initiale et des séquelles induites. Ce lien pourrait être direct mais aussi passer par la genèse d'autres anomalies secondaires telles la mort cellulaire ou un phénotype pro-inflammatoire déjà décrits <sup>247,250</sup>.

### 3. Diagnostic et prédiction de l'AKI :

- Les critères diagnostiques actuels de l'IRA sont sous optimaux et ne permettent qu'une détection des IRA avec altération fonctionnelle épuisant la réserve fonctionnelle, de manière retardée et sans information sur la souffrance tissulaire ou les mécanismes en cause.
- Ces dernières années de nombreux biomarqueurs ont été développés pour optimiser certains aspects du diagnostic ou du pronostic (précocité de détection, typage de l'atteinte épithéliale, précision mécanistique...) mais sont encore peu utilisés en pratique. Au-delà des biomarqueurs, l'apport des nouvelles technologies (Big Data) permettant l'intégration simultanée de divers paramètres (cliniques, biologiques, biomarqueurs) éventuellement en continu, offre une autre piste d'amélioration.
- L'intégration de ces nouveaux outils laisse présager une transformation à court terme de ces critères avec des améliorations attendues sur l'efficacité de la prise en charge.
- L'IRA est en large partie déterminée par les caractéristiques de l'agression et le terrain sur lequel elle survient. Il est donc possible de prédire son risque de survenue en se basant sur des éléments permettant de caractériser l'un et/ou l'autre. Au-delà du classique recensement des facteurs de risques, des outils composites (score, biomarqueurs...) ont été développés pour permettre une prédiction plus objective du risque avec une utilité potentielle dans la décision thérapeutique. Là encore, l'apport des nouvelles technologies (Big Data), offre une autre piste d'amélioration intéressante.

Au-delà de sa définition théorique simple, le diagnostic de l'IRA représente un enjeu important, pour permettre notamment l'initiation précoce de mesures thérapeutiques à des stades où les lésions sont encore accessibles à un traitement.

Dans cette partie nous allons d'abord voir les limites des critères diagnostiques actuels, puis les améliorations récentes issues de la recherche fondamentale avant de voir dans quelle mesure des outils prédictifs peuvent être développés pour identifier les patients avant même que l'agression ne se produise.

#### A. Avantages et limites des critères diagnostiques actuels :

Dans les recommandations actuelles<sup>253</sup>, le diagnostic de l'IRA est basé sur l'augmentation du taux de créatinine sérique, la réduction de la diurèse et/ou la nécessité de recours à l'épuration extra-rénale.

Ces critères, bien que consensuels, ne représentent pas un véritable "gold-standard" pour l'évaluation de l'atteinte rénale, mais correspondent à un compromis entre la qualité de l'évaluation de l'atteinte rénale et la compatibilité avec la pratique clinique quotidienne en termes de coût, de praticité et de faisabilité technique<sup>254</sup>. En effet, ils présentent un certain nombre de limites. D'un point de vue général, cette classification se base sur des critères se voulant le reflet uniquement de la fonction de filtration rénale en négligeant les autres aspects de l'IRA notamment la fonction tubulaire. De même, cette classification ne tient pas compte de l'origine de l'IRA notamment le distinguo entre IRA fonctionnelle et intrinsèque. Au-delà de



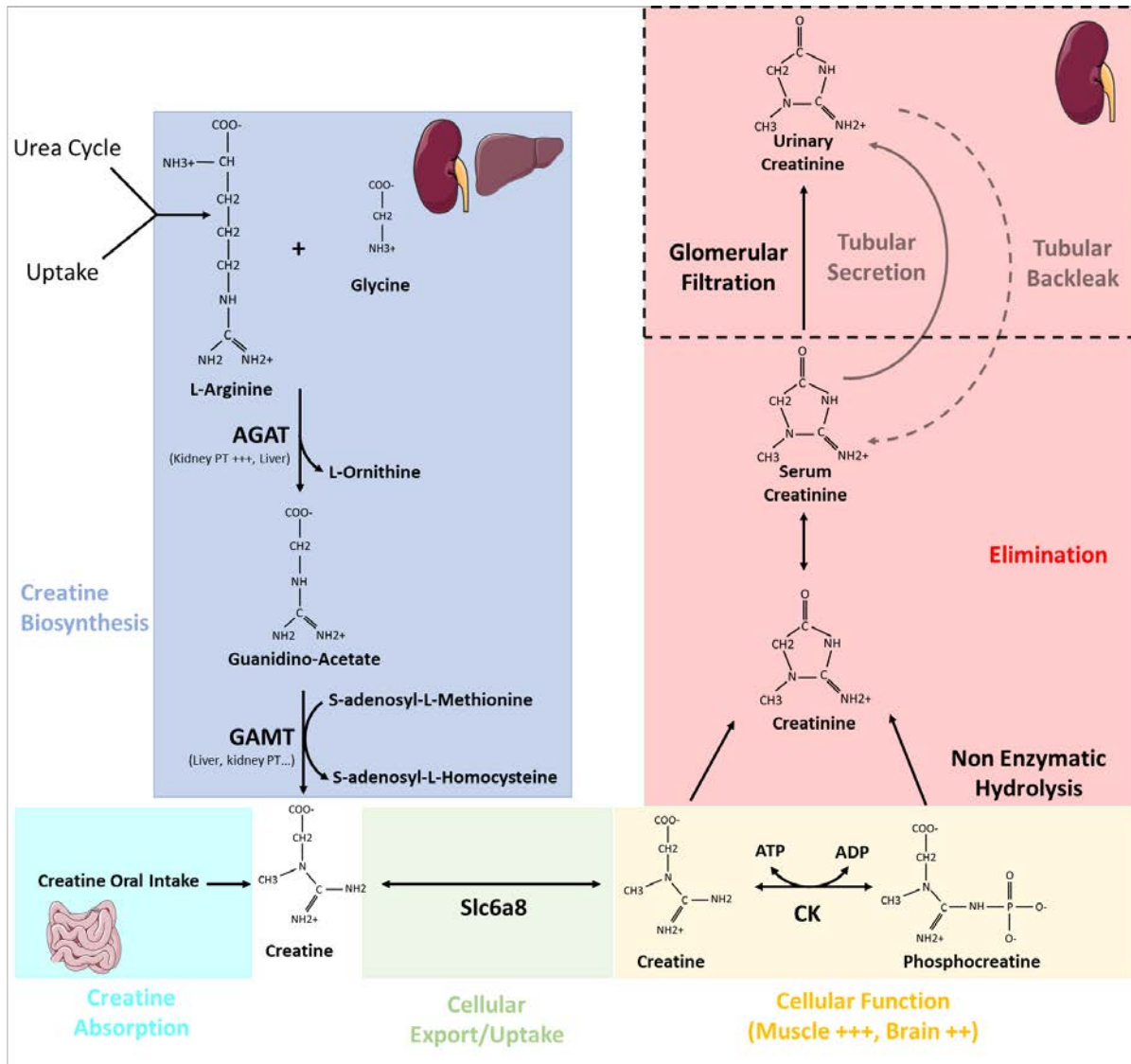
ces considérations théoriques, ces critères présentent également des limites en lien avec leur mise en œuvre pratique et les propriétés intrinsèques des marqueurs utilisés que nous allons détailler ci-après.

#### A.1. Dosage de la créatinine sérique :

La créatinine sérique est un composé biochimique endogène (masse molaire : 113g/mol) produit à partir de la créatine ou de son dérivé phosphorylé, la phosphocréatine, par hydrolyse non enzymatique<sup>255,256</sup>.

La créatine est issue de manière équivalente d'une synthèse de novo à partir de deux acides aminés, la L-Arginine et la Glycine, et les apports alimentaires<sup>255,256</sup>. La biosynthèse de novo de créatine est classiquement considérée comme un processus à deux étapes. La première étape enzymatique, catalysée par l'enzyme L-Arginine:Glycine Amidinotransferase (AGAT), consomme une Arginine et une Glycine pour produire du guanidinoacetate. Du fait du profil d'expression cellulaire de AGAT, cette réaction est supposée se dérouler quasi exclusivement dans les cellules épithéliales rénales, en particulier dans leur espace intermembranaire mitochondrial<sup>255,257,258</sup>. La seconde étape, catalysée par l'enzyme N-Guanidinoacetate méthyltransférase (GAMT), utilise le guanidinoacétate pour former la créatine se déroule principalement dans le foie bien que d'autres tissus puissent y contribuer de manière marginale<sup>255</sup>. La créatine produite et ses précurseurs tardifs sont transportés à travers les membranes par un transporteur spécifique (SLC6a8) jusqu'à leur site d'utilisation<sup>255</sup>.

Les molécules de créatine ou phosphocréatine subissent une hydrolyse spontanée non enzymatique qui aboutit à la dégradation d'environ 1.7% du pool corporel total chaque jour<sup>259</sup>. Cette réaction est presque exclusivement dépendante de la disponibilité des précurseurs qui dépend elle-même principalement de la masse musculaire globale. D'autres paramètres comme la température, le pH cellulaire ou les apports alimentaires peuvent exercer une modulation dont l'effet reste marginal<sup>256</sup>. La créatinine formée, hydrosoluble, diffuse dans le milieu intérieur avant d'être éliminée dans les urines principalement par filtration glomérulaire. Une vision schématique du métabolisme de la créatinine est représentée dans la **Figure 15**.



**Figure 15 : Représentation schématique du métabolisme de la créatinine.** AGAT : L-Arginine:Glycine Amidinotransferase ; GAMT : Guanidinoacetate N-methyltransferase ; Slc6a8 : Solute Carrier 6 a 8 ; CK : Creatine Kinase (Images tirées de <https://smart.servier.com/>)

Ainsi, la concentration de la créatinine sérique, reflet de la concentration dans le milieu intérieur, est déterminée par la balance entre sa production endogène et son élimination urinaire par filtration. En condition basales, sa valeur est assez stable dans le temps permettant une assez bonne estimation de la fonction de filtration rénale chez l'homme. En contexte d'IRA, sa concentration sérique augmente en raison de la réduction de l'élimination urinaire jusqu'à ce que le patient récupère une fonction de filtration rénale normale ou qu'elle atteigne une nouvelle concentration d'équilibre pour laquelle production et élimination sont équivalentes. Les variations des concentrations de créatinine peuvent donc être utilisées pour apprécier la perte de fonction de filtration rénale et sa récupération en contexte aigu<sup>254,260</sup>.

Le dosage de la créatinine sérique fait partie des bilans biologiques de routine, nécessite simplement un prélèvement sanguin, sans injection préalable d'un marqueur (marqueur endogène) et repose sur des tests validés, reproductibles et peu coûteux disponibles dans la majeure partie des laboratoires du monde.

Néanmoins la créatinine sérique n'est pas un parfait reflet de la fonction de filtration, en particulier en situation aiguë en raison de plusieurs problèmes<sup>254,261–263</sup>.

**En premier lieu**, la créatinine sérique n'est pas seulement déterminée par son élimination rénale mais aussi pas d'autres paramètres comme sa production ou son volume de distribution. **(Figure 15)** Pour un même niveau d'élimination rénale, la créatininémie basale peut changer de manière spectaculaire entre des individus présentant, par exemple, des masses musculaires, et donc des niveaux de production, très différents. De la même manière, en contexte d'IRA avec perte de fonction identique, les changements de concentrations de créatinine sérique observés chez de tels patients peuvent être très différents<sup>264,265</sup>. Pour tenter de corriger ce biais, la mesure directe de la clairance de la créatinine a été développée mais impose des contraintes logistiques importantes (recueil des urines des 24 heures pour mesure du volume et dosage de la créatininurie en plus d'un échantillon sanguin) et n'est pas adaptée aux situations aiguës. Des modèles permettant l'estimation de la fonction de filtration rénale, basés sur la concentration de créatinine sérique (situation stable) ou sur les variations de celle-ci (situation instable en contexte d'IRA), intégrant des paramètres morphométriques de routines comme le sexe, l'âge, le groupe ethnique, le poids et la taille, ont été développés. Ces estimateurs sont désormais utilisés en pratique clinique quotidienne pour l'évaluation des maladies rénales chroniques mais moins utilisés en contexte d'IRA du fait de leurs moindres performances du fait de la présence d'autres facteurs interférant<sup>260,266–272</sup>. En contexte aiguë, surtout dans les secteurs de soins intensifs bien qu'ayant un impact plus modéré, se rajoute la problématique du volume de distribution de la créatinine. Celui-ci peut varier énormément et très rapidement en fonction de la balance entre les apports hydrosodés et les sorties (diurèse, autres pertes). De ce fait la concentration de créatinine n'est pas déterminée seulement par la quantité disponible mais également par le volume dans lequel elle est distribuée/diluée<sup>273–275</sup>.

**Deuxièmement**, la clairance rénale de la créatinine n'est pas un reflet exact de la fonction de filtration rénale. En effet, la créatinine, bien que librement filtrée par le glomérule, peut être aussi activement ou passivement transportée à travers l'épithélium durant le trajet de l'urine primitive dans le tubule rénal, engendrant une dissociation entre sa clairance et la filtration glomérulaire<sup>254,264</sup>. Ainsi la créatinine fait l'objet d'une sécrétion active au niveau du tubule proximal, attribuée à certains transporteurs d'anions organiques<sup>276–278</sup>, chez l'homme<sup>279</sup> mais encore plus chez certains animaux en particulier la souris<sup>276</sup>. En conditions basales, la sécrétion tubulaire compte pour jusqu'à 20% de l'excrétion urinaire de créatinine chez l'homme<sup>280–282</sup> mais peut atteindre 50% dans des modèles murins<sup>276</sup>. De plus cette part sécrétée n'est pas constante : elle s'accroît avec l'accroissement de la concentration de créatinine sérique induisant une sur-estimation de la fonction de filtration rénale. De la même manière, de nombreux médicaments, souvent utilisés en contexte d'AKI,

peuvent influencer sa sécrétion comme la cimétidine, la kétamine ou encore le triméthoprim<sup>276,283,284</sup>. En plus d'une sécrétion tubulaire active, la créatinine peut faire l'objet, en particulier en contexte d'IRA avec lésions épithéliales tubulaires, d'une rétrodiffusion transtubulaire, réduisant ainsi l'excrétion urinaire de créatinine et accroissant sa concentration sérique de façon indépendante de la fonction de filtration rénale.<sup>131</sup>

**Troisièmement**, en contexte aigu, une élévation détectable de la concentration sérique de créatinine est retardée d'au moins 24 heures après l'agression en raison du temps nécessaire à son accumulation après l'effondrement de la fonction de filtration rénale mais aussi du rythme classique de réalisation des bilans biologiques en pratique clinique quotidienne<sup>270,285</sup>.

**Quatrièmement**, comme nous l'avons vu plus haut, il existe une grande réserve fonctionnelle de filtration rénale et donc une augmentation détectable de la concentration de la créatinine sérique nécessite une atteinte rénale sévère et étendue à l'ensemble du parenchyme. Chez un patient sain, une augmentation de la créatinine sérique est détectable lorsqu'au moins 50% du capital néphronique est affecté et ne remplit plus sa fonction de filtration<sup>165,286</sup>. Chez les patients porteurs d'une maladie rénale chronique, la réserve fonctionnelle est souvent partiellement ou totalement consommée en conditions basales, expliquant des augmentations détectables de la créatinine sérique pour des atteintes rénales moins sévères et étendues<sup>165,265</sup>.

**Cinquièmement**, la créatinine sérique est un marqueur fonctionnel reflétant la capacité de filtration rénale. Il n'est donc capable de détecter que des agressions induisant une souffrance tissulaire assez importante pour que la fonction de filtration rénale globale soit altérée. En revanche, il ne détectera en aucun cas l'existence d'une souffrance tissulaire notamment épithéliale sans retentissement fonctionnel global immédiat pouvant pourtant être associée à des conséquences à long termes<sup>28,285,287</sup>.

**Enfin, sixièmement**, une valeur de base antérieure de la créatinine plasmatique n'est pas toujours disponible en contexte d'IRA, ne permettant pas de faire la différence entre une IRA ou une insuffisance rénale chronique.

Donc la créatinine plasmatique, bien qu'étant le marqueur le plus utilisé en pratique, n'est qu'un reflet très imparfait de la fonction rénale, justifiant l'association à d'autres paramètres au sein de ces critères AKI KDIGO.

#### A.2. Mesure de la diurèse horaire :

Le deuxième paramètre pris en compte dans les critères diagnostiques actuels, correspond à la diurèse horaire. Ce volume d'urine émis est de déterminisme complexe faisant intervenir différents acteurs et régulateurs impliqués dans la formation de l'urine primitive par filtration et le retraitement ultérieur de celle-ci, en particulier la réabsorption d'eau et de sodium<sup>171</sup>.

L'urine primitive est initialement obtenue par filtration passive du sang dans les glomérules à travers une barrière composée de plusieurs acteurs (cellule endothéliale, membrane basale glomérulaire et podocyte) permettant une certaine sélectivité. Le volume de filtrat obtenu, voisin de 180L/j chez un individu moyen en condition basale, est déterminé par la perméabilité glomérulaire, le gradient de pression hydrostatique et le gradient de pression osmotique entre les secteurs sanguin (lumière du capillaire glomérulaire) et urinaire (lumière de la capsule de Baumann). Ces trois paramètres peuvent se retrouver altérés au cours de l'IRA résultant en une filtration réduite avec impact potentiel sur la diurèse émise. Par la suite cette urine va subir un retraitement majeur au cours des différentes étapes de son trajet tubulaire induisant en conditions normale une réabsorption d'environ 99% du volume initial, découplant le volume de la diurèse et la fonction de filtration<sup>171</sup>. Ce d'autant plus que cette réabsorption est étroitement régulée par divers mécanismes intervenant à chaque niveau de son trajet tubulaire réagissant à divers stimuli possiblement présent en contexte d'IRA<sup>171</sup>.

La diurèse horaire est néanmoins un paramètre facilement mesurable, sans test supplémentaire ou surcoût, et fait partie de l'évaluation clinique en routine en particulier dans les services de médecine intensive. Il permet d'identifier une bonne partie des patients inclus comme présentant une IRA selon les critères KDIGO souvent plus précocement qu'avec utilisation de la créatininémie quand les deux critères sont présents<sup>288-294</sup>. La réduction de la diurèse est connue pour être associée à des Endpoints durs dans de nombreuses situations cliniques aiguës indépendamment des autres critères KDIGO et confère une sur gravité potentielle quand elle est présente<sup>288-290,294</sup>.

Cependant la diurèse n'est pas un reflet exact de la fonction voire de la souffrance rénale pour de nombreuses raisons.

**Premièrement**, bien que l'urine primitive soit obtenue par filtration à travers la barrière glomérulaire et donc son volume déterminé par le débit de filtration, la diurèse est fortement influencée par la réabsorption d'eau et d'électrolytes durant le trajet tubulaire. Ainsi en condition normale 99% du volume d'urine primitive est réabsorbé de manière étroitement régulée pour aboutir à un bilan hydrosodé nul faisant de la diurèse un reflet très indirect de la fonction ou même de la souffrance rénale. Ainsi une altération très marquée de la filtration rénale peut s'accompagner d'une diurèse normale en particulier en cas de dysfonction tubulaire spontanée ou induite (diurétiques) associée. A l'inverse, une réduction de la diurèse peut intervenir sans altération de la fonction de filtration ou même de souffrance rénale, simplement sous l'effet de la mise en jeu de mécanismes adaptatifs (système ADH, glucocorticoïdes, catécholamines, SRAA) permettant de répondre à une situation de stress<sup>16,171,285,289,292,295-297</sup>. Pour pallier à cette dernière limite, certains auteurs proposent chez les patients présentant une diurèse réduite (oligo-anurie), le recours à une manœuvre dynamique (Furosémide Stress Test) d'inhibition d'une part des mécanismes de régulation de la réabsorption hydrosodée permettant ainsi de mieux corrélér la diurèse à la fonction de filtration. Ainsi en cas de non réponse à cette forte dose de diurétique, l'oligo-anurie observée est très probablement en lien avec une

altération de la filtration rénale, “prédisant” ainsi l’apparition rapide de critères d’IRA notamment sévère<sup>298,299</sup>. Néanmoins ce type de test n’est pas anodin avec possibilité d’aggravation de l’IRA (Majoration d’une hypovolémie en cause dans l’IRA, acidification des urines avec aggravation de la précipitation de myoglobine ou hémoglobine, stress oxydatif induit) ou d’effets indésirables classiques (hypokaliémie, hypocalcémie, ototoxicité...) <sup>300</sup>.

**Deuxièmement**, contrairement à ce que laisse entendre la simplicité du paramètre, obtenir une bonne surveillance de la diurèse en clinique s’avère assez complexe en pratique. En effet, ce recueil peut s’avérer techniquement compliqué chez des patients non sondés, surtout dans certaines conditions ou sur certains terrains, avec toujours un doute sur la fiabilité des mesures (Urines perdues). De plus, le recueil et le monitoring de la diurèse est rarement systématique en dehors des services de néphrologie et de soins intensifs ne permettant pas d’utiliser ce critère face à de très nombreux patients pour identifier une IRA. De même, en raison du caractère intermittent des mictions et du fait que ce recueil n’est généralement rapporté qu’une fois par jour, le bénéfice en termes de précocité de détection de l’IRA comparativement à l’élévation de la créatininémie, est bien souvent marginal en dehors des services de soins intensifs<sup>265</sup>.

**Troisièmement**, la définition de la diurèse et des moyens de la mesurer dans les critères KDIGO est floue laissant place à d’importantes variations en pratique clinique ou dans les études qui ne sont pas sans impact sur la pertinence de l’indicateur<sup>289,291</sup>.

**Enfin, quatrièmement**, un débat existe sur la pertinence du seuil utilisé pour les critères KDIGO, sachant qu’une réduction aussi transitoire et limitée (< 0.5mL/kg/h sur 6 heures) est à la frontière de l’adaptation physiologique sans forcément être associé à des indicateurs péjoratifs pertinents<sup>293,301</sup>.

#### A.3. Recours à l’épuration extra-rénale :

Lors d’un épisode d’IRA, lorsque l’altération de la fonction de filtration rénale est importante et/ou prolongée, il se produit une accumulation de substances habituellement éliminées par ce biais pouvant mettre en jeu le pronostic vital à très court termes. Par exemple, la perte des capacités d’élimination du potassium peut induire une hyperkaliémie à risque de troubles du rythme cardiaques mortels. De la même manière, la perte des capacités d’élimination de la charge acide organique peut induire ou au moins aggraver une acidose pouvant être à l’origine de défaillances d’organes (vasoplégie, neurologique, respiratoire) ou d’inefficacité des traitements (catécholamines). Également, la perte des capacités d’élimination de l’eau et du sel, peut induire une surcharge hydrosodée avec un impact délétère potentiel sur la fonction respiratoire (Œdème aigu du poumon), cardiaque ou d’autres organes en lien avec l’œdème interstitiel <sup>8,16</sup>.

Le recours à l’épuration extra-rénale est un événement clinique majeur, qui a l’avantage d’être facile à recenser et signe la sévérité de l’état clinique observé avec des conséquences graves à court et long termes<sup>8,10,33,302</sup>.

Néanmoins ce critère a plusieurs inconvénients. Déjà, il ne permet que rarement le diagnostic de l'IRA mais sert plus pour la stadification de la gravité du fait de son timing généralement postérieur à l'apparition des autres critères bien que de nombreux débats existent à ce sujet <sup>8,302-306</sup>. De plus, les critères retenus pour son initiation sont éminemment variables suivant les centres et les habitudes <sup>302</sup>. Enfin, il est important de noter que ce type de technique a une disponibilité variable en fonction des zones géographiques avec en particuliers un accès extrêmement limité dans la plupart des pays en développement <sup>8,12,14</sup>.

Au total, le diagnostic d'IRA selon les recommandations KDIGO actuelles, bien que facile d'utilisation et ayant apporté une harmonisation internationale des critères, n'est pas optimal. Malgré l'association de plusieurs critères ayant un apport certain, il ne permet que le diagnostic des IRA associées à une altération fonctionnelle visible sur la créatininémie et la diurèse donc négligeant des épisodes de souffrances rénales sans altération fonctionnelle ou sur un terrain avec réserve fonctionnelle importante. Ces critères ne permettent également qu'un diagnostic retardé par rapport à l'agression en lien avec les propriétés des marqueurs mais également les habitudes de fonctionnement des services, limitant de facto l'efficacité des interventions thérapeutiques. Enfin, ces critères ne prennent pas en compte la cause de l'IRA pourtant déterminant essentiel de l'évolution et de la gravité.

## **B. Nouvelles approches d'optimisation du diagnostic d'IRA**

A la vue de l'importance clinique de l'IRA et des limites des critères diagnostiques actuels et de leur mise en œuvre, la nécessité de développer de nouveaux outils pour optimiser le diagnostic de l'IRA est évidente. Ce domaine a fait et fait l'objet d'une recherche intensive ces dernières années.

*Ces nouveaux outils sont de deux sortes :*

- d'une part de nouveaux marqueurs, principalement des biomarqueurs, plus performant pour la détection de l'IRA et qui permettront à terme d'en redéfinir les critères diagnostiques <sup>254,261-263,307</sup> ;
- d'autre part des outils basés sur les critères actuels mais optimisant leur mise en œuvre pour leur permettre une efficacité maximale <sup>20</sup>.

*L'ensemble de ces nouvelles approches pourraient améliorer la prise en charge en permettant :*

- une détection plus exhaustive des épisodes de souffrance rénale ;
- un diagnostic plus précoce, à un stade où une intervention thérapeutique a le plus de chance d'être efficace ;

- une meilleure caractérisation de l'IRA tant sur le plan du mécanisme lésionnel en jeu, de la localisation ou de la gravité de la souffrance tissulaire ;
- une meilleure prédiction et évaluation précoce de la réponse aux traitements.

### **B.1. Les nouveaux marqueurs d'IRA :**

Outre des marqueurs déjà existant mais moins disponibles en routine, des recherches intensives ont été menées ces dernières années pour développer des outils plus performants <sup>254,261–263,307</sup>. La liste de ces nouveaux biomarqueurs candidats est extrêmement longue, raison pour laquelle nous limiterons notre étude détaillée aux mieux validés.

Ces nouveaux marqueurs peuvent être séparés en fonction de l'anomalie qu'ils décrivent (**Figure 14**). On distingue ainsi :

- des *marqueurs fonctionnels* pouvant évaluer la fonction de filtration rénale (cystatine C sanguine, proenkephaline, mesure du DFG inuline/EDTA) mais aussi la fonction de réabsorption tubulaire (albuminurie, B2-microglobuline, cystatine C urinaire),
- des *marqueurs de stress épithélial* (TIMP2\*IGFBP7),
- des *marqueurs de lésion épithéliale* (NGAL, LFABP, KIM1, NAG),
- des *marqueurs inflammatoires* (MCP1, IL18...),
- des *signatures sans mécanisme précis associé* (Omics).

Malgré les améliorations apportées par certains d'entre eux, leur utilisation reste limitée en pratique clinique quotidienne avec actuellement une utilisation restreinte à la recherche ou à des situations très particulières. L'approbation récente de certains de ces marqueurs dans certains pays (TIMP2\*IGFBP7 en Europe et aux Etats-Unis <sup>308</sup>, LFABP au Japon <sup>309</sup>) fait espérer un élargissement des possibilités d'accès à certains de ces marqueurs en routine.



Famille	Fonctionnels			
Sous famille	Filtration glomérulaire		Fonction tubulaire	
Localisation	Glomérule		Tubule proximal	
Biomarqueurs	Cystatine C Sanguine (S-CysC)	Proenkephaline (PENK)	Cystatine C urinaire (U-CysC)	Protéines de bas poids moléculaire
Secteur de mesure	Sérum/Plasma	Sérum/Plasma	Urines	Urines
Normalisation	-	-	Créatinine	Créatinine
Délai	24-72h	12-24h	24h	24h
Facteurs interférents	Sepsis, corticoïdes, grossesse, dysthyroïdie, ...	Sepsis, ...	Protéinurie, ...	Protéinurie, Etat nutritionnel, Inflammation, Geste endo-urologique, Maladie glomérulaire chronique, ...
Prédiction optimale	IRA	IRA	IRA	IRA
AUC	0.62-0.92	0.73-0.87	-	0.74-0.96

Famille	Epithéliaux				Inflammatoire	Non ciblés
Sous famille	Stress	Lésion			-	-
Localisation	Tubule proximal et distal	Tubule proximal			Tubule proximal et infiltrat inflammatoire	-
Biomarqueur	<b>TIMP2*IGFBP7</b>	<b>NGAL</b>	<b>LFABP</b>	<b>KIM1</b>	<b>IL18</b>	<b>Omics</b>
Secteur de mesure	Urines	Urines/Plasma	Urines	Urines	Urines	Urines
Normalisation	-	+/- Créatinine	+/- Créatinine	Créatinine	+/- Créatinine	Interne
Délai	4-6h	6-12h	0-12h	3-48h	0-24h	24h
Facteurs interférents	Traitement (platines...), Protéinurie, ...	Infection urinaire, ...	Dyslipidémies, Diabète, Traitements (statines, fibrates...), ...	Inflammation, ...	Inflammation, Néphropathies, ...	...
Prédiction	IRA/IRA sévère (+++)	IRA	IRA	IRA	IRA	IRA
AUC	0.58-0.87	0.6-0.95	0.7-0.96	0.71-0.92	0.58-0.83	0.8-0.9

Tableaux 2-3 : Tableau de synthèse des principaux nouveaux biomarqueurs de l'IRA.

Il est à noter que la découverte et la validation de ces nouveaux outils diagnostiques se fait souvent par confrontation au “Gold Standard” de routine que représentent les critères AKI KDIGO, dont l’imperfection freine probablement le développement de certains biomarqueurs d’intérêt mais moins bien associés à l’altération fonctionnelle détectable à la phase aiguë <sup>285</sup>.

Enfin, concernant les marqueurs urinaires, ils présentent un biais communs lié à l’utilisation de la créatininurie comme normalisateur, dont l’excrétion est inconstante dans ces situations aiguës, contrairement à une situation chronique stable.

#### *B.1.a. Marqueurs fonctionnels :*

Cette première famille de marqueurs sert à évaluer la fonction rénale soit sur le plan de la filtration soit sur le plan de la fonction tubulaire, c’est-à-dire le retentissement de l’agression. Cependant ces marqueurs possèdent une limite commune en ne renseignant pas sur les lésions ou la souffrance tissulaire.

##### *B.1.a.1. Mesure DFG Inuline/EDTA :*

Ce groupe de biomarqueur constitue le véritable gold standard de l’évaluation de la fonction de filtration rénale en permettant une évaluation quasi parfaite <sup>310-314</sup>.

Le principe consiste en l’administration parentérale (IV ou SC) d’un biomarqueur purement exogène, dont la quantité administrée est précisément connue. Après administration, le biomarqueur se distribue dans le milieu intérieur sans liaison aux protéines avant d’être exclusivement éliminé par filtration rénale sans phénomène de sécrétion ou réabsorption <sup>313,314</sup>. Plusieurs biomarqueurs ont été utilisés avec de bonnes performances (Inuline, Sinistrine, Iohexol, Iothalamate, EDTA, EDPA) <sup>310</sup>. Ils sont détectables soit nativement par dosage spécifique (Iothalamate, Iohexol, Inuline, Sinistrine), soit couplés à un radiomarqueur (51Cr-EDTA, 125I-Iothalamate, 99mTc-DTPA) soit couplés à un autre agent de contraste (Gad-DTPA).

Deux méthodes peuvent ensuite être utilisées à partir de ces biomarqueurs pour mesurer le DFG : soit l’évaluation de la cinétique de décroissance de la concentration plasmatique, soit la mesure de sa clairance urinaire. Le choix doit s’adapter au contexte et aux sources de biais potentielles <sup>310,312-315</sup>.

Néanmoins l’utilisation de ces marqueurs, possible en contexte chronique, n’est pas compatible avec la pratique clinique en contexte aigu en raison de la lourdeur de leur mise en œuvre, des contraintes techniques et de la lenteur d’obtention des résultats en particulier en présence d’une clairance altérée. Leur utilisation dans ce domaine est donc exclusivement limitée aux activités de recherche sans perspective de transfert en pratique.

### *B.1.a.2. Cystatine C :*

La cystatine C a été l'un des premiers biomarqueurs alternatifs à la créatinine identifié. Cette protéine non glycosylée de poids moléculaire réduit (13 kDa), appartenant à la superfamille des cystatines, est exprimée et sécrétée par toutes les cellules nucléées, ce qui garantit une production relativement constante à l'échelle de l'organisme, en particulier indépendamment de la masse musculaire ou de l'alimentation<sup>263,316,317,317-320</sup>. Cependant, certaines conditions ou stimuli environnementaux modulent son expression comme l'âge, le sexe, l'exposition à de fortes doses de glucocorticoïdes, les dysthyroïdies ou encore la grossesse<sup>316,317,321-323,323-326</sup>. Une fois sécrétée, elle est complètement soluble dans le milieu intérieur sans liaison aux protéines et son volume de distribution se limite au secteur extracellulaire<sup>262,263</sup>. La cystatine C est éliminée par voie rénale en étant librement filtrée au niveau glomérulaire avant réabsorption au niveau tubulaire proximal par endocytose grâce au système mégaline/cubuline en compétition avec les autres protéines filtrées telle l'albumine<sup>262,327</sup>. Après endocytose, elle est complètement dégradée<sup>316,317</sup>. Aucun phénomène de sécrétion significatif n'existe au niveau tubulaire en condition physiologiques. En condition pathologique, en présence d'un épithélium tubulaire endommagé, les échanges tubulaires de cette molécule peuvent néanmoins être perturbés avec apparition d'une rétrodiffusion (back-leak) ou d'une sécrétion passive.

La cystatine C peut être utilisée comme marqueur de l'AKI soit par dosage plasmatique soit par dosage urinaire.

Au vu de sa production constante, indépendante de facteur environnementaux tels l'âge ou la masse musculaire et de l'absence de sécrétion tubulaire, la concentration de Cystatine C plasmatique est principalement déterminée par le débit de filtration glomérulaire. Elle constitue un estimateur de la fonction de filtration rénale en situation chronique aux performances supérieures à la créatininémie ou aux estimations du DFG qui en découlent<sup>328</sup>. En contexte aigu, en plus des avantages sus-cités lui conférant toujours des performances supérieures à la créatininémie, son volume de distribution réduit, confère à la cystatine un profil de variation plus rapide après agression permettant ainsi une détection plus précoce (24-48h) de l'altération fonctionnelle. Cela a été confirmé par plusieurs études dans différentes situations d'agression rénale<sup>263,329-336</sup>.

Malgré ces avantages certains, la cystatine plasmatique reste un marqueur imparfait de la fonction rénale en particulier en situation aiguë pour plusieurs raisons :

- Certains facteurs indépendants du DFG peuvent moduler la concentration sérique de cystatine rendant impropre son utilisation dans ces situations mais imposant de les rechercher en pratique (dysthyroïdie, grossesse, glucocorticoïdes fortes doses, sepsis ...).

- En situation aiguë la valeur brute, à l'image de la créatinine, n'est pas toujours un bon reflet de l'ampleur de l'altération fonctionnelle aiguë imposant plutôt de s'intéresser à la cinétique de Cystatine C pour de meilleures performances <sup>260,272,337</sup>.
- Enfin, en situation aiguë, se rajoute le problème que les variations détectables de ce marqueur sérique sont toujours retardées par rapport à la perte de fonction de filtration rénale bien que moins que pour la créatinine.
- Il s'agit d'un marqueur purement fonctionnel évaluant le retentissement de l'agression sur la fonction de filtration et non la présence d'une souffrance ou de lésions tissulaires accessibles à un traitement.

La concentration urinaire est d'interprétation plus difficile mais peut être utilisée comme marqueur de dysfonction tubulaire proximale indépendamment du DFG sous la forme du ratio cystatine urinaire / Créatinine urinaire <sup>329,338-341</sup>. Une augmentation de ce ratio étant alors le reflet d'une dysfonction de la réabsorption au niveau de ce segment tubulaire. Néanmoins, une saturation du système mégaline cubuline par une protéinurie excessive est possible <sup>342</sup>. Cette augmentation survient précocement (24h) après l'agression à l'image de l'augmentation des taux sérique <sup>336</sup>. Ce marqueur permet une évaluation plus fine avec détection d'une souffrance ou de lésions tubulaires proximales, sites particulièrement sensibles aux mécanismes lésionnels, même en l'absence d'altération de la fonction de filtration.

#### *B.1.a.3. Proenképhaline (PENK) :*

Proenkephaline A 119-159 (PENK ou pENK ou penKid ou Proenkephaline), est un polypeptide (40 aa, 4.5 kDa) obtenue par clivage d'un précurseur des enképhalines <sup>343-345</sup>. Ce précurseur est exprimée en conditions basales par de nombreux tissus en particuliers au niveau du rein <sup>343,344,346</sup> mais sa production est possiblement augmentée en cas d'atteinte d'organe notamment au niveau cardiaque <sup>343,347</sup>. Son clivage permet la libération d'enképhalines, médiateurs de la réponse au stress, mais aussi du peptide PENK. PENK, bien que supposé inactif, a une durée de vie prolongée (> 48h) et est facilement dosable dans le plasma <sup>344</sup>. Sa production, supposée être le reflet de la production d'enképhalines <sup>343,348</sup>, est connue comme indépendante de certains paramètres généraux <sup>348,349</sup> mais aussi de certains contextes pathologiques tels le sepsis <sup>348</sup>. Ce peptide, non lié aux protéines plasmatiques, est supposé librement filtré par le glomérule sans sécrétion ni réabsorption ultérieure <sup>343</sup>.

Sa concentration plasmatique s'élève en cas d'insuffisance rénale aiguë <sup>343,350-362</sup> ou chronique <sup>360,363</sup>. Cette augmentation, attribuée essentiellement à un défaut de filtration rénale bien qu'une augmentation de la production intra-rénale ou autres (cardiaque) puisse aussi participer <sup>343</sup>, est fortement corrélée au DFG en contexte instable <sup>348,353,356-359,364</sup> mais aussi stable <sup>349,360,363</sup> en particuliers quand celui-ci est mesuré avec la

technique de référence <sup>349,360,364</sup>. Ainsi l'évaluation de ce taux permet de diagnostiquer précocement (Admission ou < 24h <sup>353,354,356,359-361</sup>) l'apparition d'une insuffisance rénale aiguë (critères variables) avec des performances élevées, comparables aux biomarqueurs les plus performants (AUROC = 0.725-0.87 <sup>348</sup>). Plus encore l'étude de la cinétique (J1/J2) de PENK après agression optimise encore les performances diagnostiques <sup>356,359</sup>.

Cependant ce marqueur reste imparfait pour plusieurs raisons :

- Il n'est bien évalué que dans le contexte des patients de réanimation et à fortiori avec un sepsis. Sa concentration plasmatique pourrait être potentiellement dépendante d'autres paramètres que la fonction de filtration rénale, ce qui pourrait limiter son utilité dans d'autres situations.
- La quantification d'un marqueur s'accumulant en réponse à une insuffisance rénale aiguë est toujours retardée par rapport au timing de l'agression.
- Il s'agit d'un marqueur purement fonctionnel évaluant le retentissement de l'agression sur la fonction de filtration et non la présence d'une souffrance ou de lésions tissulaires accessibles à un traitement.

#### *B.1.a.4. Albuminurie :*

L'albumine est une protéine de 585 aa (68 kDa), synthétisée par le foie, représente la protéine plasmatique majoritaire (60% des protéines circulantes) dont la concentration circulante est influencée par de nombreux facteurs (inflammation, état nutritionnel, régulation hormonale...) <sup>365</sup>.

En conditions physiologiques, cette protéine est filtrée à faible débit au travers de la barrière glomérulaire <sup>254,366,367</sup> avant réabsorption intégrale au niveau du tubule proximal via le couple mégaline/cubuline <sup>368</sup>. Ainsi physiologiquement l'albuminurie est indétectable, soit inférieure à 30 mg/g.

De nombreuses situations pathologiques peuvent induire une albuminurie significative notamment une altération de la barrière glomérulaire mais aussi une altération de la réabsorption tubulaire, deux anomalies potentiellement rencontrées en contexte d'IRA. Néanmoins, son taux urinaire est aussi largement influencé par de multiples facteurs (état nutritionnel, présence d'une sonde urinaire, inflammation...) qui en fait un marqueur peu spécifique et peu utilisable de l'IRA hormis pour éventuellement documenter une origine liée à l'altération de la perméabilité du filtre glomérulaire <sup>340</sup>.

*B.1.a.5. Les autres protéines de bas poids moléculaires circulantes : Beta-2-microglobuline ( $\beta 2M$ ), Alpha-1-Microglobuline ( $\alpha 1M$ ), Retinol Binding Protein (RBP)*

Ces biomarqueurs potentiels, basés sur le même principe que l'albumine ou la cystatine, partagent le même mécanisme et les mêmes sources de variation <sup>254</sup>. Ces protéines sont constamment produites et libérées dans la circulation avant d'être librement filtrées par le glomérule et réabsorbées par le tubule proximal via le couple mégaline/cubuline afin d'y être dégradées ou recyclées <sup>368,369</sup>. De ce fait, en condition normales leur concentration urinaire sont extrêmement faibles et une augmentation de celles-ci peut ainsi être interpréter comme un signe de dysfonction tubulaire notamment proximale <sup>254,369</sup>. De plus, si leur production est constante et que leur élimination est principalement rénale, le dosage sérique de ces biomarqueurs peut être utilisé pour évaluer la fonction de filtration rénale sur le même principe que la créatininémie. C'est par exemple le cas pour la B2microglobuline <sup>369</sup>.

Bien que connus de longue date et relativement facile à doser dans les fluides biologiques, ces marqueurs souffrent de lourds inconvénients supplémentaires qui limitent leur pertinence en pratique en particulier dans un contexte aigu. Ainsi leurs concentrations sériques sont souvent influencées par des facteurs divers comme l'inflammation ou l'existence d'une pathologie sous-jacente dissociant celle-ci de la fonction de filtration <sup>369</sup>. De même, leurs concentrations urinaires sont également augmentées lors d'une augmentation de la quantité de protéine filtrée par les glomérules (protéinurie de surcharge ou altération du filtre) entrant en compétition avec leur réabsorption tubulaire <sup>254,369-371</sup>. Enfin, pour certains d'entre elles, notamment la  $\beta 2M$ , leur stabilité médiocre à pH urinaire physiologique, en lien avec une probable dégradation enzymatique, rend leur utilisation techniquement complexe en routine <sup>372-374</sup>.

Plusieurs biomarqueurs peuvent être rangés dans cette catégorie :

*-  $\beta 2M$  / Beta-2-microglobuline :*

La  $\beta 2M$  est une protéine de 100 aa (12 kDa) produite par l'ensemble des cellules de l'organisme, ce qui lui assure une production et des taux circulants ou urinaires relativement constant en conditions basales notamment assez indépendant du sexe, de l'âge ou de la masse musculaire <sup>369,375</sup>. Cependant, de nombreuses situations sont décrites comme potentiellement associées à une augmentation de sa production notamment dans des situations de prolifération cellulaire incontrôlées (cancer, hémopathies...) mais aussi des stimuli environnementaux (tabac...) <sup>369</sup>. Elle est supposée être éliminée quasi exclusivement par voie rénale où elle est librement filtrée au niveau glomérulaire avant réabsorption tubulaire proximale pour dégradation <sup>369</sup>. Sa concentration circulante a été décrite comme bien corrélée à la fonction de filtration évaluée par méthode de référence en situation chronique <sup>369,375-378</sup> au point que certaines équations d'évaluation du DFG l'utilise comme base <sup>369,375</sup>. Son utilisation n'apporte pas de réel bénéfice comparativement à la créatinine hormis l'indépendance vis à vis de certaines caractéristiques morphométriques <sup>369,375,377</sup>. Ses performances en situation aigue sont moins documentées mais là encore un bénéfice réel par rapport à la créatinine semble

peu probable<sup>369,379,380</sup>. Sa concentration urinaire est principalement dépendante de la réabsorption tubulaire en compétition avec les autres protéines. Ainsi une augmentation des taux urinaires peut être soit le reflet d'une dysfonction tubulaire ou d'une monopolisation de la fonction de réabsorption par les autres protéines anormalement filtrées<sup>369,371,381</sup>. L'élévation de la B2m urinaire est observée en réponse à diverses IRA avec de bonnes capacités de prédiction confirmée dans certaines situations<sup>302,340,370,382-384</sup>.

-  $\alpha 1M$  / *Alpha-1-Microglobuline* :

L'Alpha-1-Microglobuline ( $\alpha 1M$ ) est une glycoprotéine de 183 aa (26 kDa) produite principalement par le foie avant d'être libérée dans la circulation et distribuée dans les divers tissus<sup>385</sup>. Elle est éliminée au niveau rénal par filtration libre au niveau glomérulaire avant réabsorption et dégradation au niveau tubulaire proximal<sup>385</sup>. Sa concentration urinaire augmente précocement après certaines agressions rénales<sup>254,386</sup> en lien avec un défaut de réabsorption tubulaire. Son dosage permet de diagnostiquer une IRA relativement efficacement dans diverses situations (AUC 0.74)<sup>386</sup> avec l'avantage d'une grande stabilité dans les urines à pH usuels<sup>387</sup>. Elle aurait également un rôle prédictif sur le développement d'une IRA grave requérant le recours à l'épuration extra-rénale avec de bonnes performances (AUC = 0.86)<sup>388</sup>. Néanmoins des validations à large échelle manquent à notre connaissance.

- *RBP / Rétinol Binding protein* :

La Rétinol Binding Protein sérique (RBP ou RBP4), est une protéine non glycosylée de 182 aa (21,2 kDa), synthétisée par le foie et libérée dans le courant sanguin, avant élimination par voie urinaire via une filtration glomérulaire suivie d'une réabsorption et dégradation tubulaire proximale<sup>377,389</sup>. Son taux sérique est corrélé à la fonction de filtration rénale, notamment en contexte chronique<sup>377,390</sup>. Néanmoins cette corrélation au DFG est moins forte que la créatinine en grande partie en lien avec l'influence d'autres paramètres notamment morphologique et alimentaires et n'est pas étudié en contexte aigu<sup>377</sup>. Une augmentation des taux urinaires de RBP ou de ses dérivés clivés survient précocement après diverses agressions rénales en lien avec une dysfonction de la réabsorption tubulaire proximale<sup>254,391,392</sup>. Le dosage de la RBP, dont les concentrations sont stables dans les urines à pH acide, permet un diagnostic de l'IRA avec de bonnes performances (AUC 0.77-0.96)<sup>392,393</sup>. Néanmoins l'utilité de ce marqueur reste peu documentée en dehors de ces quelques études.

**B.1.b. Marqueur de stress épithélial : Le couple Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 (TIMP-2) et Insulin-like Growth-factor Binding Protein 7 (IGFBP7) :**

Ce produit de marqueurs, seul représentant de sa catégorie est un marqueur de stress épithélial permettant de mettre en évidence que l'épithélium en souffrance tente de s'adapter.

*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 (TIMP-2)* est une glycoprotéine de 220 aa (21 kDa) <sup>394</sup> exprimée notamment au sein de l'épithélium tubulaire rénal en conditions basales <sup>395,396</sup> avec une régulation complexe surajoutée faisant intervenir des intermédiaires essentiels de la réponse au stress cellulaire (TGFβ1 <sup>397</sup> ou HIF <sup>398</sup>). TIMP2 joue un rôle de signal auto et paracrine permettant d'arrêter le cycle cellulaire via l'induction de l'expression de p27, un inhibiteur des complexes CDK-Cyclines (Cdk4-CyclinD, Cdk2-CyclinE), bloquant ainsi les cellules à la transition G1/S <sup>399-401</sup>. *Insulin-like Growth-factor Binding Protein 7 (IGFBP7)* est une protéine de 282 aa (29 kDa) fortement exprimée dans le rein en condition basale en particulier au sein de l'épithélium tubulaire proximal <sup>396</sup>. Elle serait capable d'exercer des fonctions de signalisation directes, de manière autocrine et paracrine <sup>399</sup>, telle l'induction d'expression de P21 et P53, deux inhibiteurs des complexes CDK-Cyclines, jouant ainsi un rôle direct dans l'arrêt du cycle cellulaire <sup>399,402-404</sup>.

TIMP-2 et IGFBP7, sont considérés comme un couple de biomarqueurs associé à l'arrêt du cycle cellulaire, une réponse cellulaire classique à divers stress physiologiques ou pathologiques comme nous l'avons vu précédemment <sup>254,399</sup>. Leurs concentrations urinaires augmentent, bien que de manière variable, en réponse à diverses agressions rénales aussi bien dans les modèles animaux <sup>395</sup> qu'en pathologie humaine <sup>405-420</sup>. Cela serait la conséquence d'une libération accrue du contenu cellulaire épithélial principalement tubulaire proximal bien que d'autres mécanismes tels une augmentation de l'élimination urinaire des molécules plasmatiques secondaire à une augmentation de perméabilité glomérulaire ou une réduction de la réabsorption tubulaire proximale soient possibles (protéinurie > 1g/L) <sup>395</sup>. Cette augmentation, bien que de timing variable suivant le contexte, est précoce : détectable dès 1h post agression avec un maximum vers 4 à 6 heure en post-chirurgie cardiaque par exemple <sup>406-408,411,421,422</sup>.

Le produit de ces concentrations [TIMP2] \* [IGFBP7] / 1000, sans normalisation <sup>399,423</sup>, a pu être validé dans le diagnostic précoce de l'AKI en contexte divers. Les performances semblent très correctes pour la détection des AKI modérées à sévères (KDIGO 2/3) dans diverses agressions (AUC variables 0.7-0.97 mais généralement voisines de 0.85) <sup>399,405,406,408,411-416,419,420,422,424</sup>. Le bénéfice de cet indicateur semble moins net pour le diagnostic d'IRA tout stade (AUC 0.58-0.9) <sup>407,409,410,412,413,416-418,420-422,425-431</sup>. Le seuil utilisé, bien qu'encore débattu, se situerait entre 0.2 et 0.4 (ng/mL)<sup>2</sup>. En complément de cet intérêt diagnostique, ce produit présente un possible intérêt pronostique permettant de détecter les AKI persistantes <sup>432</sup> et le risque de progression vers des stades plus élevés <sup>433</sup>. C'est également le seul marqueur ayant prouvé sa capacité, dans le contexte d'une chirurgie cardiaque avec circulation extra-corporelle, à identifier précocement (4h post CBP) un sous-groupe de patient pour lequel une prise en charge plus intensive (optimisation glycémique, optimisation hémodynamique, éviction néphrotoxique, surveillance rapprochée...) permet de réduire le risque d'IRA <sup>434</sup>.

Néanmoins ce produit présente plusieurs inconvénients :



- Bien que considéré comme un marqueur de souffrance épithéliale, il est surtout performant pour détecter des IRA modérées à sévères et moins les IRA légères ou infracliniques. Pourtant, ces dernières sont également associées à un pronostic général ou fonctionnel péjoratif et potentiellement autant, voire même plus, accessibles à un traitement <sup>10,28</sup>.
- Ses performances surtout validées dans des indications standardisées principalement en réanimation mais sont moins clairement évaluées en contexte tout venant avec parfois des performances décevantes <sup>435</sup>.
- Leurs performances semblent dépendantes de l'étiologie de l'IRA et des anomalies urinaires associées. Celles-ci sont altérées dans certaines pathologies comme la néphrotoxicité des sels de platine où leur apport diagnostique est rapporté comme nul par certaines études <sup>429</sup> ou encore en cas de protéinurie > 1g/L <sup>395</sup>.
- Le cut-off optimal est aussi potentiellement dépendant du contexte notamment en présence d'une insuffisance rénale pré-existante <sup>436</sup>.

Ces marqueurs ont été approuvés pour utilisation en Europe et aux États-Unis et peuvent être dosés par des kits de dosage commerciaux (NephroCheck®, AKIRisk®).

### **B.1.c. Marqueurs de souffrance épithéliale :**

Cette famille de marqueurs témoigne de la présence d'une souffrance avec changement de différenciation au sein de l'épithélium tubulaire.

#### **B.1.c.1. NGAL :**

*Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)*, aussi appelée lipocaline-2 (LCN2) ou sidéocaline, est un polypeptide de 25 kDa, exprimé faiblement par de nombreux tissus et types cellulaires en conditions basales <sup>261,437,438</sup>. Son expression est fortement et précocement (dès 1 à 3 heures) induite en réponse à une agression ischémique ou toxique au sein du tissu rénal accompagnée d'une accumulation particulièrement importante au sein du tubule proximal <sup>439,440</sup>. Cette augmentation d'expression s'accompagne d'une augmentation précoce de sa concentration urinaire et plasmatique, détectable dès 1 à 3 heures avec un maximum 6 à 12 heures après l'agression <sup>440-446</sup>. Il présente des performances diagnostiques variables (AUC 0.60-0.95) en fonction de la situation d'étude avec une particulière efficacité dans certains contextes, en cas d'agression précisément datée et d'absence de MRC préexistante <sup>261,263,340,341,392,446-452</sup>. Dans certaines études il semble même le plus performant <sup>341</sup>.

### *B.1.c.2. Soluble Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) :*

KIM-1, aussi appelé T cell immunoglobulin mucin domains-1 (TIM1) ou Hepatitis A virus cellular receptor-1 (HAVCR-1), est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 (104 kDa)<sup>135</sup>. KIM-1 n'est pas détectable dans le rein en conditions normales<sup>134,453</sup> mais son expression est fortement induite en contexte de diverses agressions rénales au pôle apical des cellules tubulaires proximales en souffrance/dédiérenciées chez l'animal ou l'humain<sup>134,453-461</sup>. KIM-1 est potentiellement clivé enzymatiquement par des métalloprotéases dans sa région juxta-membranaire libérant KIM-1 soluble (sKIM-1 90 kDa) détectable dans les urines<sup>135,454,460,462-464</sup>. Son excrétion urinaire est corrélée à la souffrance tubulaire proximale et à l'expression tissulaire rénale induite de KIM1 dans des modèles animaux<sup>454</sup> mais aussi en pathologie humaine<sup>453,460</sup>. La cinétique de ce sKIM1 dans les urines est variable suivant le type d'agression mais semble relativement précoce. Dans le modèle de l'agression rénale ischémique (ischémie reperfusion ou chirurgie cardiaque programmée avec CEC), mécanisme lésionnel le plus classique, une augmentation très précoce (2-3h) est détectable avec un maximum à 48h puis une décroissance lente sur plusieurs jours<sup>446,460,464-466</sup>. Plusieurs études ont confirmé que l'utilisation du ratio sKIM-1/Créatinine permet de diagnostiquer de manière efficace et précoce une souffrance tubulaire proximale dans divers modèles animaux avec une meilleure efficacité que les marqueurs traditionnels (créatinine sérique, urée sanguine)<sup>454,467</sup>. Chez l'homme, les résultats sont plus contrastés avec des performances variables suivant les études et les mécanismes de l'IRA AUC = 0.71 - 0.92<sup>340,341,446,448,465,466,468,469</sup>. La seule méta-analyse disponible estime une performance globale AUC à 0.86 dans le diagnostic de l'IRA en divers contextes d'agression<sup>470</sup>.

### *B.1.c.3. Liver Fatty Acid Binding Protein (L-FABP):*

Liver Fatty Acid Binding Protein (L-FABP ou FABP-1) est une protéine de 127 aa (14-15 kDa) principalement exprimée au sein du foie mais également par de nombreux autres organes tel le rein, le tube digestif, le pancréas ou encore le poumon dans divers type cellulaires<sup>262,471,472</sup>. Dans le rein humain, L-FABP est fortement représentée, au sein des cellules de l'épithélium tubulaire proximal<sup>262,471,473</sup>. L'origine de la protéine identifiée dans le tubule proximal n'est pas clairement identifiée, celle-ci pouvant être issue d'une expression locale mais aussi d'une réabsorption via le couple mégaline/cubuline après filtration dans l'urine primitive<sup>474</sup>. A noter que chez les rongeurs, son expression rénale est extrêmement faible justifiant le recours à des modèles transgéniques pour étudier sa fonction et sa redistribution après agression<sup>475,476</sup>. Son expression basale est potentiellement régulée au niveau transcriptionnel par de nombreux facteurs de transcription (HNF1, SRE, PPAR...) <sup>472</sup>, des conditions pathologiques (dyslipidémie) mais aussi certains traitements (Statines, Fibrates)<sup>262,472</sup>. Son expression tissulaire rénale et sa libération urinaire sont augmentées très précocement<sup>261,443,448,451,477-483</sup> en contexte de diverses agressions à la fois chez l'homme et l'animal<sup>448,450,451,473,476-482,484,485</sup>.

Son dosage urinaire peut être utilisé comme marqueur de lésion épithéliale (marqueur de souffrance épithéliale) de l'IRA avec de bonnes performances (AUC 0.7 - 0.96) dans divers contextes d'agression et à différents timing précoces (H0-H12) <sup>261,340,341,448-452,477-483</sup>. Il pourrait même avoir des propriétés prédictives avant certaines agressions pour la survenue d'une IRA <sup>478,486</sup> ou après d'autres pour la progression <sup>487</sup>. L'utilisation de son taux sanguin, bien que moins documentée, est aussi évoquée comme marqueur diagnostique potentiel dans une forme particulière d'IRA, notamment la (survenue d'un retard à la reprise de fonction rénale post-transplantation) dans une petite cohorte de 67 malades, avec des bonnes performances (AUC 0.9) <sup>488</sup>.

#### *B.1.c.4. Interleukine 18 :*

L'interleukine 18 (IL-18) est une cytokine appartenant à la superfamille IL-1 <sup>254,262,489,490</sup>. Le précurseur de cette cytokine est exprimé par les cellules immunitaires, mais aussi certaines cellules épithéliales notamment un sein du tubule proximal rénal, sous la régulation de NFκB. Ce précurseur nécessite un clivage, principalement par la Caspase 1 après assemblage de l'inflammasome NLRP3, pour former son dérivé bioactif, l'IL-18 (18kDa), ensuite libérée dans le milieu extérieur où il va agir sur différents récepteurs spécifiques (IL18r) induisant un effet proinflammatoire (stimulation de l'expression de IFNγ, stimulation de la cytotoxicité, expression des molécules adhérence, expression de chimiokines pro-inflammatoires...). L'IL18 est décrite comme impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires (Psoriasis, NigA, MICI, Still, SEP, asthme, SARS...) <sup>254,489,490</sup>. L'expression de l'IL18 est induite dans le rein, principalement en lien avec une augmentation de l'expression épithéliale, de manière caspase-1 dépendante, en réponse à de nombreux modèles animaux d'IRA <sup>262,491,492</sup>. Sa concentration urinaire est également augmentée précocement (admission ou <24h) en pathologie humaine dans de nombreuses situations d'IRA avec lésions tubulaires proximales et associées à un pronostic péjoratif <sup>392,493-496</sup>. Néanmoins ces performances sont imparfaitement reproductibles et au plus équivalentes aux autres biomarqueurs pour le diagnostic IRA AUC 0.7 (0.58-0.83) <sup>340,341,392,495,497-500</sup>.

#### **B.1.d. Les Omics :**

L'avènement de nouveaux outils technologiques, notamment la spectrométrie de masse et éventuellement les procédés de séparation moléculaire, a permis l'évaluation à grande échelle et sans a priori certaines classes moléculaires dans les urines ou le sang après agression avec l'objectif de permettre un diagnostic plus précoce et une stadification plus fine de ces épisodes <sup>501-504</sup>.

Plusieurs classes moléculaires peuvent ainsi être évaluées avec chacun leurs avantages et inconvénients :

- Le protéome : Il correspond à l'étude des assemblages d'acides aminés de plus fort poids moléculaires (> 10 kDa). Il est porteur d'une information assez étendue avec des concentrations assez facilement détectables dans divers fluides biologiques. Il présente l'avantage d'être très proche de la physiologie, déterminé par

l'abondance de la protéine issue de sa production et/ou de sa libération avec une interprétation possible sur le plan mécanistique. Il présente l'inconvénient de nécessiter un pré-traitement plus important et d'une moins grande reproductibilité. Il est également peu stable dans les échantillons après collection notamment en lien avec l'hydrolyse spontanée ou enzymatiques des protéines dans les fluides biologiques <sup>502,504</sup>.

- Le peptidome : Il correspond à l'étude des peptides, assemblages d'acides aminés de faible poids moléculaires (< 10 kDa). Il est porteur d'une information complexe en raison de sa très grande diversité avec des concentrations assez facilement accessibles dans les fluides biologiques et des variations plus rapides après exposition à un stress aigu tel l'ARA. Il ne nécessite qu'une procédure d'extraction simple sans digestion préalable avant analyse sur machine. Il présente également l'avantage de plus grande reproductibilité et stabilité dans les échantillons que le protéome ou le métabolome. (Klein 2016) Cependant il présente certaines limites : il est déterminé certes par la disponibilité des protéines sources mais également par l'activité de protéases et endopeptidases rendant une interprétation physiopathologique complexe ; il est porteur d'une diversité importante posant des problèmes lors de l'analyse biostatistique (fausse découverte, overfitting) ... <sup>502,504</sup>

- Le métabolome : Il correspond à l'évaluation des composés de très faible poids moléculaire (< 1-1.5 kDa) à l'image des lipides simples, des acides aminés, des hydrates de carbones et de leurs dérivés. Son étude est plus récente en lien avec des difficultés techniques supplémentaires. Il est porteur d'une information plus simple, en raison de sa plus faible diversité. Cependant, les concentrations de métabolites varient plus rapidement ("en temps réel") que les protéines ou même les transcrits, en faisant un candidat intéressant pour évaluer l'adaptation à des situations de stress aigu comme l'ARA notamment dans l'optique d'identifier des biomarqueurs précoces. Il présente également l'avantage de pouvoir être exploré par certaines techniques ne nécessitant qu'une préparation limitée (RMN) comparativement aux autres techniques <sup>501,502</sup>. Il présente néanmoins un certain nombre de limites : une moindre stabilité de ces composants dans les échantillons nécessitant une analyse rapide après prélèvement sous peine de biais techniques important ; une possible influence par des facteurs environnementaux indépendant de la situation pathologique étudiée (apport alimentaire ou IV...) ; une plus grande simplicité limitant de facto l'information apportée ; la moindre sensibilité notamment de certaines techniques ne permettant une quantification que des espèces les plus abondantes notamment dans certains fluides biologiques <sup>501,502,504</sup>.

Ces diverses approches sans à priori, ont permis la découverte ou la confirmation de nouveaux candidats biomarqueurs, détectables principalement dans les urines de modèles animaux d'IRA <sup>505-508</sup> ou de patients IRA <sup>393,505,509-515</sup> mais également dans le sérum <sup>506,516</sup>.

Ces nouvelles techniques ont aussi abouti à l'émergence du concept de signature. Ce concept pousse à l'extrême l'idée de base qu'un seul biomarqueur ne permettant pas d'appréhender la complexité de ce syndrome, une combinaison d'un nombre plus ou moins important de ces marqueurs serait bien plus performante pour détecter et classer les épisodes d'IRA.<sup>502</sup> Plusieurs études ont identifié des signatures Omics permettant un diagnostic précoce d'IRA avec des performances supérieures (AUC 0.8-0.9) aux biomarqueurs traditionnels dans différentes situations aussi bien par peptidomique<sup>517-520</sup>, qu'en protéomique<sup>521,509,512</sup> ou par métabolomique<sup>507,514</sup>.

### Concept de signature

- Combinaison de multiples marqueurs permettant d'identifier des groupes d'individus ayant des risques différents de présenter un événement.
- Ce type d'approche s'avère particulièrement intéressante dans les situations où les déterminants de la survenue de l'événement sont multiples comme dans l'IRA.
- L'idée est que chaque marqueur unitaire est peu performant car il n'explore qu'une partie des mécanismes. Par contre la combinaison de plusieurs marqueurs complémentaires, explorant divers mécanismes en jeu, au sein d'une signature permet d'avoir une vision d'ensemble des processus à l'œuvre et donc optimise les performances.

A titre d'exemple, on peut citer la signature peptidomique diagnostic précoce de l'IRA publiée par Metzger et al (Metzger 2010). Celle-ci, malgré un très faible effectif (n = 30 en découvert et 20 en validation, n = 110 en validation), permettait de diagnostiquer précocement la survenue d'une IRA dans le contexte des patients de soins intensifs tout venant mais aussi en greffe de moelle osseuse ou en chirurgie cardiaque avec des performances correctes (AUC 0.81-0.90) et supérieures aux biomarqueurs urinaires classiques (KIM-1, NGAL)<sup>518,519</sup>.

Néanmoins plusieurs limites s'opposent à l'utilisation de telles techniques pour le moment en routine. Déjà, le manque de disponibilité en pratique courante, réservant l'utilisation de tels outils à quelques centres spécialisés. De plus, la lourdeur technique de certaines approches nécessitant un temps de manipulation et d'analyse important (plusieurs heures voire jours) avant rendu du résultat non compatible avec un diagnostic précoce et donc une utilité clinique. Enfin, l'interprétation de ces analyses est complexe avec des biais potentiels attribuables au processus de standardisation des spectres, à l'identification des peptides, à la normalisation des abondances et au traitement biostatistique complexe des données (sélection des peptides informatifs, gestion des valeurs manquantes, choix de la signature et construction des modèles).

#### B.1.e. Autres marqueurs :

Comme nous l'avons évoqué plus haut, de très nombreux autres marqueurs ont été développés et validés dans le diagnostic précoce mais avec un moins bon niveau de preuve. On pourra citer à titre d'exemple : la N-acetyl-Glucosaminidase (NAG)<sup>446,448,469,522</sup>, la Selenium-Binding Protein 1 (SBP1)<sup>523</sup>, l'alpha-1-antitrypsine<sup>524</sup>, la calprotectine<sup>525</sup>, Gamma-glutamyl transpeptidase<sup>263,526</sup>, la phosphatase alcaline<sup>263,527</sup> ou encore la

Glutathione-S-transferase <sup>263,527</sup>. Bien d'autres ont fait l'objet de publication isolés <sup>502</sup>. Cependant ces marqueurs étant à un stade très préliminaires, nous n'en détaillerons pas les propriétés.

## **B.2. Les outils d'optimisation de la mise en œuvre des critères diagnostiques**

:

Au-delà de la découverte et la validation de nouveaux marqueurs diagnostiques, un axe majeur d'amélioration est de permettre la mise en œuvre optimisée des marqueurs existant et à venir pour le diagnostic de l'ARA.

### **B.2.a. Approches multimodales intégrées et place du Big Data :**

Un premier axe possible d'optimisation de la mise en œuvre de marqueurs actuels correspond à leur combinaison à travers les nouveaux outils numériques afin d'obtenir des modèles diagnostiques plus performant. L'efficacité de ce type d'approche est sous tendue par le fait que l'IRA est un syndrome complexe de par son hétérogénéité et l'intrication pour chaque étiologie des mécanismes et déterminants diverses, dont l'appréciation correcte est impossible à partir d'un marqueur unique. La combinaison de divers marqueurs cliniques ou biologiques, et éventuellement la prise en compte de leur évolution au cours du temps, pourrait mieux appréhender cette complexité et faciliter le diagnostic d'IRA.

Ces combinaisons peuvent d'abord prendre la forme de scores multimarqueurs intégrant simultanément différents marqueurs de l'IRA dont la combinaison offre une performance diagnostique supérieure aux marqueurs isolés. Un bon exemple de ces combinaisons de marqueurs correspond aux signatures Omics, qui, bien qu'obtenues en une seule exploration, contiennent intrinsèquement cette propriété combinatoire que nous avons déjà abordées plus haut. Mais ces combinaisons multimarqueurs se développent au-delà des Omics avec des applications pratiques plus envisageables à court terme. Une combinaison de marqueur déjà utilisée correspond au couple TIMP2/IGFBP7 détaillé plus haut. Plusieurs études ont évalué l'efficacité d'autres combinaisons avec un certains gain de performances avec pour le moment un manque de validation externe <sup>261,430,446,450,464,469,528,529</sup>.

Ces combinaisons peuvent également prendre la forme des scores ou algorithmes combinés intégrant des données cliniques de bases et un ou plusieurs biomarqueurs diagnostiques. Ce type d'approche est particulièrement intéressant car les données cliniques sont souvent assez facilement disponibles pour être intégrées sans examen supplémentaire dans la combinaison avec des biomarqueurs. Du coup ce type de procédure n'implique pas de coût ou de délai supplémentaire en dehors de la mise en œuvre de l'algorithme ou du calcul du score. Certains auteurs ont formalisé ce concept sous le terme "angor rénal" par analogie avec le raisonnement dans la prise en charge du syndrome coronarien aigu et la troponine sans véritablement convaincre <sup>530</sup>. De nombreuses études ont ensuite évalué différentes combinaisons dans différents

contextes avec un certain succès notamment en termes de précocité et d'optimisation des performances <sup>409,430,529,531-534</sup> malgré quelques déceptions <sup>426</sup>.

Enfin une autre méthode correspond à l'étude de la cinétique de ces biomarqueurs, éventuellement associée à l'intégration d'autres paramètres, afin d'identifier des trajectoires permettant soit d'améliorer le diagnostic soit de mieux prédire la sévérité ou l'évolution. A l'extrême ce type de procédure pourrait permettre une évaluation en temps réel de l'évolution du risque en fonction des différentes données disponibles et interventions thérapeutiques. Ces approches, bien que plus complexes à mettre en œuvre donnent de premiers résultats intéressants <sup>420,520,531,532,535</sup>.

Ces nouvelles approches, prometteuses, sont encore à un stade très précoce et nécessitent encore des optimisations et surtout des validations externes solides avant une utilisation.

### **B.2.b. Détection automatisée et e-alert :**

Depuis quelques années, permis par les progrès technologiques et la numérisation des systèmes d'information médicaux, de nouveaux programmes automatisés de détection des critères KDIGO se sont développés pour permettre une meilleure détection de l'IRA.

Ces programmes sont capables d'identifier précocement l'apparition de critères KDIGO par screening, permanent ou intermittent, de l'ensemble des données disponibles pour tous les patients, notamment les bilans biologiques et les surveillances de diurèses. En cas d'apparition de critères KDIGO, des e-Alerts sont envoyés aux soignants pour inviter à la mise en route de mesures adaptées <sup>20,536</sup>.

La première évaluation de ces e-Alert pour le diagnostic de l'IRA a été publiée en 1994 par Rind et al. Depuis de nombreux autres projets de ce type ont été développés et mis en fonction à travers le monde, l'un des plus ambitieux étant celui NHS <sup>537-540</sup>.

Ces e-Alerts ont fait la preuve de leur capacité à améliorer la sensibilité et la rapidité de diagnostic dans certaines études, surtout sur les IRA acquise en hospitalisation <sup>537-539,541</sup>. Les résultats sont en revanche décevants pour le diagnostic des IRA communautaires, avec un important retard à la détection, principalement en raison de l'absence de numérisation ou d'intégration des données ambulatoires <sup>20,536</sup>.

Cependant, ces e-Alerts, lorsqu'elles sont utilisées seules, ne semblent pas apporter de bénéfice majeur sur des critères cliniques durs, étant incapable de réduire la mortalité (OR 1.05 [0.84-1.31]) ou le recours à la dialyse (OR 1.20 [0.91-1.57]) <sup>542</sup>, malgré quelques discordances entre les études <sup>541,543,544</sup>. Cependant, leur utilisation associée à des explorations et une optimisation thérapeutique systématique ("Care Bundle") donnent des résultats prometteurs avec réduction de la progression de l'IRA, de la mortalité et de la durée de séjour <sup>20,545-549</sup>.

Ces e-Alerts, bien qu'encore à un stade précoce de développement, représentent donc des outils potentiellement intéressants pour la prise en charge de l'IRA.

### **B.3. Enjeux actuels et futurs de la recherche pour le diagnostic de l'IRA :**

Actuellement le domaine du diagnostic de l'IRA est probablement à la veille d'une profonde transformation avec plusieurs challenges majeurs que la recherche et la pratique médicale devront relever dans les années à venir.

Le principal challenge est le changement de paradigme pour redéfinir l'IRA en pratique clinique. Celui-ci sera notamment permis à court termes par le développement et l'avènement de nouveaux biomarqueurs plus performant par leur capacité à identifier correctement les patients souffrant d'une IRA au-delà de l'altération fonctionnelle, leur précocité, leur capacité à mieux apprécier le mécanisme et la sévérité de la souffrance rénale. Certains biomarqueurs prometteurs sont déjà arrivés sur le marché et devraient rapidement être évalués en pratique clinique quotidienne à l'image du couple TIMP2/IGFBP7 avec pourquoi pas à la clé des premières modifications des recommandations KDIGO. Néanmoins, ces marqueurs disponibles montrent déjà certaines limites en fonctions des contextes et des objectifs imposant de poursuivre ce champ de recherche.

Un autre enjeu majeur à venir, est la prévisible complexification des outils de diagnostic pour parvenir à mieux identifier, caractériser et traiter les épisodes d'IRA, qui représentent un ensemble trop hétérogène pour être correctement caractérisé par un seul marqueur. Cela sera permis notamment par l'arrivée des nouvelles technologies numériques (big data), permettant l'intégration d'un ou plusieurs biomarqueurs, mais aussi de données cliniques avec de possibles considérations temporelles (trajectoires). Le domaine de la Santé est en retard sur cette voie de la transformation numérique mais les avancées observées dans d'autres domaines (industrie, militaire, surveillance, internet...), permettent d'imaginer l'impact potentiel de telles approches dans notre discipline. Ces outils pourront représenter des aides précieuses en pratique d'ici quelques années pour mieux adapter nos prises en charge à chaque individu. Ainsi paradoxalement, ces approches large échelles impersonnelles représentent probablement une étape importante vers la médecine personnalisée après laquelle nous courrons depuis des décennies.

Enfin, un autre challenge important correspond à l'automatisation de certaines tâches de surveillance ou de diagnostic grâce notamment aux recours aux algorithmes « d'IA ». Un premier exemple déjà mis en pratique dans certaines structures correspond à la surveillance automatisée des registres biologiques et cliniques pour la détection des épisodes d'IRA. Ces systèmes d'e-Alert et les prises en charge standardisées associées (« care bundle ») vont être évaluées à large échelle, et sont amenées à se complexifier avec l'apport des nouveaux outils technologiques, diagnostiques et thérapeutiques modifiant en profondeur notre pratique. Cela permettra probablement à terme une meilleure efficacité mais aussi de libérer du temps médical et paramédical pour des activités à plus forte valeur ajoutée.



Tous ces challenges laissent présager une grande dynamique des activités de recherche dans ce domaine avec de probables percées majeures dans les années à venir.

Un autre enjeu simple, plus pragmatique, moins intéressant en termes d'activité de recherche mais pourtant tout à fait essentiel sera également d'améliorer l'information, la formation des soignants et l'accessibilité à ces outils diagnostiques (même simples) dans la pratique courante en particulier dans des régions médicalement sous dotée. Cela est particulièrement vrai dans les pays en développement et correspond à un enjeu de santé publique majeur au niveau international <sup>12</sup>.

### **C. Prédire l'IRA :**

Un autre enjeu qui pourrait permettre d'améliorer la prise en charge de l'IRA est de développer des outils permettant d'identifier les sujets les plus à risque d'IRA avant même la survenue d'une agression rénale.

Une meilleure évaluation systématique du risque d'IRA préexposition revêt plusieurs intérêts en permettant:

- *de mieux évaluer le bénéfice/risque d'une intervention.* Cela permettrait d'optimiser l'information du patient mais aussi d'aider les médecins dans la prise de décision. Ainsi cette meilleure évaluation du risque pourrait permettre chez les sujets les plus à risque, soit d'éviter l'intervention si celle-ci n'est pas indispensable, soit d'orienter ces malades vers des alternatives moins pourvoyeuses d'IRA lorsqu'elles existent.
- *de limiter au maximum les autres facteurs aggravants* et d'optimiser les mesures de néphroprotection chez ces patients à haut risque.
- *de mettre en place des protocoles de surveillance rapprochée* pour détecter systématiquement et plus précocement l'IRA dans ces groupes à haut risque.
- *de faciliter la mise en place de traitement ciblés.* Via l'identification de populations restreintes avec une incidence élevée de l'événement, on pourra dans un premier temps réduire l'échantillon nécessaire pour le design d'essai thérapeutiques qui sont extrêmement complexes à mettre en œuvre (coût, recrutement de patients). A plus long terme, en cas d'identification de traitements efficace, l'identification d'une population à risque particulièrement élevé en pratique courante, permettra de restreindre l'usage du traitement (limitation des EI issus du traitement de patients à faible risque, optimisation des bénéfices en traitant uniquement les patients à haut risque, réduction des coûts).

Cette approche est particulièrement intéressante lorsque l'agression est programmée ou au moins prévisible. Deux grands exemples, faisant l'objet de nombreuses études sont l'injection d'un produit de contraste iodé pour examen programmé ou la chirurgie cardiaque avec CEC programmée qui ont déjà fait l'objet d'études en ce sens. Ce type d'approche en contexte d'IRA tout venant est plus complexe à envisager. Néanmoins, la transformation numérique des infrastructures de soin, déjà en marche, et la progression des

outils permettant le traitement de données à grande échelle (Big Data), permettent d'espérer dans un avenir relativement proche, l'apparition de ces aides dans la pratique courant sous la forme d'alertes électroniques simples voire même d'aide plus formelles à la prise en charge <sup>20</sup>.

Dans cette optique de prédiction plusieurs stratégies de complexité croissante sont possibles : simple recensement des facteurs de risque ; création de scores basés sur des données cliniques et éventuellement biologiques de routine ; dosage de nouveaux biomarqueurs spécifiques éventuellement combinés aux données de routine ; l'utilisation d'outils complexes intégrant en tant réels de multiples données disponibles (clinique, biologique, biomarqueurs prédictifs).

### **C.1. Identification des facteurs de risque :**

La première stratégie, la plus habituelle, vise à identifier les facteurs de risque clinique d'apparition d'une ARA chez les patients. Ainsi leur accumulation permet d'identifier des patients particulièrement à risque d'adapter des prises en charge spécifique <sup>20</sup>.

Des facteurs prédisposants ont pu être identifiés, sur des bases épidémiologiques ou physiopathologiques. Malgré un corpus commun, beaucoup de facteurs sont spécifiques de l'agression en cause rendant un recensement de facteur de risque généraux assez complexe. Ces facteurs de risques peuvent concernés soit le terrain soit l'agression et peuvent être séparés en non modifiables ou modifiables. Ces facteurs ne sont pas forcément indépendants et peuvent interagir entre eux au-delà d'un simple effet additif <sup>550</sup>.

Un certain nombre de caractéristiques non modifiables du patient représentent des facteurs de risque d'IRA. Le principal, comme nous l'avons évoqué précédemment, retrouvé dans l'ensemble des IRA, correspond à l'existence d'une altération de la capacité de filtration maximale définie par une altération du DFG ou à défaut de la réserve fonctionnelle rénale <sup>13,15,408,422,451,550-564</sup>. Certaines caractéristiques démographiques sont également impliquées dans un surrisque d'IRA telle l'avancé en âge <sup>13,61,422,451,550,551,553,554,556-562,564-566</sup>, le sexe <sup>13,61,422,550,553,558,565-569</sup> ou encore certains origines ethniques <sup>550,553,564</sup> néanmoins à nuancer car largement explicable par l'intrication de facteurs de confusions notamment certaines comorbidités et facteurs socio-économiques <sup>570</sup>. Certaines comorbidités semblent particulièrement associées à la survenue d'une ARA à l'image de l'hypertension artérielle <sup>61,422,551,552,556,558,563,566,571</sup>, du diabète <sup>15,61,422,551-553,555,556,558-561,564,566,569,571</sup>, de l'insuffisance cardiaque <sup>13,15,422,553,554,556,558,559,561-563,566</sup> ou des hépatopathies <sup>15,61,563</sup>. Enfin, certains polymorphismes génétiques semblent jouer un rôle dans la survenue et la récupération après IRA dans diverses situations cliniques mais leur exploration reste superficielle. Ces facteurs, bien qu'ayant une influence, ne semblent pas être des déterminants majeurs notamment de la survenue d'une IRA mais semblent avoir un rôle plus marqué sur la sévérité et l'évolution de l'IRA <sup>503,572</sup>. Divers polymorphismes candidats associés à un surrisque ont été identifiés avec des résultats parfois discordant en fonction des études. Ils codent pour des acteurs de différents systèmes impliqués dans la physiopathologie de l'IRA notamment la réponse inflammatoire (TNFa <sup>573</sup> ; IL6 <sup>110,574,575</sup> ; IL10 <sup>573,574</sup> ; eNOS <sup>110</sup>) ou le système rénine-

angiotension-aldostérone (ACE <sup>110,575,576</sup> ; Angiotensinogène/Recepteur à l'Angiotensine type 1 <sup>110</sup>) ou d'autres systèmes (Vegfa <sup>572</sup>). Néanmoins, ces associations restent faiblement documentées, avec une accessibilité limitée en clinique courante, un caractère non modifiable et un surrisque associé assez limité.

Plus intéressant, certaines caractéristiques du patient modifiables sont associées à un risque accru d'IRA comme l'utilisation de traitements à risque (diurétiques <sup>13,551,553</sup>, AINS <sup>13,551,563</sup>, IEC/ARA2 <sup>13,553,563</sup>, inhibiteurs de la pompe à protons <sup>13,577</sup>, antibiotiques <sup>563</sup>), l'existence d'une anémie <sup>556,561,563</sup> ou encore certains facteurs sociaux-économiques <sup>551,578</sup>.

Enfin certains paramètres sont en lien avec les caractéristiques de l'agression et dépendent donc du contexte. Par exemple, dans le cas particulier de la chirurgie cardiaque avec CEC <sup>61,422</sup>, plusieurs facteurs ont été identifiés à l'image d'un contexte d'urgence avec état cardiovasculaire précaire préopératoire (urgence, FEVG, CPIA, endocardite <sup>557,564,565,569,571</sup>), des indicateurs d'une chirurgie techniquement complexe (BMI élevé <sup>565</sup>, chirurgie vasculaire ou combinée <sup>554,557,564,569</sup> ou un antécédent de chirurgie cardiaque antérieure <sup>557,565,569,571</sup>), une longue durée de circulation extra-corporelle <sup>79,554,562</sup> ou encore la survenue de complication notamment hémorragiques ou hémodynamique <sup>79,562,571</sup>. Dans le contexte des IRA induites par les produits de contraste, le type de produit utilisé, une osmolarité élevée et un volume important favorisent le risque d'IRA <sup>556</sup>.

Le recensement de ces facteurs de risque est facilement utilisable en pratique courante et fait partie implicitement du raisonnement médical quotidien. Néanmoins, cette méthode ne permet pas d'évaluation précise et objective du niveau de risque global, et ne permet qu'une appréhension simple ou éventuellement additive sans prise en compte de possibles d'interactions. De fait ce type de démarche n'est pas suffisante pour permettre une évaluation correcte du risque d'IRA et d'en prédire la survenue.

## **C.2. Création de scores cliniques ou clinico- biologiques sur les données de routines :**

La deuxième stratégie, consiste en le développement de scores clinique de risque basés sur des multiples prédicteurs simples antérieurs à l'apparition de l'IRA (terrain et éventuellement certaines caractéristiques de l'agression ou de la réponse précoce) dont les effets s'associent. Bon nombre de ces scores ont déjà été développés et validés dans divers contextes d'IRA <sup>20,503</sup>.

Ces scores représentent une piste intéressante d'aide à la décision en permettant une quantification plus objective et précise du risque par rapport à une approche intuitive par recensement des facteurs de risque. Cependant, tous ces scores, souffrent encore de nombreuses limites communes qui expliquent leur faible utilisation <sup>20,503</sup> :

- Même pour les plus simples, ils sont assez lourds à calculer manuellement en routine.
- Ils intègrent des variables prédictives dont l'obtention n'est pas évidente. Cela peut provenir de variables non recueillies ou numérisées systématiquement en dehors du centre où a été développé

le score mais aussi d'un codage différent en raison de changement de recommandations ou d'habitudes différentes suivant les centres ou les pays.

- Ces scores s'intéressent pour le moment encore à des situations trop restreintes (situations standardisées, national...), en lien avec des bases de données limitées. Le développement de très grandes bases de données internationales permettra probablement à terme le développement de scores de plus en plus pertinents et cohérents avec la pratique.
- Ils utilisent des critères de jugements non optimaux ou désuets dont la prédiction ne permet pas de cibler une population optimale dans l'optique de mettre en place des interventions efficaces.
- Beaucoup d'entre eux n'ont pas fait l'objet de validation dans des populations et centres indépendants limitant la généralisation de leur utilisation.
- L'existence de multiples scores dans chaque indication sans véritable référence nuit à l'émergence de protocole se basant sur leur utilisation.
- Leur apport est généralement jugé peu intéressant par les cliniciens comparativement à la lourdeur d'obtention. En particulier, il existe peu d'étude qui ont pu montrer un bénéfice clinique clair sur des critères pertinents en lien avec leur utilisation.

Dans le modèle de l'IRA secondaire à une chirurgie cardiaque, de nombreux scores prédictifs ont été développés mais reste peu utilisés <sup>20,61,422,503,579</sup>. Ces scores se positionnent pour une utilisation à des timing différents par rapport à l'agression, certains de ces scores se limitant à l'utilisation de données préopératoires <sup>564,566,569,580-583</sup> ou intégrant également des données per-opératoires <sup>562,582,584</sup> voire post-opératoires précoces <sup>582,585,586</sup>. Ces scores prédisent également des end-points différents. La plupart se concentrent sur la prédiction d'une IRA sévère avec recours à l'épuration extra-rénale <sup>564,569,581</sup>. Ce end-point, certes pertinent en termes de cout immédiat, n'est pas optimal en raison du mauvais pronostic de l'IRA indépendamment du recours à l'épuration extra-rénale et des probables plus grandes difficulté à obtenir un effet thérapeutique sur des IRA avec lésions aussi sévères. D'autres plus rares, prédisent la survenue d'une IRA avec des définitions proches de la classification KDIGO <sup>562,566,582-584,586</sup>. Enfin ces études s'intéressent à des populations légèrement différentes suivant le contexte chirurgical ou le contexte géographique, avec parfois des performances discordantes suivant les populations <sup>587</sup>. Nous détaillerons dans les tableaux ci-après les principaux scores prédictifs disponibles en se focalisant sur les plus référencés.

Score	CICSS <sup>580</sup>	Cleveland <sup>569</sup>	STS <sup>564</sup>	SRI Toronto <sup>581</sup>	Leicester <sup>583</sup>
Endpoint prédit	IRA nécessitant EER	IRA nécessitant EER	IRA nécessitant EER	IRA nécessitant EER	IRA KDIGO
Timing	Préopératoire	Préopératoire	Préopératoire	Préopératoire	Préopératoire
Nombre de variables	10	10	10 (ou 22)	8	8 ou 15
Variables utilisées	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Type de chirurgie,</li> <li>- DFGe,</li> <li>- CPIA,</li> <li>- Antécédents de chirurgie cardiaque,</li> <li>- NYHA,</li> <li>- AOMI,</li> <li>- FEVG,</li> <li>- Auscultation pulmonaire,</li> <li>- BPCO,</li> <li>- HTA.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sexe,</li> <li>- Insuffisance cardiaque,</li> <li>- FEVG,</li> <li>- CPIA,</li> <li>- BPCO,</li> <li>- Diabète traité par insuline,</li> <li>- Antécédents de chirurgie cardiaque,</li> <li>- Chirurgie urgente,</li> <li>- Type de chirurgie,</li> <li>- Créatinine sérique préopératoire.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Créatinine sérique préopératoire,</li> <li>- Age,</li> <li>- Type de chirurgie,</li> <li>- Traitement du diabète,</li> <li>- Infarctus du myocarde récent,</li> <li>- Ethnie,</li> <li>- Maladie respiratoire chronique,</li> <li>- Antécédent de chirurgie cardiaque,</li> <li>- NYHA,</li> <li>- Choc cardiogénique.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- FEVG,</li> <li>- Type de chirurgie,</li> <li>- Antécédents de chirurgie cardiaque,</li> <li>- Diabète,</li> <li>- DFGe,</li> <li>- Chirurgie urgente,</li> <li>- CPIA.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Age,</li> <li>- Sexe,</li> <li>- Tabac,</li> <li>- NYHA,</li> <li>- Diabète,</li> <li>- AOMI,</li> <li>- HTA,</li> <li>- Hb sanguine,</li> <li>- DFGe,</li> <li>- Héparinothérapie,</li> <li>- Coronarographie récente,</li> <li>- Statut tritronculaire,</li> <li>- FEVG,</li> <li>- Type de chirurgie,</li> <li>- Chirurgie urgente.</li> </ul>
AUC	0.68-0.78 557,569,579,581,588	0.80-0.86 579,581,589-591	0.75-0.83 579,581,591	0.73-0.82 579,581,589,591	0.74 583
Remarque	-	Utilisation dans la prédiction de l'IRA avec des performances moindres 565,590	Utilisation dans la prédiction de l'IRA avec des performances correctes 565,591	Utilisation dans la prédiction de l'IRA avec des performances correctes 565	Pas de reproduction des performances

Score	AKICS <sup>586</sup>	MCSPi <sup>562</sup>	Nah et al. <sup>584</sup>	Ng <sup>554</sup>	CSA-AKI <sup>582</sup>
Endpoint prédit	IRA AKIN	IRA AKIN	IRA AKIN	IRA RIFLE avant J30	IRA KDIGO
Timing	Postopératoire précoce	Postopératoire immédiat	Postopératoire immédiat	Préopératoire (x) ou Postopératoire précoce (*)	Préopératoire (x), Postopératoire immédiat (*) ou Postopératoire précoce (-)
Nombre de variables	8	8	8	10(x) ou 17(*)	5(x), 7(*) ou 8(-)
Variables utilisées	Préopératoires : - Age, - Créatinine sérique, - glycémie, - NYHA, - type de chirurgie, Peropératoire : - Durée CEC. Postopératoires : - Débit cardiaque altéré requérant 3 amines ou une CPIA, - PVC.	Préopératoires : - Age, - Pression artérielle pulsée, - Infarctus du myocarde, - Insuffisance cardiaque, - Maladie rénale chronique. Peropératoires : - Inotropes, - CPIA, - Durée CEC.	Préopératoires : - Age, - HTA, - Anémie, - DFG. Peropératoires : - Transfusion CGR, - CPIA, - Durée CEC, - Hématocrite minimal.	Préopératoires : - Age <sup>x</sup> *, - Sexe*, - Obésité <sup>x</sup> *, - Diabète <sup>x</sup> *, - Dyslipidémie*, - HTA*, - DFG <sup>x</sup> *, - Créatinine sérique <sup>x</sup> *, - Maladie respiratoire*, - Endocardite <sup>x</sup> *, - Insuffisance cardiaque <sup>x</sup> , - Type de chirurgie <sup>x</sup> *, - Chirurgie urgente <sup>x</sup> *, - Choc cardiogénique <sup>x</sup> *, - CPIA*. Peropératoires : - Durée CEC*, - CPIA*, - Transfusions*. Postopératoire : - CPIA*, - Transfusions*.	Préopératoires : - Sexe <sup>x</sup> *, - Age <sup>x</sup> *, - Maladie rénale chronique <sup>x</sup> *, - NYHA <sup>x</sup> *, - Antécédent de chirurgie cardiaque <sup>x</sup> *, - Type chirurgie *-. Peropératoire : - Transfusion CGR*-, - CEC-. Postopératoires : - Transfusion CGR-, - Bas débit cardiaque-.
AUC	0.61-0.85 <sup>579,586,587</sup>	0.8 <sup>562</sup>	0.75 <sup>584</sup>	0.77-0.81 <sup>554</sup>	0.74-0.82 <sup>582</sup>
Rmq	Performances moindres pour l'IRA KDIGO <sup>579</sup>	Pas de reproduction des performances	Pas de reproduction des performances		Pas de reproduction des performances

**Tableaux 4-5 : Tableaux de synthèse des scores prédictifs de la survenue d'une IRA après chirurgie cardiaque. (Inspiré de Huen et Parikh. <sup>579</sup>)**

Des scores similaires ont également été développés pour être utilisés dans d'autres situations d'agressions programmées comme par exemple d'autres chirurgies (Transplantation Hépatique <sup>592,593</sup>, Transplantation pulmonaire <sup>594</sup>, Chirurgie générale <sup>558</sup>...) ou l'administration de produits de contrastes iodés <sup>555,556,559,595-600</sup>. D'autres scores ambitionnent de prédire la survenue d'une IRA dans des contextes moins standardisés et non programmés comme chez les patients hospitalisés dans différents contextes : Urgences <sup>560,601</sup> ; Soins Intensifs <sup>563</sup> ; Hospitalisation générale <sup>561,602,603</sup>...

Ces scores ont longtemps été bridés par les faibles effectifs et le caractère très parcellaire et orienté des informations utilisées, mais depuis quelques années ce domaine est en évolution rapide en lien principalement avec la constitution progressive de bases de données de plus en plus volumineuses et complètes. De nombreuses publications récentes commencent à appliquer avec succès, aux premières banques de données en très grandes dimensions, des outils issus du "Big Data", nouveaux dans le domaine médical. Ces modèles beaucoup plus flexibles, permettent déjà de mieux apprécier la complexité du terrain et la nature de l'agression, comme l'atteste une augmentation des performances et un élargissement du champ d'utilisation nets. L'avènement récent de modèles intégrant en plus les informations en continue ouvre de nouvelles possibilités avec une prédiction glissante à chaque instant chez les patients hospitalisés <sup>599,602-606</sup>.

Bien qu'étant encore à un stade débutant, principalement limités par l'absence de numérisation systématique et complète des données de Santé, ces scores ouvrent des perspectives intéressantes vers une évaluation automatisée systématique des patients pour la détection des plus à risque de décompensation de tel ou tel organe qui sera très probablement un outil de routine dans un futur proche.

### **C.3. Identification de marqueurs prédictifs spécifiques et éventuelle combinaison aux scores :**

Malgré l'ensemble des progrès des différents scores prédictifs basés sur les données cliniques et biologiques de routines, leurs performances restent pour le moment largement imparfaites. L'identification de nouveaux marqueurs de susceptibilité à l'IRA, détectables avant même la survenue de l'agression, est une piste pour permettre une amélioration. Leur utilisation seuls ou en association avec des paramètres/scores cliniques, permettrait ainsi d'améliorer considérablement l'évaluation du terrain et du risque de survenue d'une IRA en réponse à diverse agressions. Quelques travaux ont été conduit dans ce sens, mais restent à un stade préliminaire, en particulier dans les modèles d'agression prévisibles que sont la chirurgie cardiaque ou l'injection de produits de contrastes <sup>20,503</sup>.

Un premier outil intéressant est l'évaluation de la fonction rénale maximale incluant l'évaluation du DFG et de la **réserve fonctionnelle** rénale en cas de normalité de celui-ci. Comme nous l'avons vu plus tôt, cette capacité fonctionnelle totale est un déterminant essentiel de la capacité d'adaptation à l'agression <sup>165,166,174</sup>. A l'heure actuelle, le DFG est couramment utilisé, considéré comme un facteur de risque majeur d'IRA dans

la plupart des agressions. Quant à l'évaluation de la réserve fonctionnelle en cas de normalité de celui-ci, elle est aussi possible par différentes techniques (DFG après charge en protéines, Index de résistance sans ou avec charge en protéines...) mais reste pour le moment réservée à des situations particulières notamment le bilan pré-néphrectomie, au vu de la complexité de mise en œuvre <sup>165,166,169,174,176</sup>.

Une autre piste intéressante correspond à l'identification de biomarqueurs ciblés sanguins ou urinaires. Un premier exemple est représenté par KIM1, dont la **concentration urinaire (normalisée sur la créatininurie) préopératoire** est significativement augmentée chez les patients développant une ARA (AKIN) après une chirurgie cardiaque programmée permettant de discriminer ces patients à haut risque avec des performances modestes (AUC 0.67 [0.57-0.77]) <sup>607</sup>. Une augmentation sanguine pré-agression avant injection de produit de contraste pour coronarographie a également été observée, mais avec des performances restant modestes <sup>608</sup>. Un autre marqueur, plus récemment identifié et plus prometteur, est **Dickkopf-3 (DKK3)**, un marqueur de stress épithélial dont une étude a montré le potentiel prédictif en chirurgie cardiaque programmée <sup>609</sup>. Le risque post-chirurgie de développer une IRA, selon les critères KDIGO, augmente en parallèle de la concentration urinaire de cette protéine (rapportée à la créatininurie). Ce ratio permet de prédire avec de bonnes performances la survenue d'une IRA post-chirurgie (AUC 0.78 [0.75-0.82]), validées dans une cohorte indépendante. Plus intéressant, cette augmentation est indépendante des facteurs de risque cliniques classiques d'IRA (âge, sexe, BMI, HTA, diabète, DFG, tabac) faisant espérer un bénéfice diagnostique au moins en partie additif avec l'apport des paramètres ou scores cliniques. Pour le moment, aucune validation externe de ce biomarqueur n'a pu être obtenue en contexte aigu. D'autres candidats potentiels émergent mais avec pour le moment des niveaux de preuve réduits, tel le sTNFR1/2, l'endogène ouabain <sup>503,610-612</sup>.

C'est dans ce cadre que les outils "Omics" (protéomique, peptidomique, métabolomique) pourraient avoir un apport majeur. D'une part en permettant d'identifier des candidats biomarqueurs comme cela a pu être fait dans de nombreux contextes <sup>502,613</sup>. D'autre part, ces techniques offrent aussi la possibilité de construire des modèles multimarqueurs complexes (signatures) avec une plus grande capacité de discrimination attendue qu'une molécule isolée <sup>614-620</sup>. A l'heure actuelle, à notre connaissance, aucune étude a proposé une utilisation de ces techniques avec un objectif prédictif avant l'agression notamment en chirurgie cardiaque.

Néanmoins, l'ensemble de ces marqueurs prédictifs restent à un stade très précoce avec encore beaucoup de place pour des améliorations. Pour aller encore plus loin dans l'optimisation de la prédiction, ces nouveaux marqueurs pourront éventuellement être intégrés dans des algorithmes plus complexes intégrant aussi des données cliniques ou biologiques.

#### C.4. Prédiction automatisée et alertes :



L'une des principales limites de l'ensemble de ces scores et biomarqueurs prédictifs correspond à leur lourdeur de mise en œuvre comparativement au bénéfice qu'ils apportent pour la prise en charge des malades. Cependant, à l'avenir, permis par la numérisation de l'ensemble des données médicales, le calcul de ces scores pourrait devenir automatique. Cela permettrait un calcul est une intégration systématique de l'évaluation des risques directement au logiciel de soins. Ce type d'approche est possible comme l'atteste plusieurs études conduites notamment au Royaume-Uni <sup>605,606,621</sup>.

Outre une prédiction automatique, ces approches d'évaluation automatisé du risque d'IRA peut s'associer à des mesures préventives standardisées (« care bundle ») dans le cadre de système de prévention plus complexes. Ce type de système a déjà fait preuve de son efficacité dans une étude en réduisant l'incidence de l'IRA hospitalière <sup>621</sup>. Néanmoins des validations externes de telles stratégies manquent pour le moment.

### **C.5. Enjeux actuels de la recherche dans ce domaine :**

Ce domaine de la prédiction de l'ARA est encore à un stade assez préliminaire mais représente un outil au potentiel important pour l'avenir. De nombreux champs d'amélioration restent à creuser.

Déjà, un premier axe d'amélioration est représenté par la validation externe des biomarqueurs prédictifs existants (DKK3) et la découverte de nouveaux afin de toujours mieux optimiser les performances. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que ce type d'approche ne permettra jamais une prédiction parfaite, une part des déterminants de l'IRA (dépendants de l'agression elle-même) n'étant pas accessible avant agression.

Un deuxième axe d'amélioration, va consister en l'optimisation des outils de prédiction. Cela sera permis par la massification des données disponibles (nombres de malades, nombre de variables) et l'apport des nouveaux outils permettant l'intégration de multiples prédicteurs d'origines différentes (MultiOmics).

Un troisième axe d'amélioration, préalable nécessaire à une utilisation en routine, sera le développement d'outils de prédiction automatisé et intégré aux systèmes de gestion des soins éventuellement assortit d'Alertes et de mesures standardisées. A l'extrêmes ces scores pourront être couplés à l'approche diagnostique continue en intégrant le risque d'IRA aux outils en permettant le diagnostic.

Enfin, les études manquent quant à l'efficacité de telles approches soit en pratique sur des endpoints cliniques durs (mortalité notamment), soit sur des stratégie de recrutement d'une population à risque en contexte d'essai clinique.

Cet axe encore en chantier représente donc un axe de recherche à fort potentiel avec une évolution spectaculaire prévisible dans les années à venir. Ces recherches pourront aboutir à une profonde modification de l'organisation des structures de soins ainsi que de la pratique clinique.

#### 4. Conclusion :

- L'IRA est un syndrome fréquent et grave qui regroupe en réalité un ensemble hétérogène de situations cliniques.
- Sa physiopathologie générale est encore incomplètement comprise mais implique notamment une adaptation initiale de l'épithélium tubulaire et des processus ultérieurs de réparation des lésions. Parmi l'ensemble des mécanismes adaptatifs, l'adaptation du métabolisme énergétique jouerait un rôle central en permettant régulant bon nombre de comportements épithéliaux (survie cellulaire, type de mort cellulaire, différenciation, phénotype pro-inflammatoire...).
- HNF-1 $\beta$ , un facteur de transcription connue pour réguler de nombreuses fonctions épithéliales notamment la fonction mitochondriale, est un bon candidat pour la régulation de la réponse épithéliale à l'agression, notamment sur le plan du métabolisme énergétique. Ce rôle pourrait expliquer une part du phénotype des patients porteurs d'anomalies de son gène.
- Les critères diagnostiques actuels de l'IRA sont imparfaits justifiant une recherche intensive sur de nouveaux outils. Outre la découverte de nombreux biomarqueurs toujours imparfaits mais présentant des avantages certains par rapport aux critères traditionnels, la transformation numérique des infrastructures de soins ouvre également d'autres perspectives. De même, le développement d'outils prédictifs, afin d'identifier des patients à haut risque pouvant bénéficier d'interventions ciblées, est prometteur.

# Travaux de thèse

Mon travail de thèse s'est intégré dans cette thématique de l'IRA en abordant les aspects physiopathologique et diagnostique.

Il s'est organisé en 3 axes :

- Un premier axe, physiopathologique, s'est intéressé au rôle du facteur de transcription HNF-1 $\beta$  dans la régulation du métabolisme, notamment bioénergétique, au sein des cellules tubulaires proximales.
- Un deuxième axe, thérapeutique, s'est intéressé aux anomalies de la voie de biosynthèse *de novo* du nicotinamide (NAD) à partir du tryptophane, en contexte d'agression rénale, et à évaluer l'efficacité d'une supplémentation en nicotinamide dans la prévention et le traitement de l'IRA.
- Un troisième axe, diagnostique, s'est intéressé à l'utilisation des outils « omics » pour le diagnostic de l'IRA.

Ce travail a abouti à trois publications acceptées pour publication ou en cours de révision, et deux autres en cours de préparation.

Ces trois années ont également été l'occasion de participer à d'autres projets, aboutissant à plusieurs articles en préparation ou publiés <sup>622-625</sup>. Cependant, vu leurs thématiques parfois éloignées de l'IRA et/ou des sciences fondamentales, ils n'ont pas été inclus dans cette thèse.

# Axe 1 : Rôle du facteur de transcription HNF-1 $\beta$ dans les cellules épithéliales tubulaires proximales sur l'orientation du métabolisme en conditions basales et d'agression.

## 1. Introduction :

Le premier axe de mon travail de thèse, physiopathologique, s'est intéressé au rôle du facteur de transcription HNF-1 $\beta$  dans la régulation du métabolisme notamment bioénergétique des cellules épithéliales tubulaires proximales en conditions basales et d'agressions.

Comme nous l'avons détaillé plus haut, *Hnf1b* est connu pour jouer un rôle dans la régulation de la biogénèse et la fonction mitochondriale, un régulateur majeur du métabolisme énergétique, au sein du tubule proximal. Cet effet serait dépendant de la régulation directe du gène *Ppargc1a* codant pour la protéine Pgc-1 $\alpha$ <sup>214</sup>. Un impact sur le métabolisme est décrit dans d'autres types cellulaires notamment tumoraux avec des conclusions discordantes<sup>210,252,626</sup>. La régulation du métabolisme énergétique est un élément clé de l'adaptation à l'agression notamment pour faire face à la réduction des apports en oxygène et limiter les lésions. La capacité à maintenir une production d'ATP suffisante et la capacité à réorienter son métabolisme ayant un rôle important notamment pour éviter la mort cellulaire, orienté celle-ci ou encore moduler le comportement cellulaire et de l'environnement. De plus, la capacité à réactiver un métabolisme énergétique normal post-agression a une importance centrale dans la réparation limitant notamment la progression d'une fibrose tubulo-interstitielle.

Nous avons donc fait l'hypothèse que l'invalidation d'*Hnf1b* induit une dysfonction du métabolisme énergétique mitochondrial s'accompagnant d'une réorientation vers la glycolyse suivie de fermentation lactique (Effet Warburg) anormale en condition basale. De plus, nous avons présupposé que ces anomalies empêchent toute adaptation supplémentaire à l'agression notamment hypoxique sensibilisant ces cellules.

Pour valider ces hypothèses nous avons réalisé des explorations métaboliques à large échelle et ciblées en se focalisant sur le métabolisme énergétique en condition basale et d'agression. A l'occasion de ces explorations, grâce à nos approches sans à priori, nous avons aussi mis en évidence d'autres anomalies métaboliques portant sur des voies différentes mais potentiellement intéressantes. Puis nous avons essayé, en utilisant des données de RNASeq déjà obtenues et publiées dans une autre lignée avec validation secondaire en approche ciblée dans nos cellules, de voir si quelques mécanismes explicatifs transcriptionnels était identifiables au-delà de la régulation de *PpargC1a*.

## 2. Publication :

# Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$ shapes the bioenergetic homeostasis of kidney tubule cells

Alexis PIEDRAFITA<sup>1,2,3</sup>, Stéphane BALAYSSAC<sup>4,5</sup>, Audrey CASEMAYOU<sup>1,2</sup>, Jean-Sébastien SAULNIER-BLACHE<sup>1,2</sup>, Alexandre LUCAS<sup>1</sup>, Jason S. IACOVONI<sup>1</sup>, Benjamin BREUIL<sup>1</sup>, Dominique CHAUVEAU<sup>1,2,3</sup>, Stéphane DECRAMER<sup>1,2,6</sup>, Myriam MALET-MARTINO<sup>4</sup>, Joost P. SCHANSTRA<sup>1,2,#</sup>, Stanislas FAGUER<sup>1,2,3,#</sup>

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 1297, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Hôpital Rangueil, F-31000 Toulouse, France

2 Université Paul Sabatier – Toulouse 3, F-31000 Toulouse, France

3 Département de Néphrologie et Transplantation d'Organes, Centre de Référence des Maladies Rénales Rares, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, F-31000 Toulouse, France

4 Groupe de RMN Biomédicale, Laboratoire SPCMIB, UMR CNRS 5068, Université Paul Sabatier, Centre National de la Recherche Scientifique, F-31000 Toulouse, France

5 Laboratoire des Interaction Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP), UMR 5623, F-31000 Toulouse, France

6 Service de Néphrologie, Médecine interne et Hypertension artérielle, Hôpital des Enfants, Centre de Référence des Maladies Rénales Rares, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, F-31000 Toulouse, France

# Equal contribution.

**Running title:** HNF-1 $\beta$  and bioenergetic metabolism.

**Keywords:** metabolism, kidney tubule, HNF-1 $\beta$ , hypoxia

**Word count:** abstract 250, text 2667

**Corresponding author:**

Prof. Stanislas FAGUER (MD, PhD)

Department of Nephrology and Organ Transplantation

University Hospital of Toulouse

1, avenue du Pr. Jean Poulhes

31059 Toulouse Cedex

Phone: +33 5 61 32 32 88

Fax: +33 5 61 32 23 51

Email: [stanislas.faguer@inserm.fr](mailto:stanislas.faguer@inserm.fr)

**Author contributions:** SF, DC, SD and JS designed the study; AP, AL and AC performed *in vitro* analysis; SB, BB, AP and MMM performed the metabolic analyses; JI and AP performed statistical analyses; SF, JS, JS, SB and AP interpreted the data; SF, JS and AP wrote the manuscript; All the authors approved the final version of the manuscript.

**Acknowledgements:** We greatly acknowledge the help of Jean-Emmanuel SARRY (Cancer Research Center of Toulouse) in reviewing the metabolomic data.

**Funding:** This work was partly funded by a European grant from the ERA PerMed initiative (KIDNEY ATTACK ANR-18-PERM-0003) and the "Fondation pour la Recherche Médicale" (grant number DEQ20170336759). AP was supported by a research grant from the Toulouse University.

**Disclosure:** Authors declared no conflict of interest.

**List of abbreviations**

AAs: aminoacids

AKI: acute kidney injury

BCAAs: branched chain amino-acids

ChIP: chromatin immunoprecipitation

NMR: nuclear magnetic resonance

PCA: principal component analysis

PT: proximal tubule

RT-: reverse transcriptase negative

TCA: tricarboxylic acid

WT: wild type

## Abstract

Energetic metabolism controls key steps of kidney development, homeostasis and epithelial repair following acute kidney injury (AKI). HNF-1 $\beta$  is a master transcription factor that controls mitochondrial function in proximal tubule (PT) cells. Patients with *HNF1B* pathogenic variant display a wide range of kidney developmental abnormalities and progressive kidney fibrosis. Characterizing the metabolic changes in PT cells with HNF-1 $\beta$  deficiency may help to identify new targetable molecular hubs involved in *HNF1B*-related kidney phenotypes and AKI. Here, we combined <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomic analysis in a murine proximal tubule cell line with CrispR/Cas9-induced *Hnf1b* invalidation (*Hnf1b*<sup>-/-</sup>), clustering analysis, targeted metabolic assays, and datamining of published RNA-seq and ChIP-seq dataset to identify the role of HNF-1 $\beta$  in metabolism. *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells grown in normoxic conditions display intracellular ATP depletion, increased cytosolic lactate concentration, increased lipid droplet content, failure to use pyruvate for bioenergetic purposes, increased levels of tricarboxylic acid cycle intermediates and oxidized glutathione, and a reduction of tricarboxylic acid cycle byproducts, all features consistent with mitochondrial dysfunction and an irreversible switch toward glycolysis. Unsupervised clustering analysis showed that *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells mimic a hypoxic signature and that they cannot furthermore increase glycolysis-dependent energetic supply during hypoxic challenge. Metabolome analysis also showed alteration of phospholipid biosynthesis in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells leading to the identification of *Chka*, the gene coding for choline kinase  $\alpha$ , as a new target of HNF-1 $\beta$ . HNF-1 $\beta$  shapes the bioenergetic metabolism of PT cells and *HNF1B* deficiency in patients could lead to a hypoxia-like metabolic state precluding further adaptation to ATP depletion following AKI.



## Introduction

Over the last years, bioenergetic metabolism has emerged as a pivotal actor in kidney physiology (nephrogenesis, electrolyte transport) and pathology (acute kidney injury, fibrosis and chronic kidney disease) <sup>1-4</sup>. During nephrogenesis, sequential metabolic reprogramming modulates the fate of undifferentiated self-renewal of cells by inhibiting glycolysis and thus promoting epithelial cell differentiation <sup>2</sup>. In contrast, in the adult kidney, favoring glycolysis through the pharmacological inhibition of oxidative phosphorylation (and thus fatty acid oxidation, TCA cycle, respiratory chain), rather promotes epithelial dedifferentiation and kidney fibrosis <sup>3,5</sup>. Thus, the characterization of the reprogramming of metabolic pathways in epithelial cells subjected to environmental stresses (hypoxia, inflammation, metabolite privation) or following gene inactivation (during or after nephrogenesis) may help to identify new targetable metabolic hubs and improve the prognosis of both acquired and congenital kidney diseases.

Hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ ) is a transcription factor expressed in tubular cells of the kidney from early developmental stages (gastrulation), where it controls epithelial differentiation, tubular morphogenesis and segmentation <sup>6-13</sup>. During post-natal life, HNF-1 $\beta$  controls the expression of electrolyte transporters <sup>14-18</sup>. Accordingly, *HNF1B* gene anomalies in humans cause a dominantly inherited tubular kidney disorder that combines kidney malformations and tubular dysfunction <sup>19-22</sup>. Whereas the known transcriptional networks regulated by HNF-1 $\beta$  during and after nephrogenesis are clearly linked to the morphological abnormalities and electrolyte disorders observed in *HNF1B* patients <sup>8,9,14,23,24</sup>, the mechanisms that drive progressive kidney failure remain largely elusive, especially the sudden abrupt decline of the glomerular filtration rate observed in some adult patients with *HNF1B* anomalies <sup>21</sup>.

The observation that *Hnf1b* deletion in mouse models leads to indirect over-expression of *Tgfb2*, the gene that encodes an isoform of the pro-fibrotic transforming growth factor- $\beta$ , furnished the first molecular hypothesis as to the progressive interstitial fibrosis identified in *HNF1B* patients <sup>25</sup>. In 2017, we showed that HNF-1 $\beta$  is a crucial regulator at the cross-section of mitochondrial energy metabolism pathways in proximal tubular cells through direct regulation of *Ppargc1a*, which encodes for a co-activator of the peroxisome

proliferator-activated receptor- $\beta$ <sup>26</sup>. We also showed that HNF-1 $\beta$  activity tightly modulates the metabolic and transcriptional responses of renal epithelial cells to injury signals, such as hypoxia or an inflammatory environment. In that way, (rapidly) progressive kidney failure should be considered as a maladaptive response of HNF-1 $\beta$ -deficient tubular cells to environmental stress due to their basal metabolic reprogramming preferentially towards glycolysis, and the lack of a reparative switch towards oxidative metabolism following injury, a finding associated with impaired kidney recovery and fibrosis development<sup>1,3,27–29</sup>.

In this study, we combined large-scale and targeted metabolomic and transcriptomic approaches in a proximal tubule (PT)-derived cell line invalidated for *Hnf1b* to unravel the role of this complex transcription factor in epithelial cells and identify its potential canonical role in metabolic shaping of tubular kidney cells.

## Methods

### *Cell Culture*

MCT cells, either wild-type or *Hnf1b* invalidated using CrispR-Cas9 technology, were used<sup>26</sup>. Cells were grown under standard conditions (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C) with DMEM high glucose Glutamax medium (Gibco 61965-026), supplemented with penicillin-streptomycin (1%, Sigma P0781) and decomplexed calf serum (10%, Gibco FBS One Shot A31608-01).

### *Sample preparation and acquisition of NMR spectra*

*Wt* or *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells were exposed for 24 h either to hypoxia (1%, hypoxia chamber) or to normoxia (21%) in standard medium, then washed with PBS and frozen (-80°C). Total protein content (Abs) was measured in a sub-sample (Bio-Rad, France). The metabolite content was extracted from the frozen pellets according to the procedure described by Beckonert et al.<sup>74</sup>. The upper aqueous phase was collected and lyophilized. The extract was redissolved in deuterated borate buffer at pH 10 and sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-trimethylsilylpropionate, TSP (Acros, France), was added. <sup>1</sup>H NMR spectra, using a zg30 NMR pulse sequence (Bruker library) with presaturation pulse, were recorded at 298K on a Bruker Avance 500 spectrometer

(Bruker Biospin AG). Data were processed using the Bruker TopSpin software 3.1 (Bruker Biospin AG). Phase adjustment and a polynomial baseline correction were done manually on each spectrum. NMR peaks were referenced to the internal chemical shift reference TSP ( $\delta = 0$  ppm). KnowItAll® 8.0 software (BioRad, Cambridge, MA, USA) was used to segment the  $^1\text{H}$  NMR spectra from -0.1 to 10 ppm. The buckets of HOD (4.6-5.2 ppm), residual methanol (3.32-3.37 ppm) and  $\text{CHCl}_3$  (7.67-7.69 ppm) and those containing only noise were excluded to obtain 227 final buckets. Bucket areas were integrated and normalized (normalized area = area/(TSP Area \* protein absorbance)). The normalized area data were then used for statistical analysis. For evaluation of the differential response to hypoxia of *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells compared to *wt*, fold induction was calculated for each bucket in hypoxic samples by dividing the individual value by the mean values obtained in corresponding normoxic cell type. NMR signals of metabolites were assigned with an in-house metabolite database at pH 10. An overall buckets indicator was calculated for each metabolite as the mean value of all centered-scaled buckets associated to that metabolite in each sample.

### *mRNA quantification*

RNA extractions were performed using the RNeasy Plus MiniKit (Qiagen74136) according to the recommended protocol using  $\beta$ -Mercapto-Ethanol (Sigma M3148) Lysis Buffer supplementation. 500 ng of RNA was used for Reverse Transcription (Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 4368813). Diluted cDNAs were used for qPCR with MESA Blue qPCR Mastermix (Eurogentec RT-SY2X-03+WOUB). Gene quantification was performed using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  technique using *Hprt* as the house-keeping gene and 'WT and normoxia' as standard conditions. Contamination with genomic DNA and contaminated water were ruled out using RT- and H<sub>2</sub>O samples. The primers used in this study were validated for linearity and are listed in **Supplementary Table 1**.

### *ATP measurements*

After 24h exposure to study medium, cells were seeded in 12 well plates and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After 18 to 24 h, cells were collected by trypsin treatment for 3 min, counted, and their ATP content was measured (ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II, Sigma 11699695001; TECAN infinite500) according to the manufacturer protocol. ATP concentration was normalized to cell number and the fold-change was

calculated versus the mean of the reference condition. To obtain the targeted compositions of the study media, various media were used (Gibco 61965-026, Gibco 21885-025 or Gibco 11966-025, supplemented with D-Glucose as appropriate (D-Glucose Purified Riedel-de Haën) for dose-response to glucose).

### *Glucose measurements*

Cells were seeded in 6 well plates in adapted medium (DMEM High Glucose Phenol Red Free Sigma D1145 supplemented with L-Glutamine 4mM, 1% Penicillin-Streptomycin and 10% serum). After 18 h, medium was changed (2 mL) and cells were incubated during 24 h. Samples (6 from initial medium and 1 sample of each well 24 h later) were collected for glucose measurement (I2MC Biochemistry unit, Pentra 400). Global glucose consumption ((initial [Glucose] – final [Glucose]) x Volume) was calculated. For normalization, cells were counted in additional wells cultivated in parallel just after medium change (H0), 3 h later (H3), 6 h later (H6) and 24 h later (H24). Counts were used to build proliferation model. Area under model curves between H0 and H24 were calculated and used for normalization. Results are expressed in mmol/(10<sup>7</sup> cells.24h).

### *Cellular lipid content*

Sterile glass cover slips (Deckgläser Cover Slips Knittel Glass) were placed in each well of a 12 well plate. Cells were seeded and incubated for 18-24 h under standard conditions. Cells were fixed using 10% Formalin (Qpath VWR Chemicals 2581354) and washed twice (ddH<sub>2</sub>O/30% Isopropanol). Cells were then incubated for 30 min with RedOil (Sigma O1391 diluted in ddH<sub>2</sub>O 6:4 and filtered) at room temperature. After a second wash step, hematoxylin was added (Dako Mayer's Hematoxylin Histological Staining Reagent S3309). Coverslips were then washed and immobilized on microscope slides (Aquatex Merck 1.08562.0050). Images were acquired (Nikon EclipseE400, Microfire) and further analyses were done using ImageJ software version 1.53c. RedOil areas normalized by the total hematoxylin-stained areas were used as endpoints.

### *Reanalysis of published RNA-Seq data*

Previously published RNASeq data (Chan et al. JASN 2018) of two mIMCD3 cell lines with or without *Hnf1b* invalidation (CrispR-Cas9) were obtained from NCBI Gene Expression Omnibus (GSE97770). Unnormalized read counts files (Reference genome GRCm38-mm10), filtered to remove unexpressed genes (total read

count < 10), was used as input for differential expression analysis using *DESeq2* package <sup>75</sup>, with *wt* as the reference group. Results were annotated with *mg* symbols using the *biomaRt* package (Ensembl, *mmusculus\_gene\_ensembl*). Enrichment analysis was performed using GeneCards (LifeMap Sciences) on two gene lists: genes up-regulated in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells (Log2FC > 1 and adjusted p-value < 10<sup>-5</sup>) and genes down-regulated in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells (Log2FC < -1 and adjusted p-value < 10<sup>-5</sup>). To specifically explore metabolic pathways identified by the NMR metabolomic approach, RNASeq results were filtered to conserve the top differentially expressed genes (abs(log2FC) > 1 & adjusted-p-value < 10<sup>-4</sup>) in the gene sets associated with AA metabolism (“Tyrosine Metabolism Superpath”, “Valine, leucine and isoleucine degradation”, “Glycine, serine and threonine Metabolism” and “Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides”), Phospholipid Biosynthesis (“Glycerophospholipid Biosynthesis”) or Energetic metabolism (“Aspartate, Alanine and Glutamate metabolism”, Mitochondrial Fatty Acids beta-oxidation”, “Glucose Metabolism” and “The citric acid (TCA) cycle and respiratory transport chain”) using Pathcards Database (<https://pathcards.genecards.org/>).

#### *Identification of HNF-1β consensus binding site*

Gene/TSS and Hnf-1β ChIPSeq peaks localizations were obtained visually using the UCSC Genome Browser. Precise DNA sequences (Gene + TSS + 30kb upstream, precise sequence covered by peak +/- 200bp) were then obtained using the Get DNA function in the UCSC Genome Browser from the *Mus musculus* mm9 assembly (July 2007). Sequences were then screened using Consite (<http://consite.genereg.net/>) to identify HNF-1 β consensus binding sequences (> 80-85% homology).

#### *Reanalysis of published ChIP-Seq data*

Previously published HNF-1β ChIP-Seq data (*Aboudehen et al. JASN 2016*) of two mIMCD3 cell lines with or without knock-out of the *Hnf1b* gene (CrispR-Cas9) were obtained from the NCBI Gene Expression Omnibus (GSE71250). Extracted wig file that contained normalized peak enrichment score over the entire genome was uploaded to Galaxy ([usegalaxy.org](http://usegalaxy.org)) using the mouse July 2007 (NCBI37/mm9) assembly. The file format was transformed to bigwig before visualization via the UCSC Genome Browser. Data from DNase sensitivity, ChIPSeq RNA Polymerase II and histone marks (H3K4m1, H3K4m3, H3K27a) obtained from kidneys of C57Bl6

adult mice (8 weeks) and available from the ENCODE Database (UW DNaseI HS, LICR TFBS/Histone) were added.

### *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed using R (v3.6.1) and R.Studio (v1.2.5019). Dimension reduction by PCA was computed using *FactoMineR* and *Factoextra* packages <sup>76,77</sup>. Unsupervised clustering was conducted on centered scaled areas using the WardD2 method of the *hclust* function with Euclidean distances. Two-group PLS-DA models were built using *ropls* package <sup>78</sup>. Performance was evaluated according to Q<sup>2</sup>Y and validated using 100x permutation test (**Supplementary Figure 2**). In the context of each relevant model, VIP-Scores were extracted and buckets with a VIP over 1 were considered as significant. Differentially represented metabolites were obtained by regrouping metabolites with at least half of the representing buckets reaching significance with PLS-DA testing, a consistent variation of overall bucket indicator and a consistent signature on spectra. Enrichment analysis was conducted on the lists of differentially represented metabolites using *MetaboAnalyst 4.0* (Enrichment Analysis). Classical tests were chosen depending on distribution and homoscedasticity assessments. Two group basic comparisons for quantitative variables were run using either T-test, Aspin-Welch or Wilcoxon tests. Three or more group comparisons were run using either One-Way-Anova followed by Tukey post-Hoc tests or Kruskal-Wallis test followed by pair wise-Wilcoxon tests. For simultaneous evaluation of 2 or more factors, two-way Anova followed by Tukey post-test or Kruskal-Wallis test on the interaction, followed by pair wise Wilcoxon tests. p-values < 0.05 were considered to be significant.

## **Results**

### ***Hnf1b deletion leads to ATP deficiency, increased aerobic glycolysis and impairment of bioenergetic metabolism in PT cells***

To decipher the role of HNF-1 $\beta$  in PT cell metabolism, we performed functional studies *in vitro* in MCT cells, a murine cell line derived from the proximal tubule <sup>30</sup>. *Hnf1b*<sup>-/-</sup> status was obtained using a CRISPR/Cas9

strategy as previously described <sup>26</sup>. Compared to wild-type (*wt*) cells, we observed a significant increase in the lipid droplet content in the cytoplasm of *Hnf1b*<sup>-/-</sup> MCT cells (*p* <0.001; **Figure 1a**), likely due to defective fatty acid utilization and impaired oxidative phosphorylation. Accordingly, *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells displayed a significantly lower intracellular ATP content than *wt* cells when grown in the presence of increasing concentrations of glucose (**Figure 1b**), even after addition of pyruvate (**Figure 1c**). This reduced intracellular ATP content was also confirmed under standard culture conditions (**Figure 1d**). In parallel, *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells displayed increased glucose consumption (*p*=0.05; **Figure 1e**), suggesting an increased aerobic glycolysis.

To better understand the role of HNF-1 $\beta$  in PT cell metabolism, we performed a large-scale analysis of the cellular metabolic changes associated with HNF-1 $\beta$  deficiency in MCT cells using <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) metabolomic analysis. We compared the metabolome of *wt* and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells (9 and 8 independent samples, respectively). Unsupervised principal component (PCA) and clustering (CA) analysis separated clearly *Hnf1b*<sup>-/-</sup> from *wt* samples (**Figure 2ab**). Next, among the 227 buckets that composed the NMR spectra, we identified 101 differentially expressed buckets between *wt* and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells (increased concentrations *n*=27 buckets; reduced concentrations *n*=74 buckets, **Figure 2c**). Out of these 101 differentially expressed buckets, 19 metabolites could be firmly identified (**Figure 2d**).

*Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells were characterized by an increased intracellular production of lactate and a number of additional abnormalities in key steps of the bioenergetic metabolism, including an increase of the tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates (fumarate and succinate), a decrease of the TCA cycle byproducts (aspartate), an increase of oxidative stress modulator (oxidized glutathione) and a decrease of phosphocreatine, an energy storage molecule. These findings strongly suggested dysfunction of the oxidative metabolism with mitochondrial uncoupling and increased glycolysis (**Figure 3a**). This observation was reinforced by pathway enrichment analysis (Metaboanalyst, Homo sapiens KEGG Database) that identified mitochondrial electron transport chain, pyruvate metabolism, Warburg effect and TCA Cycle in the top 50 pathways (**Figure 3b**).

Taken together, this large scale metabolomic data indicate a profound reprogramming of bioenergetic balance and oxidative metabolism following *Hnf1b* invalidation in mouse PT cells and validate the initial observation of mitochondrial dysfunction and Warburg effect (**Figure 1**).

### ***Hnf1b* invalidation induces a metabolic phenotype that mimics a hypoxia signature.**

Hypoxia and metabolic reprogramming are involved in epithelial cells in acute kidney injury<sup>31</sup>. Moreover, we demonstrated that HNF-1 $\beta$  deficiency sensitizes PT cells to hypoxic or inflammatory insults<sup>26</sup>. Consequently, we assessed the metabolic changes in *wt* and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> MCT cells after hypoxic challenge. First, we confirmed in *wt* cells that the hypoxic challenge indeed reoriented cells toward a glycolysis predominant metabolism, as previously described (**Figure Sup 1**).

PCA and unsupervised clustering analysis separated *Hnf1b*<sup>-/-</sup> and *wt* cells into hypoxic and normoxic conditions. Interestingly, there is a strong homology between the metabolism of *wt* cells grown under hypoxic conditions and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells grown under normoxic conditions (**Figure 4ab**). Hypoxic *wt* cells and normoxic *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells displayed increased intracellular concentrations of lactate, a product of glycolysis, and decreased concentrations of mitochondrial products, such as aspartate, and energetic storage products, such as phosphocreatine (**Figure 4c, Figure 5a**). These findings suggested a deficiency of mitochondria-dependent ATP production in both oxygen pressure conditions.

Metabolite changes also indicated that environmental condition (here, hypoxia) might have different effects on mitochondrial bioenergetic breakdown according to the *Hnf1b* status (**Figure 5c**).

We then compared the response of *wt* and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells to a hypoxic challenge and identified the metabolic changes that significantly discriminated both cell types. As shown in **Figure 4c and Figure 5b**, hypoxia led to a strong decrease of TCA cycle intermediates (fumarate, succinate) and oxidized glutathione in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells, that was significantly more intense than found in hypoxic *wt* cells, but without a concomitant increase of lactate production. These findings confirmed that, at basal normoxic state, *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells are already reprogrammed towards a predominant glycolytic dependent energetic metabolism and cannot furthermore increase glycolysis-dependent energetic supplies thus precluding further adaptation to additional ATP depletion (**Figure 5c**).

### ***Hnf1b* deletion impairs amino acid metabolism**

Beyond their role in providing precursors for protein synthesis, amino acids (AAs) can also serve as an energetic supply, especially through oxidative metabolism<sup>32</sup>. We thus performed an in-depth characterization of AAs metabolism in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells using our metabolomic dataset. As shown in **Figure 2d**,



*Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells displayed a significant reduction of the intra-cellular content of several AAs. For example, all AAs belonging to the branched chain amino-acids (BCAA) family (isoleucine, leucine and valine) and many of the neutral AAs (alanine, tyrosine, glycine) were significantly down-regulated at the basal normoxic state. Pathway enrichment analysis confirmed dysregulation of various AAs-associated pathways (glutamate metabolism; alanine metabolism; glycine/serine metabolism; aspartate metabolism; valine, leucine and isoleucine degradation). The intracellular content of almost all AA was not modified after hypoxic challenge (**Figure 4c**, **Figure 5b**) confirming that AA deficiency may not be related to oxidative phosphorylation-dependent excessive consumption for bioenergetic purposes. Contrasting to results of a reanalysis of RNA-seq data performed in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> mIMCD3 cells<sup>25</sup> that identified down-regulation of various amino acids transporters (*Slc6a18*, *Slc6a19*, *Slc16a10*, **Figure 6b**), the expression of the neutral AA transporter *Slc16a10* was not down-regulated in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> MCT cells, whereas *Slc6a18* and *Slc6a19* were not expressed in this cell line (data not shown).

### ***Hnf1b* deletion impairs the first step of phosphatidylcholine biosynthesis, the major membranous phospholipid**

Phosphocholine is the first specific metabolite of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway (**Figure 6a**). NMR analysis showed that choline, phosphocholine and glycerophosphocholine strongly increased in *wt* cells under hypoxia (**Figure 4c**). In *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells, phosphocholine concentration was reduced in normoxia (**Figure 2d**) and its response to hypoxia was blunted while the response of choline and glycerophosphocholine remained unaltered (**Figure 4c**). Concomitantly, the abundance of choline, the direct phosphocholine precursor, was similar in *wt* and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells during both normoxic and hypoxic conditions (**Figure 4c**), suggesting an enzymatic blockade of the choline kinase in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells (**Figure 6a**). Reanalysis of RNA-seq datasets performed in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> mIMCD3 cells<sup>25</sup>, identified down regulation of *Chka*, encoding for the major  $\alpha$ -isoform of the choline kinase (fold-change 0.40, adj-p-val =  $2.2 \times 10^{-6}$ , **Figure 6b**). We confirmed these results in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> MCT cells (**Figure 6c**). In addition, other genes involved in the synthesis of glycerophospholipids were also dysregulated (e.g. *Stard10* and *Mboat1*; **Figure 6b**) suggesting global alteration of phospholipid metabolism and trafficking in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells. Reanalysis of a published ChIP-seq dataset obtained with *Hnf1b*<sup>-/-</sup> mIMCD3 cells<sup>34</sup> identified various binding sites of HNF-1 $\beta$  proximal to the

transcription start site of *Chka* (**Figure 6d**). These peaks colocalize with a HNF-1 $\beta$  putative binding site and some of them also colocalized with active enhancer/promoter marks (H3K4m1, H3K4m3, H3K27ac, RNA Pol II) and were DNase sensitive (**Figure 6d**). Thus, HNF-1 $\beta$  directly controls the expression of *Chka* and subsequently the first step of phosphatidylcholine biosynthesis, a key metabolic pathway in kidney cell homeostasis.

## Discussion

The transcription factor HNF-1 $\beta$  controls a large transcriptional network modulating the activity of various pathways involved in differentiation and tubular morphogenesis of kidney tubular epithelial cells during kidney development; as well as electrolyte transport in adulthood<sup>9–14,18,23,35,36</sup>. Over the last years, we and others have reported that HNF-1 $\beta$  also controls mitochondrial biogenesis (direct control of *Ppargc1a* expression)<sup>26</sup> and the production of cholesterol (direct control of *Pcsk9*)<sup>34</sup> in the kidney. These studies revealed a molecular explanation for a number of kidney phenotypes observed in patients with *HNF1B* anomalies<sup>19–21,37</sup>, but did not fully resolve the knowledge gap between the physiological role of HNF1B and the progression of kidney fibrosis and the heterogeneity of nephropathy between individuals. In this study combining large-scale metabolic analysis, functional metabolic testing and extensive reanalysis of published RNA-Seq and ChIP-seq datasets, we demonstrate that *Hnf1b* deficient cells harbor a metabolic switch characterized by predominant mitochondrial dysfunction associated with increased glycolytic pathway activity, decreased fatty acid oxidation, and a blockade of the phosphatidylcholine pathway. Moreover, we demonstrate that this metabolic switch mimics *wt* cells grown under hypoxia, indicating that *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells are unable to mount an adequate metabolic response when exposed to a hypoxic challenge. We believe that these findings suggest we transition from an architectural point-of-view on HNF-1 $\beta$ -related kidney disorders, to a more functional, environment-dependent vision, permitting testing new drug targeting actionable molecular targets (thiazolidinediones, resveratrol) to prevent progression toward end-stage kidney disease of patients with *HNF1B* gene anomalies.

Mitochondrial dysfunction in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells was characterized by ATP depletion, cytoplasmic lipid accumulation (*i.e.* a surrogate marker for fatty acid oxidation defects), a reduction in of TCA cycle byproducts (*i.e.* aspartate), an increase of an oxidative stress modulator (*i.e.* oxidized glutathione), a decrease in energy storage (*i.e.* phosphocreatine), and a compensatory increase of the glycolysis pathway (*i.e.* lactate). These metabolic changes may be linked to direct effects of the down-regulation of *Ppargc1a*, the gene encoding the PPAR- $\gamma$  co-activator 1- $\alpha$ , and subsequent defects of mitochondrial biogenesis identified in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells<sup>26</sup>, or to indirect auto/paracrine effects induced by TGF- $\beta$  isoform-2<sup>25,38</sup>. Additional mechanisms can be hypothesized but were not addressed in this study. Interestingly, a glycolytic switch despite cells growth in normoxic conditions (*i.e.* Warburg effect) was also observed in tumor cells that over-express *HNF1B*<sup>39-42</sup>. This reinforces the role of HNF-1 $\beta$  in the tight control of epithelial cell metabolism and is reminiscent of the kidney phenotype that also develops in patients with an *HNF1B* duplication.

The metabolic switch at baseline and the abnormal response to hypoxic challenge in HNF-1 $\beta$  deficient kidney cells may underlie some phenotypes observed in *HNF1B* patients or, more largely, renal response to injuries. First, we showed that HNF-1 $\beta$  deficiency partly mimics hypoxia, a situation commonly encountered during episodes of AKI, especially in the S3 segment of the proximal tubule<sup>43-45</sup>. Chronic kidney hypoxia promotes kidney fibrosis and CKD<sup>46,47</sup>, a condition that sensitizes the kidney to a second insult<sup>48</sup>. These findings may also explain why some patients with *HNF1B* anomalies develop sudden irreversible decline in kidney function<sup>21</sup>. These observations combined with the discovery that epithelial stress down-regulates the transcriptional activity of HNF-1 $\beta$ <sup>26</sup>, suggest that kidney tubular cells of *HNF1B* patients fail to adapt their bioenergetic metabolism following AKI, and remain in a “locked hypoxic state”, with subsequent signaling leading to kidney fibrosis. The link between mitochondrial dysfunction and fibrosis development was observed not only in the kidney but also in other organs<sup>1,49,50</sup>. Second, mitochondrial dysfunction, with FAO deficiency and lipid accumulation within cytoplasm of the proximal tubule cells, promotes kidney fibrosis<sup>3</sup>. Third, it is now recognized that metabolic changes have consequences beyond bioenergetics: micro-environment changes activating fibroblast or inflammatory cells and promoting fibrosis<sup>51-56</sup>, activation of cell death pathways (apoptosis or necrosis) especially in the context of profound ATP depletion<sup>57-59</sup>, and modulation of cell proliferation<sup>60-62</sup> or differentiation<sup>63-66</sup>. For example, we observed an increase in intracellular oxidized

glutathione in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells in the basal state, which may reveal increased production of radical oxygen species.

Metabolome analysis revealed the dramatic depletion of various AAs, especially neutral AAs (leucine, isoleucine and valine). Transcriptome analysis of a different tubular cell line harboring the same mutation suggested an impairment in uptake related to a downregulation of various AA transporters known to be HNF-1 $\beta$  targets. Unfortunately, those results cannot be confirmed in our cell line because of the lack of transporter expression (Slc6a18/Slc6a19) and the possibility that HNF-1 $\alpha$  expression counter-balanced HNF-1 $\beta$  deficiency. A dynamic characterization of the AA metabolism pathways in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cell lines (from uptake to inclusion in protein and catabolism for bioenergetic purpose) will be of interest to better understand the underlying mechanisms and link them to other metabolic pathways such as autophagy, mTORC1 signaling and gluconeogenesis.

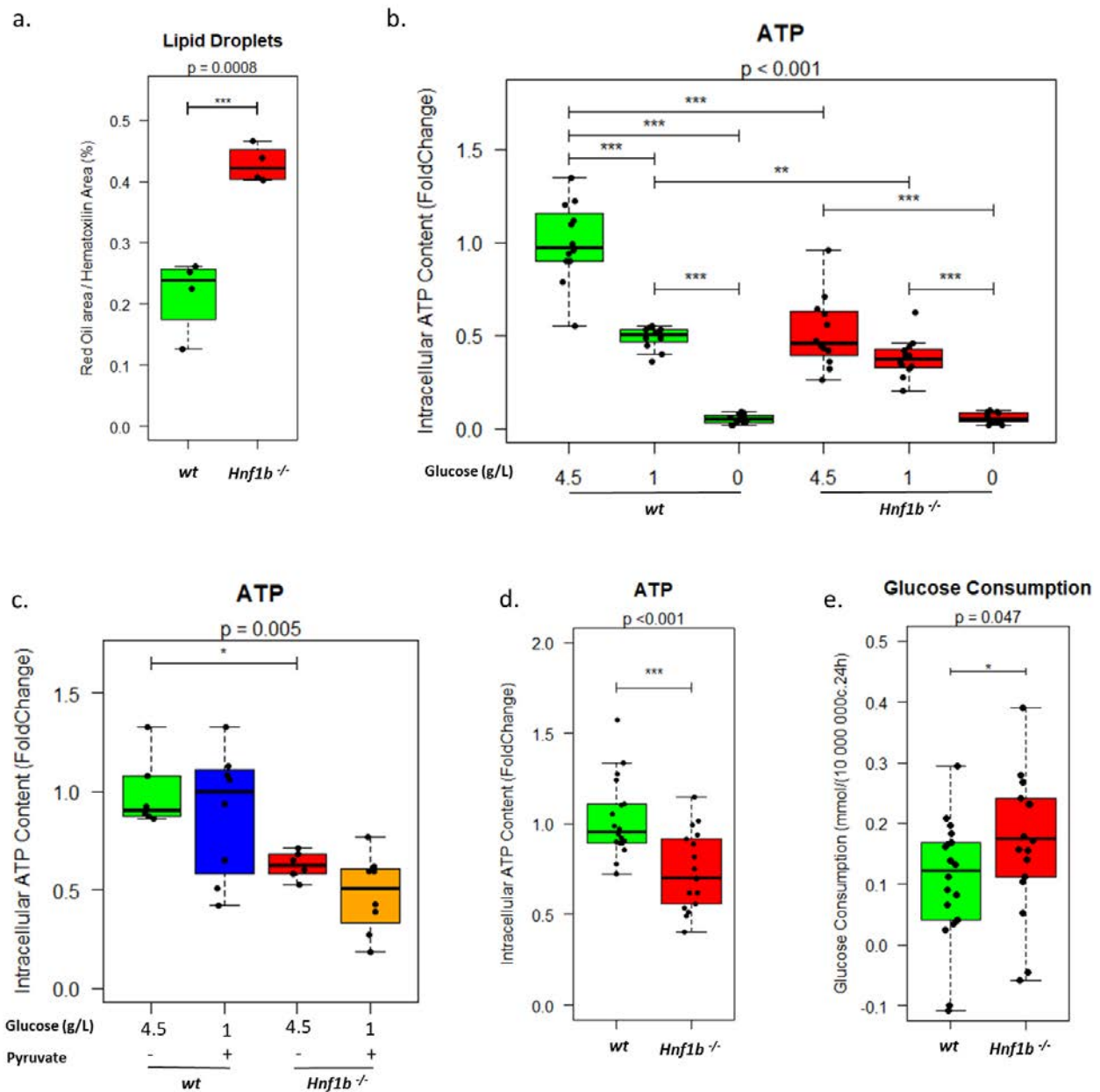
Lastly, we showed that HNF-1 $\beta$  controls the expression of *Chka* which encodes for choline kinase- $\alpha$ . Biosynthesis of phosphocholine from choline by the Choline kinase- $\alpha$ , is the first, possibly limiting, enzymatic step of the phosphatidylcholine synthesis pathway <sup>67</sup>. The role of phospholipids and oxidized phosphatidylcholine in kidney homeostasis and injury has been reported by several studies <sup>68–71</sup>. HNF-1 $\beta$  deficiency leads to a phosphocholine depletion that is further aggravated under environmental stress conditions such as hypoxia. The protective role of phosphatidylcholine during kidney injury <sup>33</sup> suggests that HNF-1 $\beta$  deficiency is associated with partial loss of epithelial resistance to injury.

This work used a multiscale metabolome approach to identify new therapeutic targets in *HNF1B* related kidney disease, but the results were obtained in transformed cell lines that often harbor different metabolic features compared to *in vivo* cells <sup>72,73</sup>. In addition, the differences between animal and *in vitro* models (both requiring homozygous deletion) and *HNF1B*-related nephropathy in humans (heterozygous variation or deletion of *HNF1B*) will need to be determined in order to confirm our data *in vivo* in humans. However, this is greatly hampered by the rarity of kidney biopsies from *HNF1B* patients.

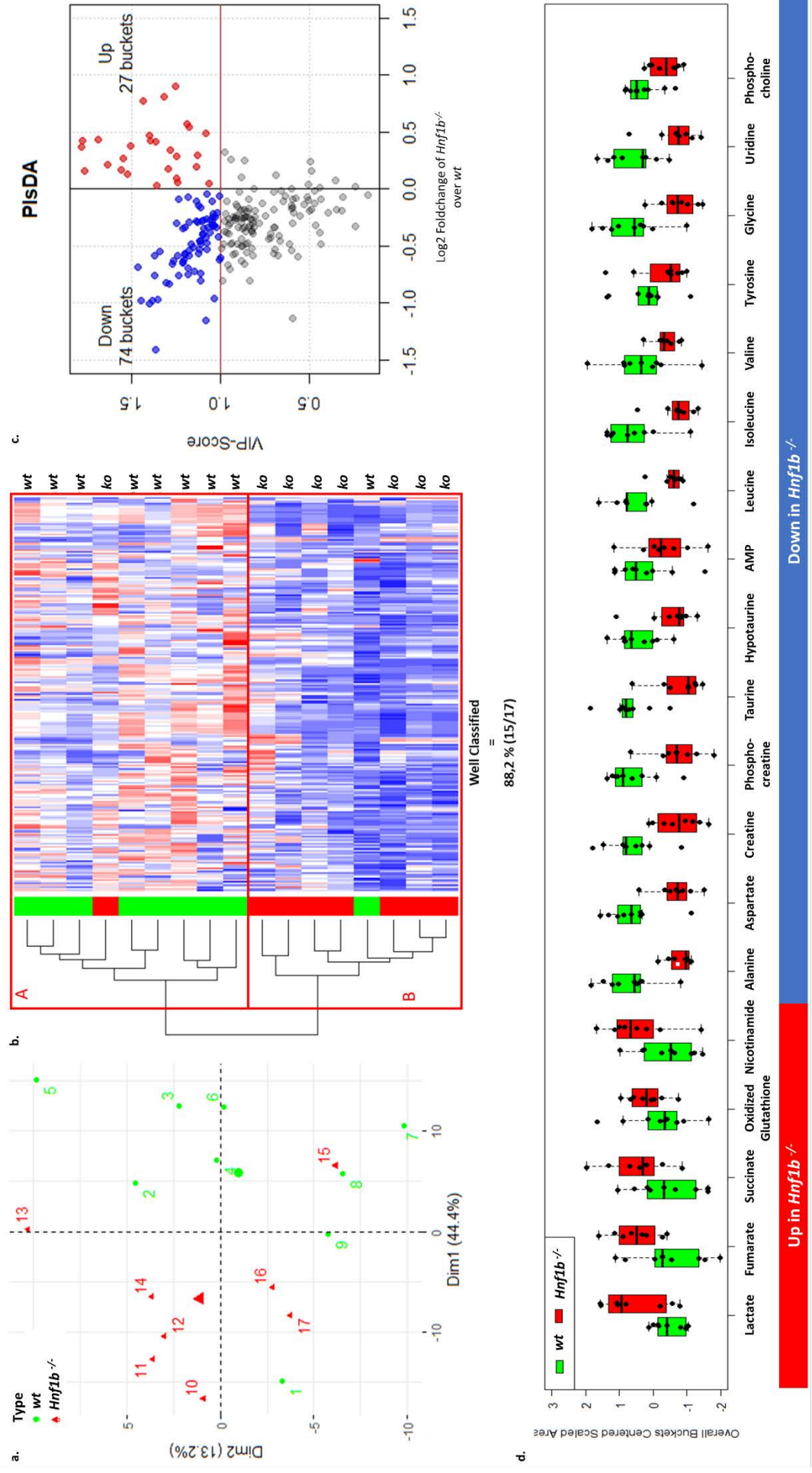
**In summary**, our study brings forth several key evidences explaining at the molecular level the typical disease progression observed in HNF-1 $\beta$ -related kidney disorders. Pinpointing this evidence to the metabolic state

of the HNF-1 $\beta$ -deficient kidney tubule cells and their inability to respond to stress allows one to envisage potential treatments that prevent disease progression in these patients.

## Figures



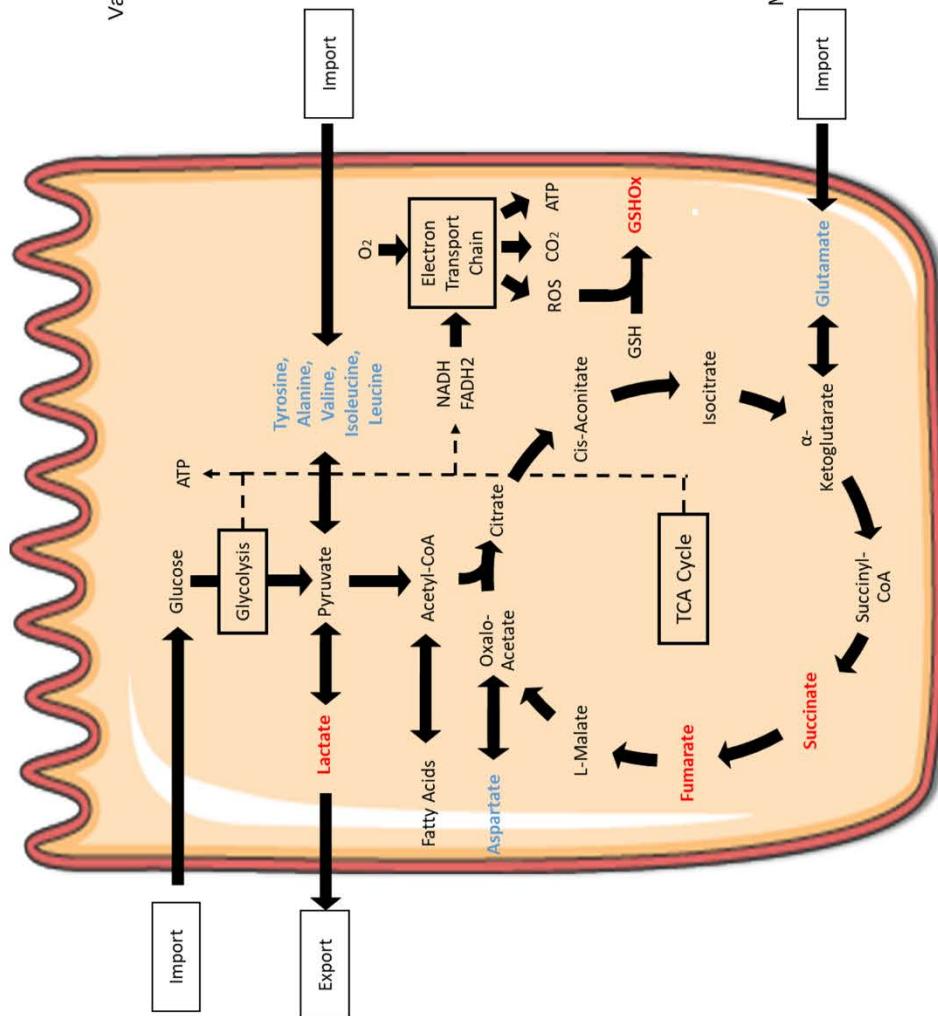
**Figure 1: *Hnf1b* deletion leads to mitochondrial dysfunction in kidney tubular kidney cells.** a. Normalized intracellular lipid content in wt and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> MCT cells (red oil staining). b. Effect of partial or total glucose deprivation on normalized intracellular ATP content in wt and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> MCT cells. c. Effect of pyruvate supplementation in the context of partial glucose deprivation on normalized intracellular ATP content in wt and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> MCT cells. d. Normalized intracellular ATP content in wt and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> MCT cells. e. Normalized glucose consumption in wt and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> MCT cells.





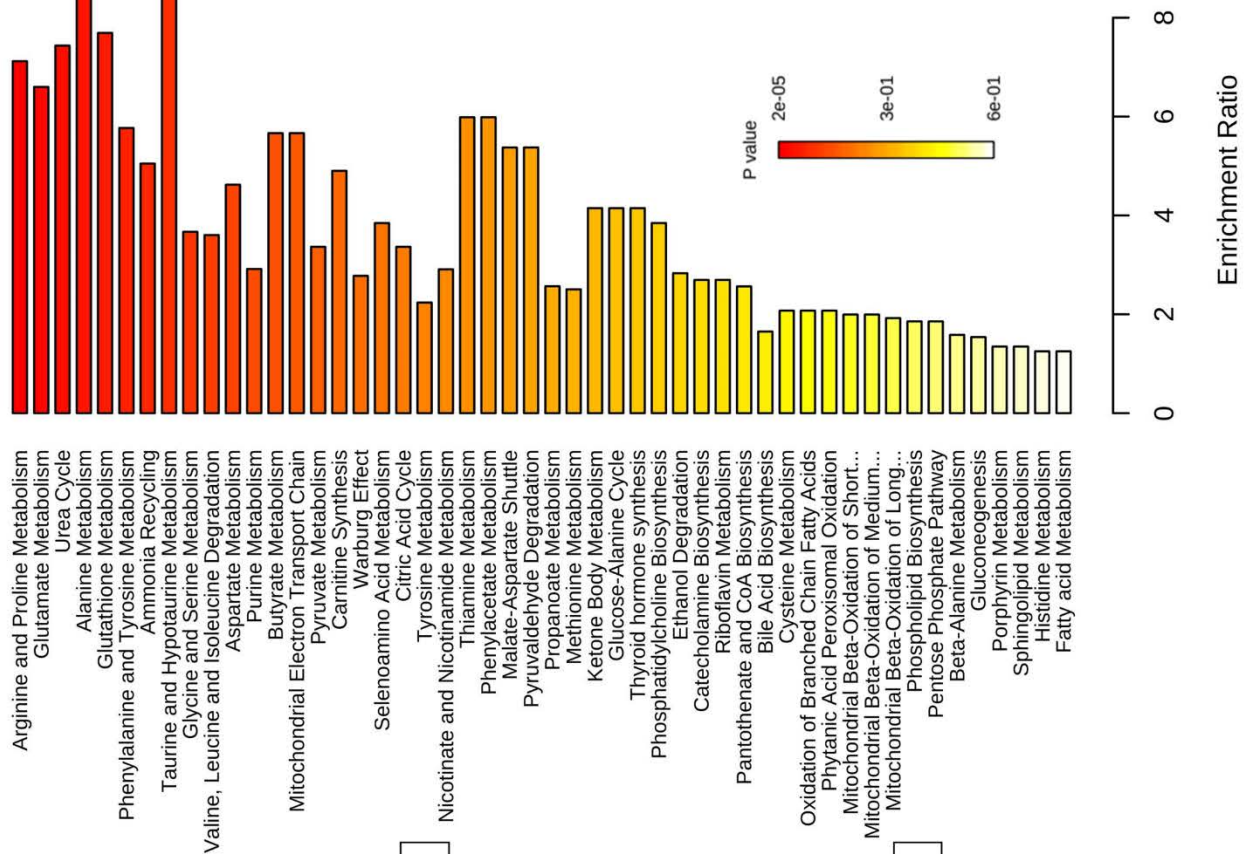
**Figure 2: NMR-based metabolome analysis identifies various metabolic changes induced by *Hnf1b* invalidation in MCT cells.** a. The two first principal components of the changes in *wt* and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cell metabolomes using principal component analysis (PCA). *Wt* samples are represented in green and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> in red. b. Heatmap representing centered scaled bucket values for the entire dataset. Samples are organized by hierarchical clustering using the Euclidean distances measure and the using WardD2 clustering method. Red rectangles represent the predicted clusters. c. Volcano plot representing all buckets with the VIP-Score from PLS-DA analysis (y-axis) as a function of log foldchange of *Hnf1b*<sup>-/-</sup> over *wt* (x-axis). The brown horizontal line represents the significance threshold. d. Boxplot of mean centered-scaled bucket areas for each metabolite differentially represented in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells compared to *wt* cells. Two subsets are defined, up- and down-regulated.

a.

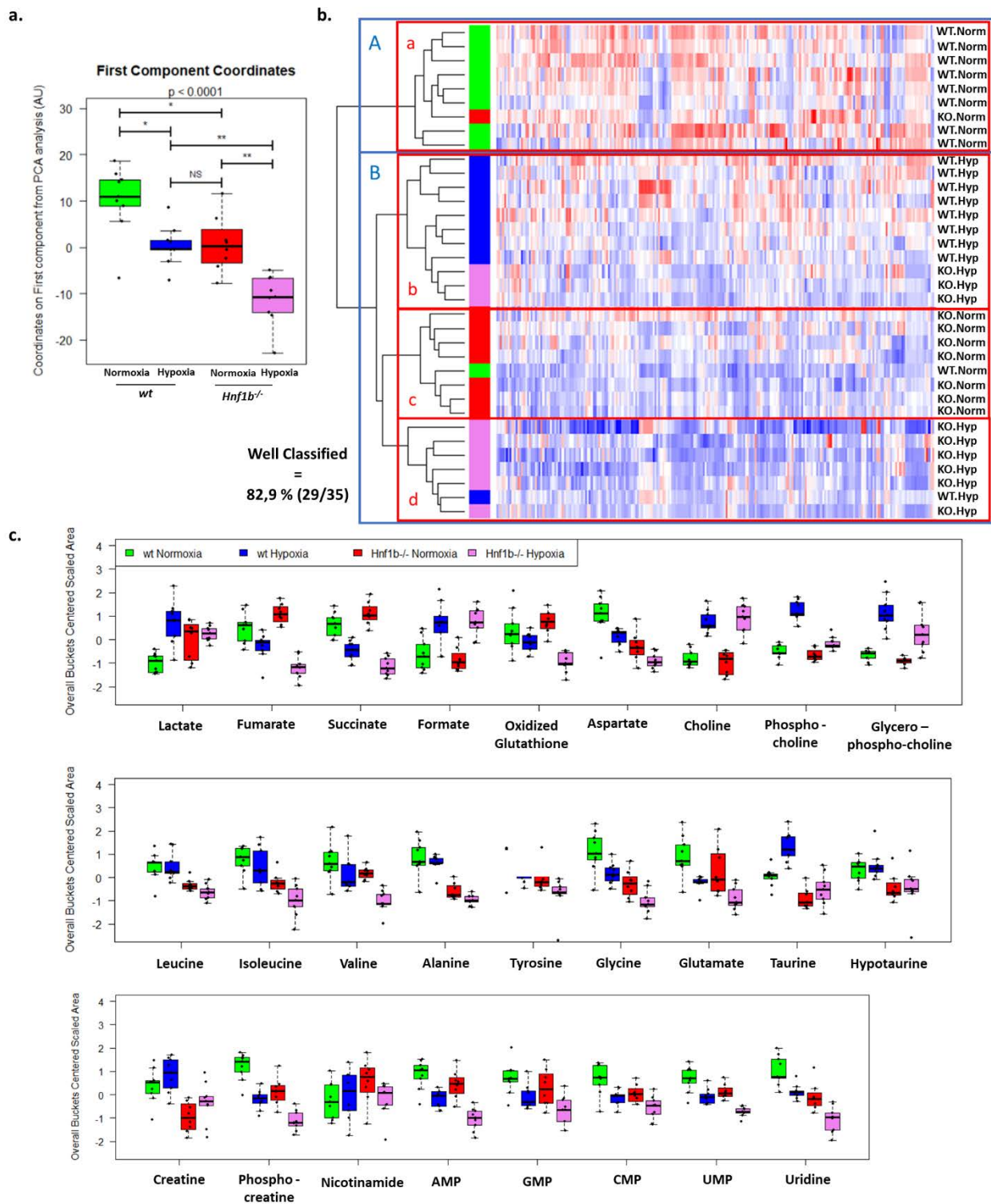


b.

## Enrichment Overview (top 50)



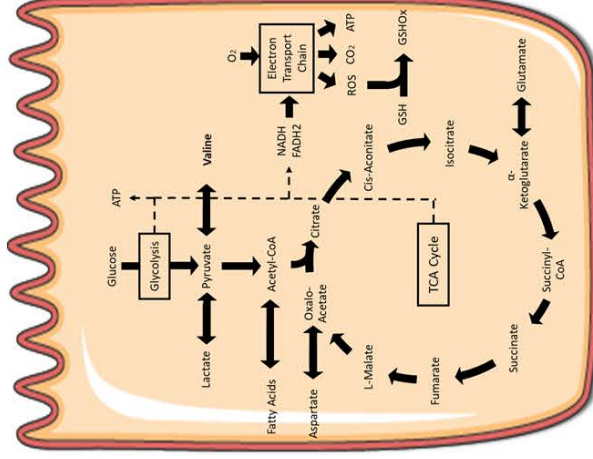
**Figure 3: NMR-based metabolome analysis indicates clear bioenergetic dysfunction in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells.** a. Overview of the differentially represented metabolites in *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells projected on a bioenergetic network. Blue, significantly decreased; Red, significantly increased; Black, not modified. b. Summary Plot for Pathway Enrichment Analysis using differently expressed metabolites (*MetaboAnalyst* software).



**Figure 4: NMR-based metabolome analysis of a hypoxic challenge of wt and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells.** a. Analysis of the first two components of wt and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells under normoxic and hypoxic conditions using PCA. Wt normoxic samples are represented in green, wt hypoxic samples in blue, *Hnf1b*<sup>-/-</sup> normoxic samples in red and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> hypoxic samples in purple. b. Heatmap representing centered scaled bucket values for the entire metabolome dataset. Samples are organized by hierarchical clustering. Blue rectangles represent results from a 2-group clustering analysis. Red rectangles represent results from 3-group clustering. c. Boxplot of mean centered-scaled buckets areas for each metabolite differentially expressed under at least one of the conditions.

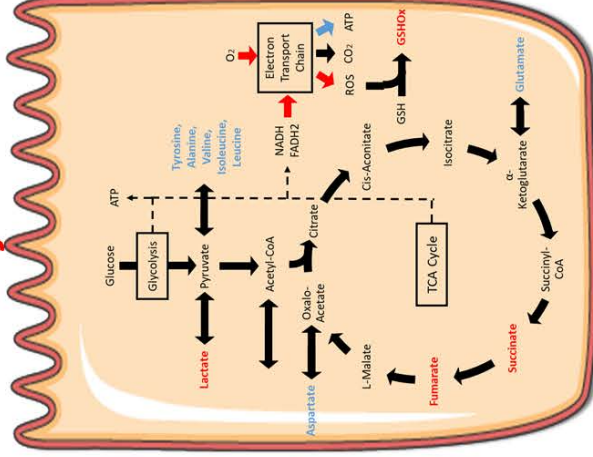
## Normoxia

wt



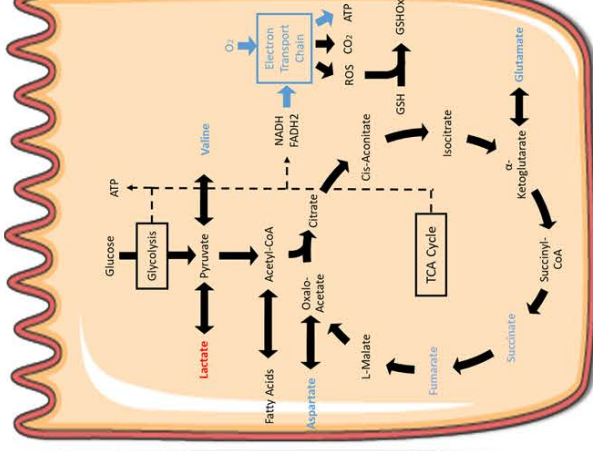
Basal State

*Hnf1b*<sup>-/-</sup>



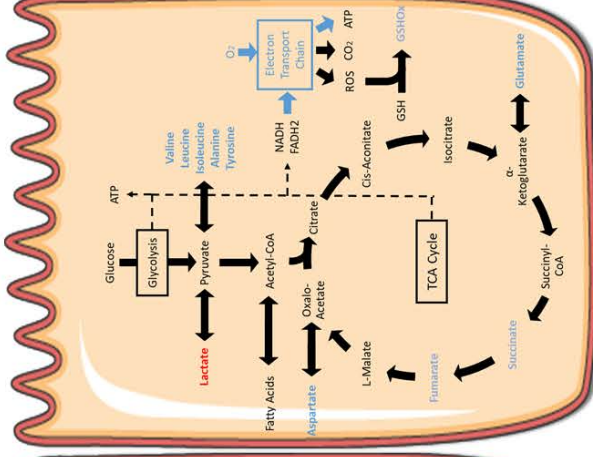
Respiratory Chain Uncoupling  
And  
Metabolic Switch

wt



Respiratory Chain Blockade  
And  
Metabolic Switch

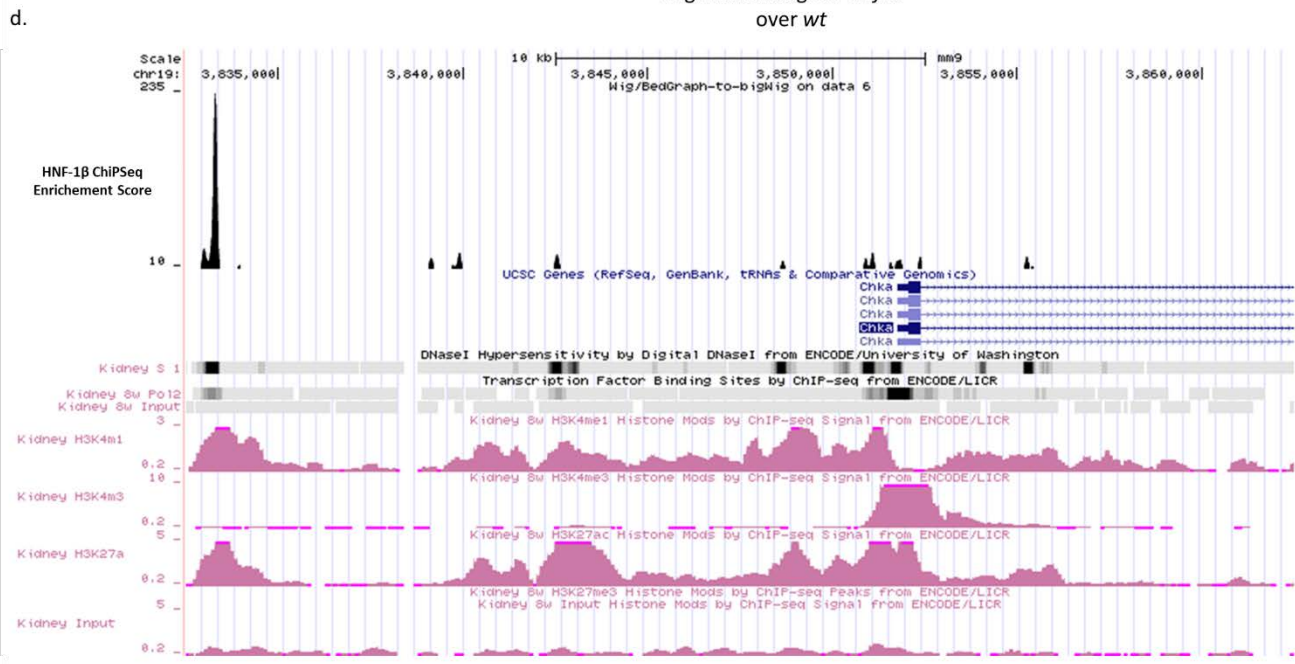
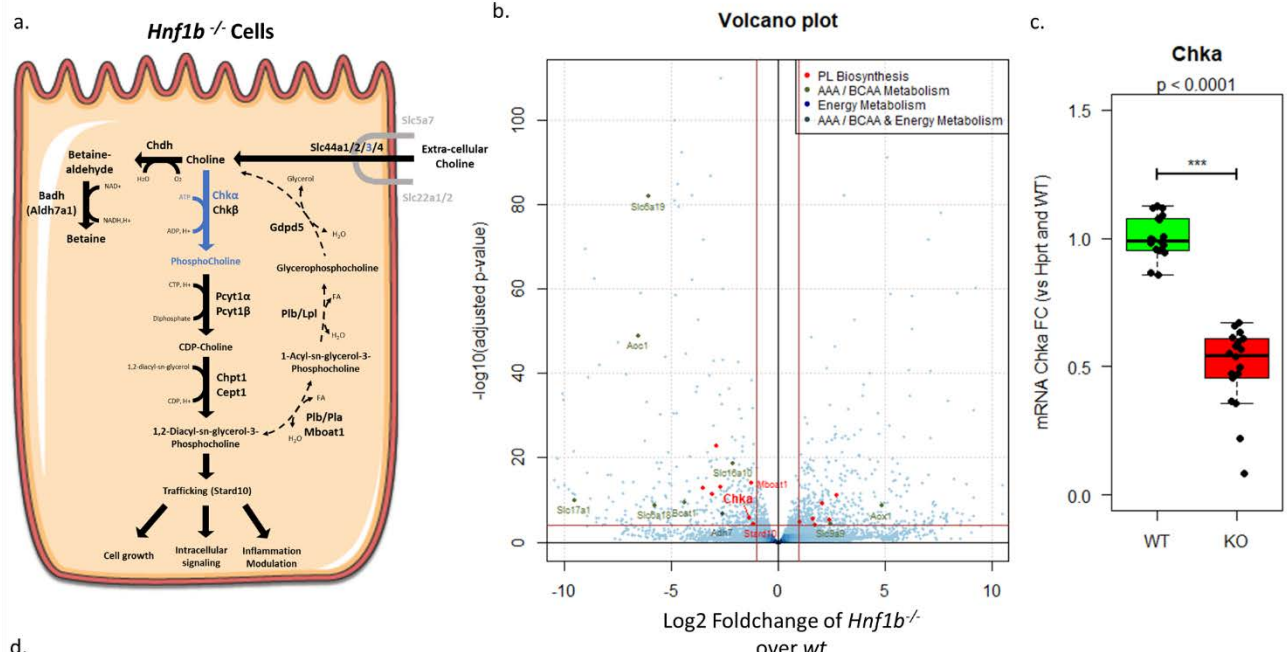
*Hnf1b*<sup>-/-</sup>



Respiratory Chain Blockade  
And  
Metabolic Switch

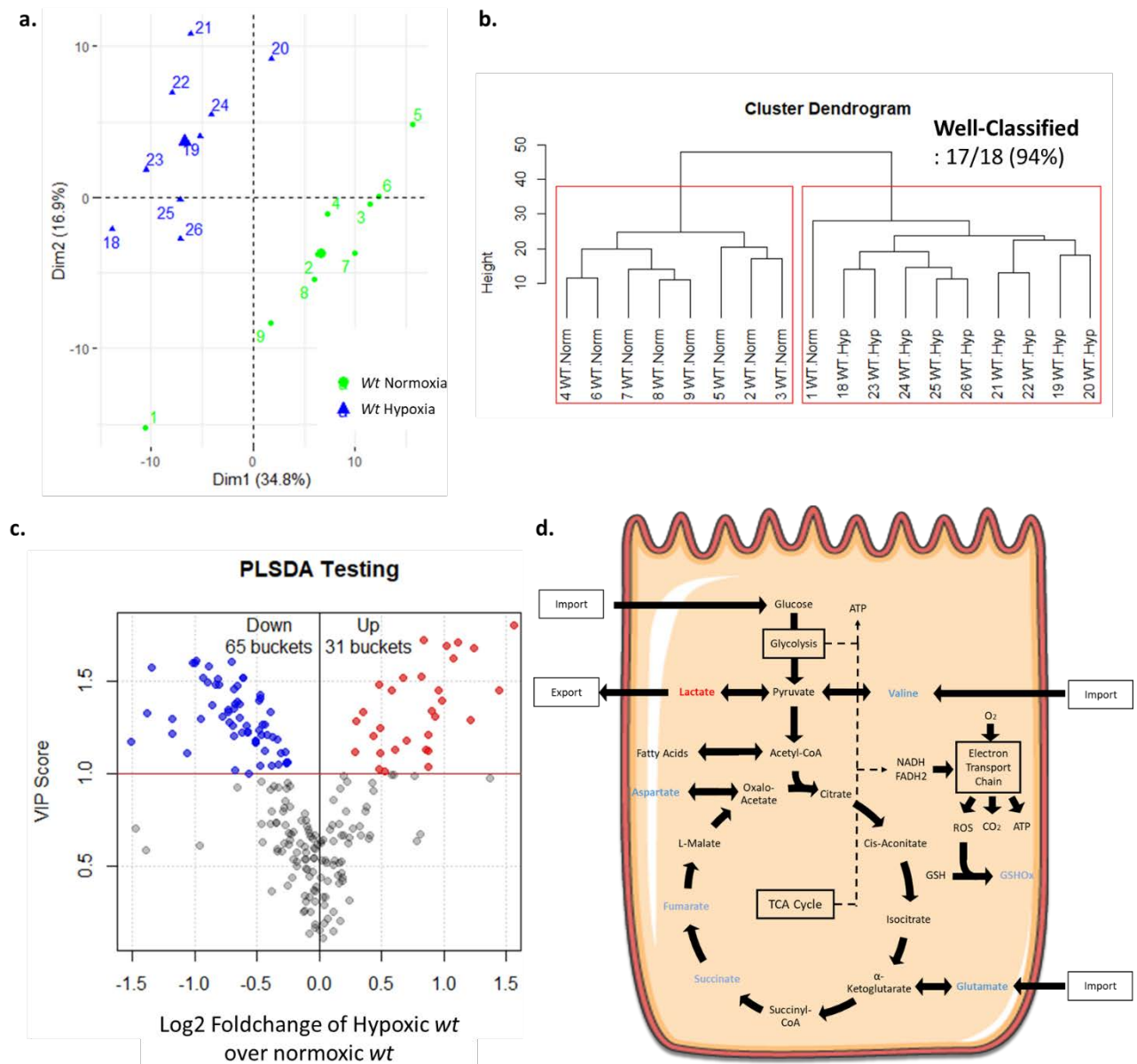
**Figure 5: Synthetic view of hypoxia exposure and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> on energetic metabolism using data obtained from metabolomic analysis.**



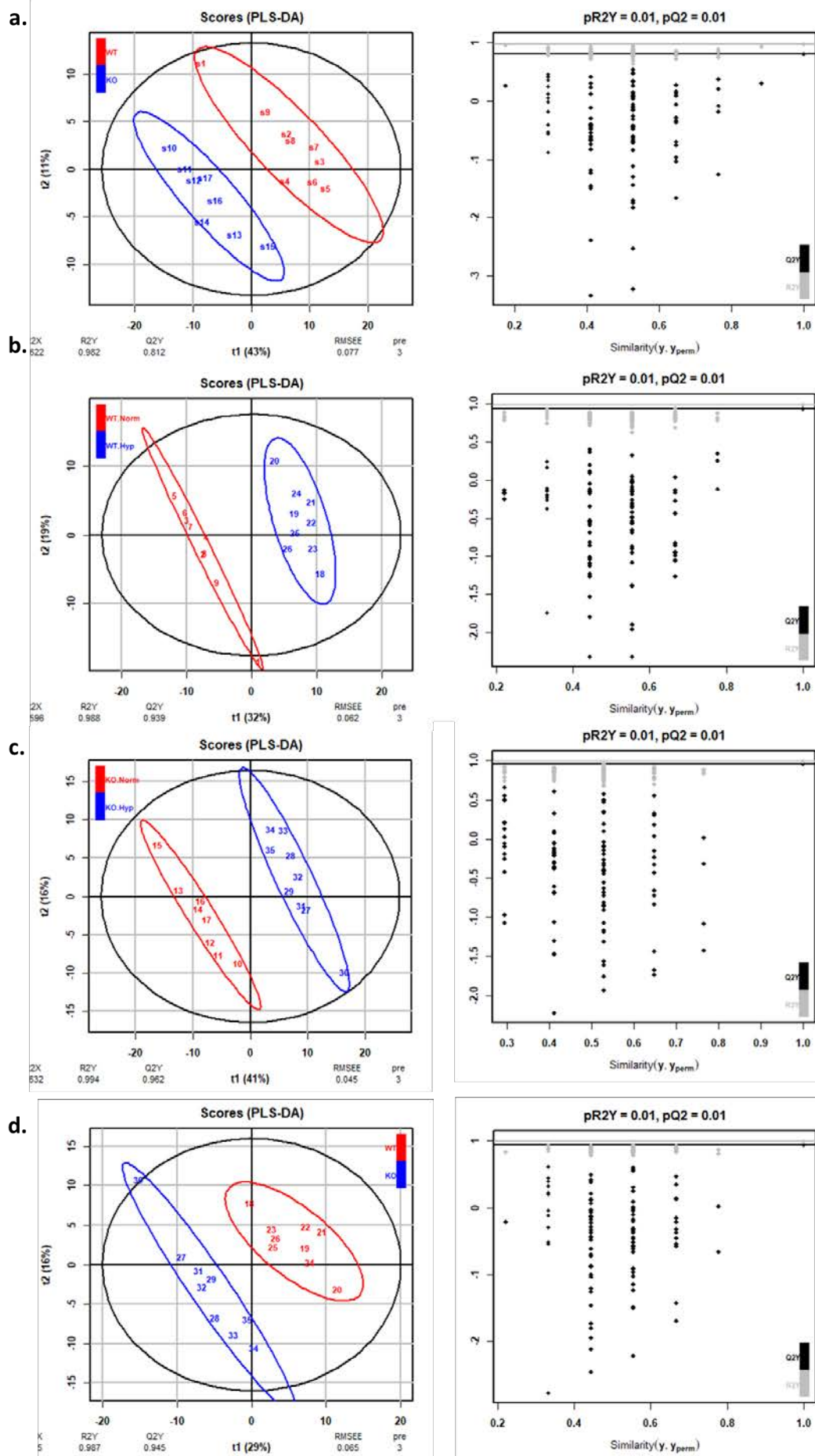




**Figure 6: *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells exhibit reduced expression of Choline Kinase  $\alpha$  (Chk $\alpha$ ) that could account for reduced phosphocholine abundance.** a. Schematic representation of changes in the phosphatidyl choline synthesis pathway from metabolome and transcriptome data. Slc, Solute Carrier; Cdhd, Choline Deshydrogenase; Badh, Betaine Aldehyde deshydrogenase; Aldh, Aldehyde Deshydrogenase; Chk, Choline Kinase; Pcyt1, Phosphocholine Cytidyltransferase1; Chpt1, Cholinephosphotransferase 1; Cept1, Choline/Ethanolamine phosphotransferase 1; FA, Fatty Acid; Pla, Phospholipase a; Plb, Phospholipase b; Lpl, Lysophospholipase; Gdpd5, Glycerophosphocholine:Choline Phosphodiesterase. b. Volcano plot displaying results from the reanalysis of previously published RNA-Seq data (Chan et al. JASN 2018). Significantly different gene candidates that explain metabolomic abnormalities are highlighted (Red, Choline Kinase Isoform expression; Dark green, BCAA/ AAA Metabolism; Dark blue, Energy Metabolism; Grey, Common to BCAA / AAA Metabolism and Energy Metabolism. c. RT-qPCR analysis of Choline Kinase  $\alpha$  expression in MCT *wt* and *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells under basal conditions. d. Data from a previously published ChIP-Seq analysis in the vicinity of the *Chka* TSS (-30 kb ; +10 kb). ENCODE data available for DNase sensitivity, RNA Pol II localization and Enhancer/Promoter associated Histone marks in mouse kidney were added.



**Supplementary Figure S1: Hypoxic exposure induces a metabolic switch.** a. The first two principal components of metabolome analysis of *wt* cells exposed (blue) or not (green) to hypoxia (1%, 24h). b. Dendrogram obtained from hierarchical clustering on centered scaled metabolomic data in *wt* cells exposed or not to hypoxia (1%, 24h). c. Volcano-plot representing VIP-Score for all buckets from PLS-DA (as a function of *wt* hypoxia over *wt* normoxia fold-change). The brown horizontal line represents the significance threshold. d. Schematic view of differentially represented metabolites from a bioenergetic network.



**Supplementary Figure S2: Evaluation of PLS-DA models.** PLSDA models that compare a. normoxic *wt* cells to normoxic *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells, b. normoxic *wt* to hypoxic *wt* cells, c. normoxic *Hnf1b*<sup>-/-</sup> to hypoxic *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells, d. hypoxic *wt* cells to hypoxic *Hnf1b*<sup>-/-</sup> cells.

Gene	Species	Forward Primer	Reverse Primer
<i>Chka</i>	Mm	5' CAG GGG TGG TCT CAG TAA CAT 3'	5' CGC AAG AGC ACT TTC CGA G 3'
<i>Mct4</i>	Mm	5' CAA CAA GCG TCG CCC TAT TG 3'	5' CCG CCA ACC ATA GTG ATC CTG 3'
<i>Slc16a10</i>	Mm	5' CCC CAT CGT GAG TGT CTT C 3'	5' TCC ATA GGT GAG GTA CAG AGG 3'
<i>Slc6a18</i>	Mm	5' TGG AGG CTA CTG GTT GGA GAT 3'	5' GGA AAA TGT TCC GTT TCA TCC CA 3'
<i>Slc6a19</i>	Mm	5' CAT CGG TCA GAG GCT ACG C 3'	5' GAT GAT GGT GTT GTA GTA CAG GC 3'
<i>Hprt</i>	Mm	5' CCC CAA AAT GGT TAA GGT TGC 3'	5' AAC AAA GTC TGG CCT GTA TCC 3'

**Supplementary Table S1:** list of primers

## References

1. Bhargava, P. & Schnellmann, R. G. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol* 13, 629–646 (2017).
2. Liu, J. et al. Regulation of Nephron Progenitor Cell Self-Renewal by Intermediary Metabolism. *J Am Soc Nephrol* 28, 3323–3335 (2017).
3. Kang, H. M. et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med* 21, 37–46 (2015).
4. Li, S.-Y. & Susztak, K. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) in Kidney Disease. *Semin Nephrol* 38, 121–126 (2018).
5. Miguel, V. et al. Renal tubule Cpt1a overexpression protects from kidney fibrosis by restoring mitochondrial homeostasis. *J Clin Invest* (2021) doi:10.1172/JCI140695.
6. Coffinier, C., Barra, J., Babinet, C. & Yaniv, M. Expression of the vHNF1/HNF1beta homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mech Dev* 89, 211–213 (1999).
7. Coffinier, C., Thépot, D., Babinet, C., Yaniv, M. & Barra, J. Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development* 126, 4785–4794 (1999).
8. Gresh, L. et al. A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J* 23, 1657–1668 (2004).
9. Verdeguer, F. et al. A mitotic transcriptional switch in polycystic kidney disease. *Nat Med* 16, 106–110 (2010).
10. Heliot, C. et al. HNF1B controls proximal-intermediate nephron segment identity in vertebrates by regulating Notch signalling components and *Irxf1/2*. *Development* 140, 873–885 (2013).
11. Massa, F. et al. Hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$  controls nephron tubular development. *Development* 140, 886–896 (2013).
12. Ma, Z. et al. Mutations of HNF-1beta inhibit epithelial morphogenesis through dysregulation of SOCS-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20386–20391 (2007).
13. Naylor, R. W., Przepiorski, A., Ren, Q., Yu, J. & Davidson, A. J. HNF1 $\beta$  is essential for nephron segmentation during nephrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 24, 77–87 (2013).
14. Adalat, S. et al. HNF1B mutations associate with hypomagnesemia and renal magnesium wasting. *J Am Soc Nephrol* 20, 1123–1131 (2009).
15. Kompatscher, A. et al. Loss of transcriptional activation of the potassium channel Kir5.1 by HNF1 $\beta$  drives autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease. *Kidney Int* 92, 1145–1156 (2017).
16. Ferrè, S., Veenstra, G. J. C., Bouwmeester, R., Hoenderop, J. G. J. & Bindels, R. J. M. HNF-1B specifically regulates the transcription of the  $\gamma$ -subunit of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 404, 284–290 (2011).
17. Kompatscher, A. et al. Transcription factor HNF1 $\beta$  regulates expression of the calcium-sensing receptor in the thick ascending limb of the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 315, F27–F35 (2018).

18. Aboudehen, K. et al. Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$  Regulates Urinary Concentration and Response to Hypertonicity. *J Am Soc Nephrol* 28, 2887–2900 (2017).
19. Clissold, R. L., Hamilton, A. J., Hattersley, A. T., Ellard, S. & Bingham, C. HNF1B-associated renal and extra-renal disease-an expanding clinical spectrum. *Nat Rev Nephrol* 11, 102–112 (2015).
20. Dubois-Laforge, D. et al. Diabetes, Associated Clinical Spectrum, Long-term Prognosis, and Genotype/Phenotype Correlations in 201 Adult Patients With Hepatocyte Nuclear Factor 1B (HNF1B) Molecular Defects. *Diabetes Care* 40, 1436–1443 (2017).
21. Faguer, S. et al. Diagnosis, management, and prognosis of HNF1B nephropathy in adulthood. *Kidney Int* 80, 768–776 (2011).
22. Heidet, L. et al. Spectrum of HNF1B mutations in a large cohort of patients who harbor renal diseases. *Clin J Am Soc Nephrol* 5, 1079–1090 (2010).
23. Lokmane, L., Heliot, C., Garcia-Villalba, P., Fabre, M. & Cereghini, S. vHNF1 functions in distinct regulatory circuits to control ureteric bud branching and early nephrogenesis. *Development* 137, 347–357 (2010).
24. Adalat, S. et al. HNF1B Mutations Are Associated With a Gitelman-like Tubulopathy That Develops During Childhood. *Kidney Int Rep* 4, 1304–1311 (2019).
25. Chan, S. C. et al. Mechanism of Fibrosis in HNF1B-Related Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 29, 2493–2509 (2018).
26. Casemayou, A. et al. Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$  Controls Mitochondrial Respiration in Renal Tubular Cells. *J Am Soc Nephrol* 28, 3205–3217 (2017).
27. Simon, N. & Hertig, A. Alteration of Fatty Acid Oxidation in Tubular Epithelial Cells: From Acute Kidney Injury to Renal Fibrogenesis. *Front Med (Lausanne)* 2, 52 (2015).
28. Tran, M. et al. PGC-1 $\alpha$  promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice. *J Clin Invest* 121, 4003–4014 (2011).
29. Lan, R. et al. Mitochondrial Pathology and Glycolytic Shift during Proximal Tubule Atrophy after Ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol* 27, 3356–3367 (2016).
30. Haverty, T. P. et al. Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol* 107, 1359–1368 (1988).
31. Emma, F., Montini, G., Parikh, S. M. & Salviati, L. Mitochondrial dysfunction in inherited renal disease and acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 12, 267–280 (2016).
32. Wu, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37, 1–17 (2009).
33. Kim, S., Na, J.-Y., Song, K. & Kwon, J. In vivo protective effect of phosphatidylcholine on carbon tetrachloride induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol* 68, 553–558 (2016).
34. Aboudehen, K. et al. Transcription Factor Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$  Regulates Renal Cholesterol Metabolism. *J Am Soc Nephrol* 27, 2408–2421 (2016).

35. Ferrè, S. & Igarashi, P. New insights into the role of HNF-1 $\beta$  in kidney (patho)physiology. *Pediatr Nephrol* 34, 1325–1335 (2019).
36. Desgrange, A. et al. HNF1B controls epithelial organization and cell polarity during ureteric bud branching and collecting duct morphogenesis. *Development* 144, 4704–4719 (2017).
37. Bockenhauer, D. & Jaureguiberry, G. HNF1B-associated clinical phenotypes: the kidney and beyond. *Pediatr Nephrol* 31, 707–714 (2016).
38. Yadav, H. et al. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- $\beta$ /Smad3 signaling. *Cell Metab* 14, 67–79 (2011).
39. Okamoto, T. et al. Hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ ) promotes glucose uptake and glycolytic activity in ovarian clear cell carcinoma. *Mol Carcinog* 54, 35–49 (2015).
40. Yamaguchi, K. et al. Identification of an ovarian clear cell carcinoma gene signature that reflects inherent disease biology and the carcinogenic processes. *Oncogene* 29, 1741–1752 (2010).
41. Mandai, M. et al. Ovarian clear cell carcinoma meets metabolism; HNF-1 $\beta$  confers survival benefits through the Warburg effect and ROS reduction. *Oncotarget* 6, 30704–30714 (2015).
42. Amano, Y. et al. Metabolic alterations caused by HNF1 $\beta$  expression in ovarian clear cell carcinoma contribute to cell survival. *Oncotarget* 6, 26002–26017 (2015).
43. Bonventre, J. V. & Weinberg, J. M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 14, 2199–2210 (2003).
44. Lankadeva, Y. R., Okazaki, N., Evans, R. G., Bellomo, R. & May, C. N. Renal Medullary Hypoxia: A New Therapeutic Target for Septic Acute Kidney Injury? *Semin Nephrol* 39, 543–553 (2019).
45. Basile, D. P., Anderson, M. D. & Sutton, T. A. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol* 2, 1303–1353 (2012).
46. Shu, S. et al. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Kidney Injury and Repair. *Cells* 8, (2019).
47. Mimura, I. & Nangaku, M. The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* 6, 667–678 (2010).
48. He, L. et al. AKI on CKD: heightened injury, suppressed repair, and the underlying mechanisms. *Kidney Int* 92, 1071–1083 (2017).
49. Bueno, M., Calyeca, J., Rojas, M. & Mora, A. L. Mitochondria dysfunction and metabolic reprogramming as drivers of idiopathic pulmonary fibrosis. *Redox Biol* 33, 101509 (2020).
50. Li, X. et al. Mitochondrial dysfunction in fibrotic diseases. *Cell Death Discov* 6, 80 (2020).
51. Samuvel, D. J., Sundararaj, K. P., Nareika, A., Lopes-Virella, M. F. & Huang, Y. Lactate boosts TLR4 signaling and NF-kappaB pathway-mediated gene transcription in macrophages via monocarboxylate transporters and MD-2 up-regulation. *J Immunol* 182, 2476–2484 (2009).
52. Ding, H. et al. Inhibiting aerobic glycolysis suppresses renal interstitial fibroblast activation and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 313, F561–F575 (2017).



53. Yin, X.-N., Wang, J., Cui, L.-F. & Fan, W.-X. Enhanced glycolysis in the process of renal fibrosis aggravated the development of chronic kidney disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22, 4243–4251 (2018).
54. Wei, Q. et al. Glycolysis inhibitors suppress renal interstitial fibrosis via divergent effects on fibroblasts and tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 316, F1162–F1172 (2019).
55. Colegio, O. R. et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 513, 559–563 (2014).
56. Shen, Y. et al. Tubule-derived lactate is required for fibroblast activation in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 318, F689–F701 (2020).
57. Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S. & Nicotera, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185, 1481–1486 (1997).
58. Eguchi, Y., Shimizu, S. & Tsujimoto, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57, 1835–1840 (1997).
59. Nicotera, P., Leist, M. & Ferrando-May, E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 102–103, 139–142 (1998).
60. Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G. & Lippincott-Schwartz, J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11960–11965 (2009).
61. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033 (2009).
62. Zhu, J. & Thompson, C. B. Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 436–450 (2019).
63. He, Z., Zhu, X., Shi, Z., Wu, T. & Wu, L. Metabolic Regulation of Dendritic Cell Differentiation. *Front Immunol* 10, 410 (2019).
64. Almeida, L., Lochner, M., Berod, L. & Sparwasser, T. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin Immunol* 28, 514–524 (2016).
65. Zheng, X. et al. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *Elife* 5, (2016).
66. Zhang, J., Nuebel, E., Daley, G. Q., Koehler, C. M. & Teitell, M. A. Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. *Cell Stem Cell* 11, 589–595 (2012).
67. Kent, C. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Prog Lipid Res* 29, 87–105 (1990).
68. Toback, F. G., Havener, L. J., Dodd, R. C. & Spargo, B. H. Phospholipid metabolism during renal regeneration after acute tubular necrosis. *Am J Physiol* 232, 216–222 (1977).
69. Solati, Z., Edel, A. L., Shang, Y., O, K. & Ravandi, A. Oxidized phosphatidylcholines are produced in renal ischemia reperfusion injury. *PLoS One* 13, e0195172 (2018).

70. Rao, S. et al. Early lipid changes in acute kidney injury using SWATH lipidomics coupled with MALDI tissue imaging. *Am J Physiol Renal Physiol* 310, F1136-1147 (2016).
71. Scantlebery, A. M. et al. The dysregulation of metabolic pathways and induction of the pentose phosphate pathway in renal ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* (2020) doi:10.1002/path.5605.
72. Nagarajan, S. R. et al. Lipid and glucose metabolism in hepatocyte cell lines and primary mouse hepatocytes: a comprehensive resource for in vitro studies of hepatic metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 316, E578–E589 (2019).
73. Khundmiri, S. J., Chen, L., Lederer, E. D., Yang, C.-R. & Knepper, M. A. Transcriptomes of Major Proximal Tubule Cell Culture Models. *J Am Soc Nephrol* 32, 86–97 (2021).
74. Beckonert, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols* 2, 2692–2703 (2007).
75. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550 (2014).
76. Lê, S., Josse, J. & Husson, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* 25, 1–18 (2008).
77. Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. <https://rpkgs.datanovia.com/factoextra/index.html>.
78. Thévenot, E. A., Roux, A., Xu, Y., Ezan, E. & Junot, C. Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. *J. Proteome Res.* 14, 3322–3335 (2015).

### 3. Discussion :

Dans ce travail nous avons ainsi démontré que l'invalidation d'*Hnf1b* dans une lignée tubulaire proximale murine induit une réorientation basale du métabolisme énergétique, avec réduction du métabolisme oxydatif et augmentation de la glycolyse, correspondant à un effet Warburg. Cette modification basale ne permet pas d'adaptation supplémentaire en cas d'exposition à un stress hypoxique, mécanisme lésionnel classique dans les IRA, laissant supposer une capacité d'adaptation limitée. Nous avons également montré que des anomalies potentiellement attribuables à ce déficit énergétique étaient présentes dans les cellules KO (excès de mort cellulaire) sans pouvoir pour le moment établir un lien de causalité.

Ces anomalies pourraient correspondre à un nouveau mécanisme physiopathologique impliqué dans l'atteinte rénale de la maladie liée aux variations du gène *HNF1b*. Ainsi cette modification du métabolisme basal et ces conséquences favoriseraient l'apparition d'une fibrose tubulo-interstitielle et l'altération progressive de la fonction rénale observée chez ces patients. De plus, l'absence d'adaptation métabolique à l'agression pourrait participer aux épisodes de détérioration brutaux du DFG parfois observés. Le ciblage de telles anomalies pourrait être une cible thérapeutique intéressante chez ces malades. Enfin nous avons également montré que les cellules *Hnf1b*<sup>-/-</sup> présentent des anomalies métaboliques dépassant le cadre du métabolisme énergétique avec notamment perturbation de la biosynthèse des phospholipides semblant lié à un blocage de la transition choline-phosphocholine. Ces anomalies seraient en lien avec une régulation directe de choline kinase  $\alpha$  par HNF-1 $\beta$ . Ce rôle d'HNF-1 $\beta$  dans la régulation du métabolisme des phospholipides, composants membranaires essentiels, n'avait jamais été décrit en dépit d'un lien connu avec le métabolisme du cholestérol <sup>220</sup>. De telles anomalies du métabolisme des phospholipides pourrait être intéressantes dans le développement et la régénération post-agression, situation où une prolifération cellulaire intense intervient, nécessitant la production de ces composés membranaires. Cependant dans le cas particulier de *CHKA*, une réduction d'activité proche, observée en cas d'invalidation hétérozygote ne s'accompagne d'aucune anomalie développementale évidente <sup>627</sup>. Ces anomalies pourraient avoir un rôle encore plus net dans la compréhension du rôle de HNF-1 $\beta$  dans la genèse et l'agressivité des certaines maladies tumorales (cancer ovarien à cellules claires par exemple) où le rôle de *Chka* est bien plus documenté

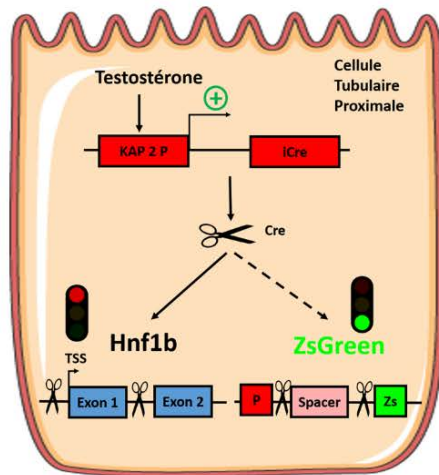
628–634 .

Au-delà de ces quelques conclusions intéressantes, ce travail présente un certain nombre de limites majeures, que nous avons essayé de combler avec plus ou moins de réussite.

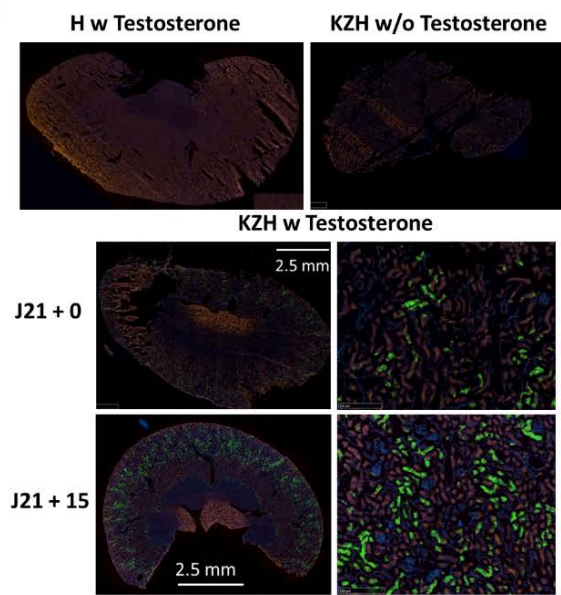
La principale limite de cet article est l'utilisation exclusive d'une lignée cellulaire immortalisée murine (MCT) qui n'assure ni une transférabilité aux cellules physiologiques, ni la pratique clinique chez homme ni la spécificité des conclusions obtenues.

Pour s'assurer de la transférabilité aux cellules physiologique, le projet comprenait initialement la création d'une lignée de souris triple transgénique permettant une invalidation inductible spécifiquement tubulaire proximale du gène *Hnf1b*. Ces souris C57Bl6J (*Kap2iCre/ZsGreen/Hnf1b<sup>lox-fox</sup>*) et des contrôles hétérozygotes (*Kap2iCre/ZsGreen/Hnf1b<sup>fox</sup>*) ou homozygote (*Kap2iCre/ZsGreen*) associés auraient permis, après induction d'une Cre recombinase, à l'âge adulte et sélectivement dans le tubule proximal, l'invalidation du gène *Hnf1b* (Cre recombinaison avec perte de l'exon 1) mais aussi un marquage fluorescent vert des cellules recombinaisons (Cre recombinaison avec perte du spacer). (**Figure 16a**) Ce modèle devait valider les observations *in vivo* en conditions basale et d'agression mais aussi donner accès à des cultures primaires de cellules tubulaires proximales invalidées ou non (tri cellulaire sur la fluorescence verte largement supérieure à l'autofluorescence verte habituelle). Cette validation semblait indispensable du fait que les caractéristiques des lignées immortalisées utilisées sont modifiées par rapport aux cellules physiologiques notamment sur le plan du métabolisme avec en particulier une tendance à switcher pour un métabolisme glycolytique <sup>104</sup>. Malheureusement, en dépit d'un génotype correct et d'une bonne activation du rapporteur fluorescent témoignant d'une activité Cre recombinase (**Figure 16b**), il nous a été impossible d'obtenir une invalidation d'*Hnf1b*, et donc une réduction de l'expression génique d'*Hnf1b* et de ces cibles sur rein total comme sur des populations cellulaires triées (**Figure 16cd, et données non montrées**). Il semblerait que la CRE-recombinase n'ait pu accéder au locus d'*Hnf1b* malgré de multiples tentatives. L'échec de ce pan du projet a limité considérablement l'impact potentiel et le niveau de la publication. Devant le temps nécessaire à la création d'un modèle et les contraintes liées au contexte sanitaire, l'obtention d'un nouveau modèle murin n'a pas pu être envisagée dans le cadre de cette thèse.

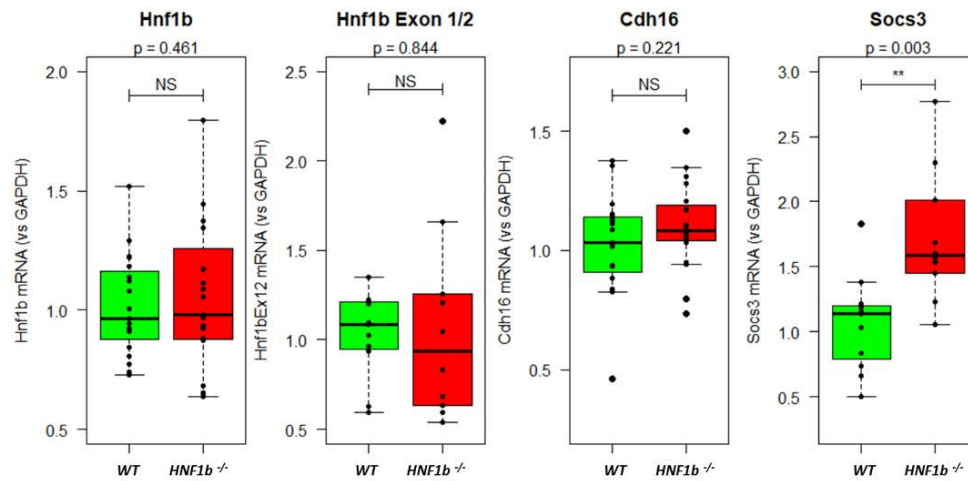
a.



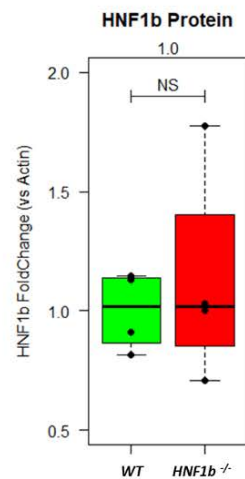
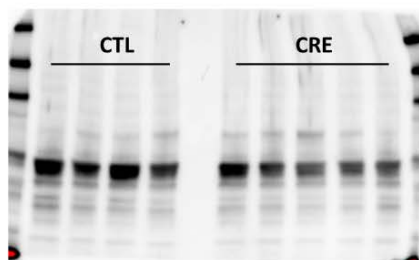
b.



c.

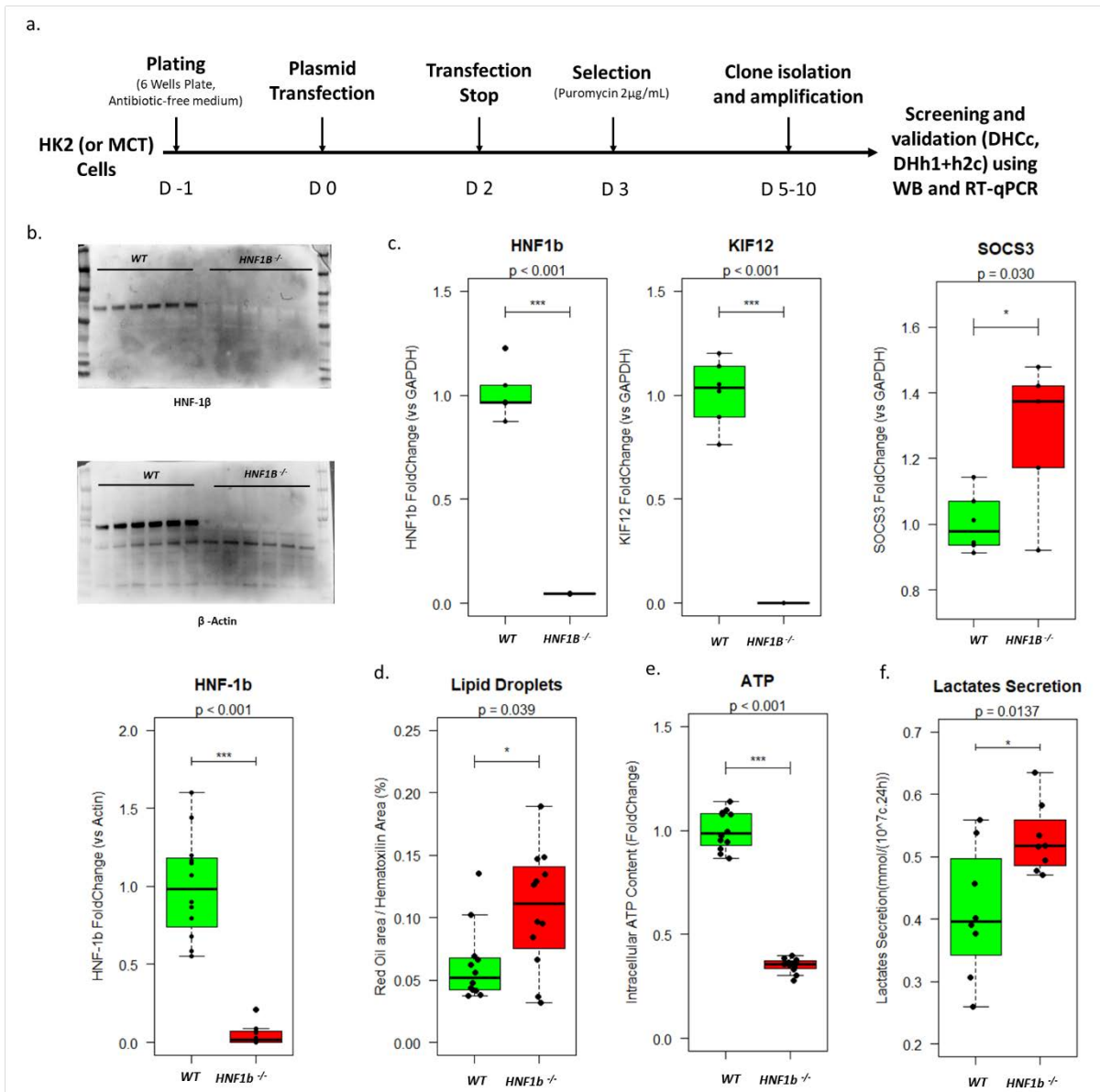


d.



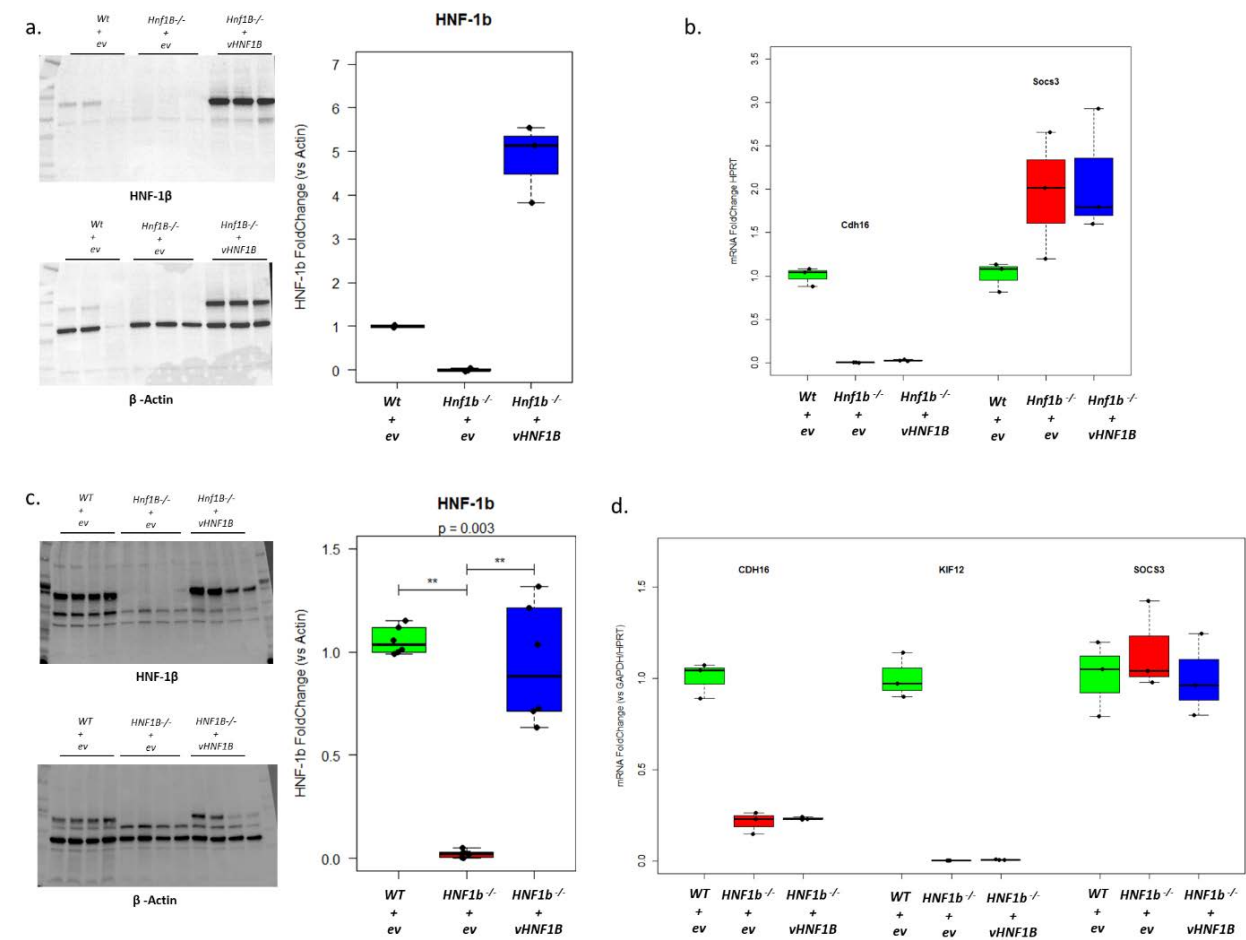
**Figure 16 : Echec de la validation du KO tubulaire proximal d'HNF1b dans la lignée murine KZH. a.** Représentation schématique du mécanisme d'invalidation dans la lignée murine triple transgénique KZH (*Kap2-iCre/ZSGreen/HNF1b<sup>flox/flox</sup>*). L'exposition à de la testostérone (1 mg/j SC 5 jours sur 7 pendant 21 jours, utilisation de souris femelles de 8 semaines), active le promoteur *Kap2* spécifiquement dans les cellules épithéliales tubulaires proximales rénales permettant l'expression de la Cre recombinase. Cette enzyme élimine le spacer du locus *ZSGreen* permettant son expression et l'apparition d'une fluorescence spontanée verte du cytoplasme. La Cre recombinase élimine aussi la séquence codant le premier exon du gène *Hnf1b* résultant en son invalidation. **b.** Coupes de rein de souris contrôles (*Hnf1b<sup>flox/flox</sup>* mice exposées à la testostérone et *Kap2-iCre/ZSGreen/Hnf1b<sup>flox-flox</sup>* non exposées à la testostérone) et cas (*Kap2-iCre/ZSGreen/Hnf1b<sup>flox-flox</sup>* avec exposition à la testostérone pendant 21 jours suivi d'une période d'activation de 15 jours). Des coupes par cryostat de reins inclus en OCT ont été colorées en utilisant le DAPI (bleu) et la Lotus tetraglobulus lectine (rouge) avec visualisation au microscope à fluorescence conventionnel. **c.** Expressions au niveau transcriptionnel du transcrit classique d'*Hnf1b*, de l'exon 1/2 de ce même gène et de deux gènes cibles d'HNF-1β (*Cdh16*, *Socs3*) évaluées par RT-qPCR dans les souris cas et contrôles. La quantification a été réalisée par méthode 2-ddCt en utilisant la *Gapdh* et les souris contrôles comme normalisateurs. **d.** Expression de la protéine HNF-1β dans un extrait de rein total dans les souris contrôles et cas par Western Blot. La β-actine a été utilisée comme normalisateur.

Pour valider la transférabilité de nos conclusions chez l'homme, nous avons donc créé une nouvelle lignée humaine tubulaire proximale (HK2) immortalisée invalidée ou non pour le gène *HNF1b* par approche CrispR-Cas9 (HNF-1β h/h2 ou Control Double Nickase Plasmid h/h2 Santa Cruz Biotechnology ; DharmaFECT Duo Transfection Reagent Horizon Discovery, Sélection par la Puromycine). (**Figure 17a**) Après validation de la transfection et de l'invalidation d'*HNF1B* (**Figure 17bc**), certains résultats essentiels ont pu être reproduits dans cette nouvelle lignée notamment les anomalies du métabolisme énergétique et les stigmates d'effet Warburg avec un profil plus franc que dans la lignée MCT. (**Figure 17def**) Néanmoins n'apportant pas d'information nouvelle majeure, ces résultats n'ont pas été retenu pour être inclus dans le manuscrit final.



**Figure 17 : Validation des anomalies métaboliques majeures dans la lignée HK2 *HNF1B*<sup>-/-</sup>.** **a.** Pipeline de CrispR-Cas9 utilisé pour les cellules HK2. **b.** Confirmation de l'invalidation d'*HNF1b* dans les cellules HK2 au niveau protéique par Western Blot. **c.** Confirmation de l'invalidation d'*HNF1b* dans les cellules HK2 au niveau transcriptomique par RT-qPCR sur le gène *HNF1b* et deux cibles *HNF1b* (*KIF12* and *SOCS3*). **d.** Quantification du marquage RedOil intracellulaire dans les cellules HK2 WT et *HNF1b*<sup>-/-</sup>. **e.** Contenu intracellulaire normalisé en ATP content dans les cellules HK2 WT and *HNF1b*<sup>-/-</sup>. **f.** Sécrétion normalisée de lactates dans les cellules HK2 WT et *HNF1b*<sup>-/-</sup>.

Pour s'assurer de la spécificité du lien entre l'invalidation de *Hnf1b* et ces anomalies métaboliques, nous avons évalué l'effet d'une réexpression de la protéine HNF-1b dans nos deux lignées cellulaires. Nous avons ainsi tenté de réexprimer cette protéine grâce à une transfection de plasmide codant pour la protéine HNF-1 $\beta$  humaine sous la dépendance d'un promoteur CMV dans nos deux lignées cellulaires invalidées (MCT, HK2) et les avons comparées aux cellules invalidées ou non transfectées par un vecteur vide. Malgré l'obtention d'une expression protéique au moins aussi importante que dans les cellules sauvages (**Figure 18ac**), nous n'avons pas observé de correction des profils d'expression de gènes cibles connus de ce facteur de transcription tels *CDH16*, *KIF12* ou *SOC33*, signant l'inefficacité biologique probable de la protéine produite. (**Figure 18bd**) Dans ce contexte, les explorations n'ont pas été poussées plus loin.



**Figure 18 : Réexpression de la protéine HNF-1 $\beta$  dans les cellules MCT et HK2 *HNF1b* $^{-/-}$ .** **a.** Westernblot montrant l'efficacité de l'expression de la protéine HNF-1 $\beta$  par Western Blot dans les cellules MCT WT ou *Hnf1b* $^{-/-}$  transfectées avec un vecteur vide et les cellules MCT *Hnf1b* $^{-/-}$  transfectées avec le vecteur *HNF1b*. **b.** RT-qPCR de deux gènes cibles d'HNF-1 $\beta$  dans les cellules MCT montrant l'inefficacité du rescue malgré l'expression du vecteur. **c.** Western Blot montrant l'expression de la protéine HNF-1 $\beta$  dans les cellules HK2 WT ou *HNF1b* $^{-/-}$  transfectées par le vecteur vide et les cellules MCT *HNF1b* $^{-/-}$  transfectées par le vecteur *HNF1b*. **d.** RT-qPCR de deux gènes cibles d'HNF-1 $\beta$  dans les cellules HK2 montrant l'absence de rescue malgré la bonne expression du vecteur.



Une autre limite importante de ce travail correspond à l'utilisation de mesures « statiques » ne permettant pas de quantifier réellement les flux métaboliques. Nous avons également tenté de mettre en place des mesures dynamique par des approches de type Seahorse. Cependant, en raison des capacités d'adhérence altérées des cellules MCT *Hnf1b*<sup>-/-</sup> et de l'agitation induite par le Seahorse, nous avons échoué à obtenir des expérimentations analysables malgré l'utilisation de coating spécifiques (Maptrix). (**Données non montrées**)

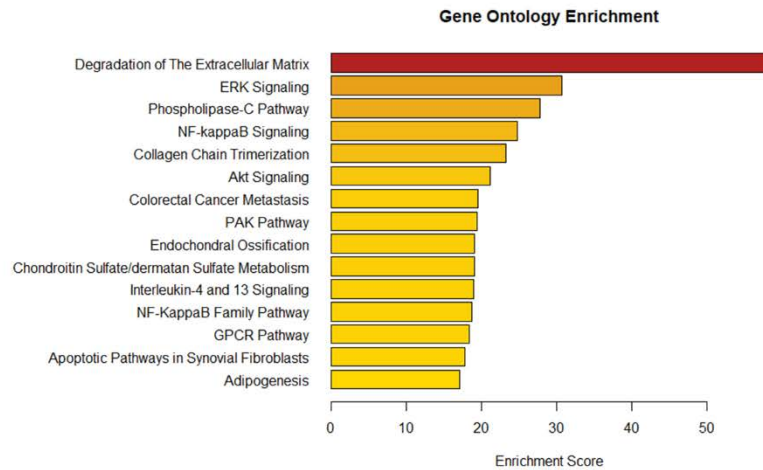
Enfin une dernière limite méthodologique correspond à l'utilisation de données publiées sur une lignée différente pour les analyses en RNASeq ou ChIPSeq. D'une part les cellules diffèrent par leur origine, nos analyses ont portées sur des lignées cellulaires tubulaires proximales (MCT, HK2) alors que ces données publiées sont issues de cellules collectrices (mIMCD3). Ces deux types de cellules épithéliales présentent des propriétés et des profils d'expression génique très différents. Un bel exemple correspond à la co-expression de HNF-1α dans le tubule proximal mais pas le canal collecteur. Ce facteur de transcription présente des cibles communes avec HNF-1β comme par exemple certains transporteurs d'anions organiques impliqués dans le transport des acides aminés (OATs). Un autre exemple correspond aux profils métaboliques supposés différents (tubule proximal oxydatif, canal collecteur glycolytique) entre ces segments ou encore le profil d'expression des transporteurs membranaires très différent entre les deux segments. D'autre part, bien qu'ayant bénéficié d'une invalidation par méthode CrispR-Cas9 les analyses portent sur des anomalies génétiques différentes avec potentiellement une corrélation génotype-phénotype. Bien que purement exploratoires et faisant l'objet d'une validation dans notre lignée, l'interprétation des conclusions est extrêmement difficile. Notamment, l'absence d'anomalies dans ces données de RNASeq expliquant nos anomalies métaboliques n'exclut pas la présence d'anomalies transcriptionnelles différentes dans nos cellules. A l'inverse de nombreuses anomalies n'ont pas pu être confirmées dans nos cellules. Cependant, lors de la constatation d'anomalies reproductibles entre les lignées, l'utilisation de ces diverses sources devient un atout, renforçant l'idée d'une généralisation probable de nos conclusions.

En dépit des limites précédentes, justifiant des explorations supplémentaires, les conclusions de cette première étude soulèvent plusieurs perspectives intéressantes dont certaines sont déjà en cours d'exploration.

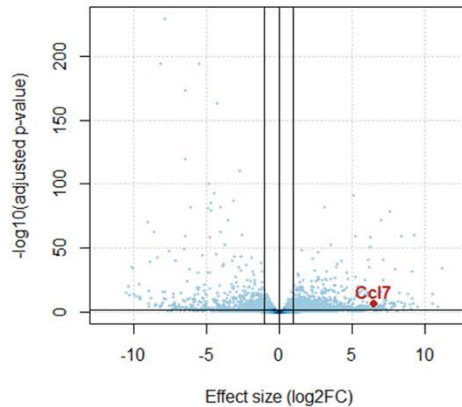
**La première perspective** intéressante correspond à l'exploration de la responsabilité de ces anomalies du métabolisme énergétique dans l'altération du phénotype épithélial et le phénotype des patients avec anomalies du gène *HNF1b* notamment leur sensibilité accrue aux agressions et la progression de la fibrose tubulo-interstitielle. La première chose à faire serait de mieux décrire des conséquences potentielles de ces anomalies métaboliques à l'échelle cellulaire (type de mort cellulaire, différenciation, sécrétome, modulation du comportement des cellules immunitaires...) mais aussi *in vivo*. Un axe intéressant pourrait correspondre à l'effet immunologique de la réorientation métabolique. Il est documenté dans de nombreux types

cellulaires, notamment au sein des cellules de l'immunité innée, que l'orientation métabolique est associée à l'activation de certaines fonction inflammatoire<sup>635</sup>. Par exemple, les macrophages, lors de leur polarisation pro-inflammatoire M1, subissent une réorientation métabolique avec réduction du métabolisme oxydatif et augmentation de la glycolyse. Au-delà d'un simple effet latéral, cette réorientation métabolique semblent jouer un rôle important dans l'acquisition de cette polarisation<sup>635</sup>. Nous avons pu observer que les cellules *Hnf1b*<sup>-/-</sup> présentent des stigmates d'un profil pro-inflammatoire avec la voie *Nfkb* présente parmi les voies les plus enrichies dans les gènes différentiels en RNASeq. **(Figure 19a)** Des constatations similaires viennent d'être publiées par une autre équipe sans étudier le rôle exact dans l'inflammation<sup>250</sup>. Ces anomalies s'accompagnaient d'une augmentation basale, amplifiée après agression, de l'expression et la sécrétion de certains médiateurs pro-inflammatoires notamment la chimiokine CCL7. **(Figure 19bcde)** Des explorations *in vivo* (souris ko *Ccl7*), retardées par le contexte sanitaire, sont en cours pour confirmer le rôle délétère de cette cytokine dans plusieurs modèles d'IRA avant d'aller plus loin dans les explorations *in vitro*. Il conviendrait ensuite d'évaluer la responsabilité des perturbations métaboliques dans la genèse de ces anomalies, notamment via des expérimentations de sauvetage par exemple en utilisant une surexpression inducible de PGC-1 $\alpha$ . Enfin, en cas de lien direct sur un ou plusieurs paramètres pertinents, des approches de modulation pharmacologiques de l'activité de PGC-1 $\alpha$  pourront être tentées. A titre d'exemple le Resvératrol, connu pour un effet activateur de PGC-1 $\alpha$  via la Sirtuin 1, donne des résultats préliminaires intéressant en augmentant le taux intra-cellulaire en ATP et réduisant l'expression de *Ccl7* dans les cellules KO. **(Données non montrées)**

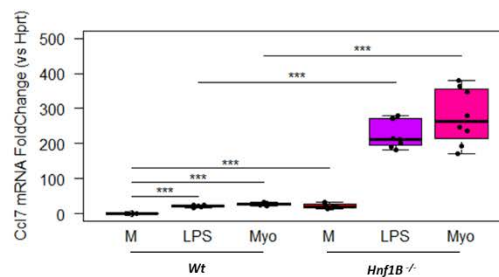
a.



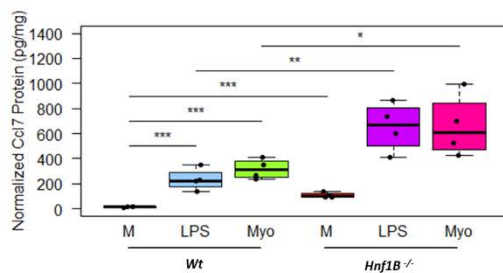
b.



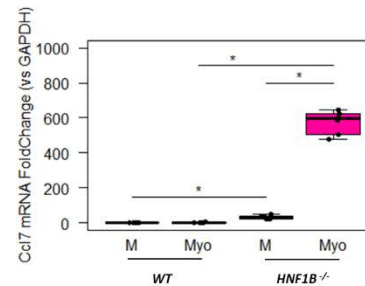
c.



d.



e.



**Figure 19 : Phénotype pro-inflammatoire des cellules *Hnf1b*<sup>-/-</sup> comparées aux Wt : Focus sur la chimiokine *Ccl7*.** a. Analyse d'enrichissement (Gene Ontology) au sein des gènes les plus surexprimés dans les cellules mIMCD3 *Hnf1b*<sup>-/-</sup> comparées aux cellules Wt en conditions basales. Réanalyse de données publiées (GSE 97770). b. Volcanoplot représentant les foldchange et p-value ajustée du transcrit de *Ccl7* dans les cellules mIMCD3 *Hnf1b*<sup>-/-</sup> comparées aux cellules Wt en conditions basales. Réanalyse de données publiées (GSE 97770). c. Expression ARN de *Ccl7* évaluée par RT-qPCR dans les cellules MCT Wt et *Hnf1b*<sup>-/-</sup> en conditions basales ou pro-inflammatoires (Lipopolysaccharide LPS 10 µg/L or Myoglobine Myo 250 µmol/L). d. Sécrétion de la protéine *Ccl7* évaluée par Elisa multiplexé dans le surnageant des cellules MCT Wt ou *Hnf1b*<sup>-/-</sup> en conditions basales ou pro-inflammatoires (Lipopolysaccharide LPS 10 µg/L or Myoglobine Myo 250 µmol/L). e. Expression Arn de *CCL7* évaluée par RT-qPCR dans les cellules HK2 WT et *HNF1B*<sup>-/-</sup> and WT HK2 cells en conditions basales ou pro-inflammatoires (Lipopolysaccharide LPS 10 µg/L or Myoglobine Myo 250 µmol/L).

**Une deuxième perspective** intéressante correspondrait à l'implication d'HNF-1 $\beta$  dans l'adaptation épithéliale d'autres organes à l'agression notamment sur le plan métabolique. Il pourrait être intéressant pour confirmer les données de Faguer et al 2013, d'évaluer les variations de l'expression d'HNF-1 $\beta$  dans différentes lignées cellulaires et tissus au cours de diverses agressions in vitro et in vivo, et de valider une association à l'apparition d'anomalies métaboliques. Par la suite des modèles de sur-expression d'HNF-1 $\beta$  pourrait être utilisés pour préciser si ce facteur de transcription permet une réversion des anomalies métaboliques observées.

**Un troisième axe de travail** intéressant pourrait être le rôle d'HNF-1 $\beta$  dans la régulation du métabolisme des phospholipides avec des implication en pathologie tant dans le développement, la réparation post-agression que certaines maladies tumorales. Il conviendrait dans un premier temps de valider les anomalies d'expression des différents acteurs (*Chka*, *Stard10*...) au niveau protéique et en termes d'activité dans les cellules *Hnf1b*<sup>-/-</sup>. Par la suite il conviendrait de confirmer les anomalies de la biosynthèse et du trafficking lipidique dans cette lignée par des approches ciblées et des manœuvres dynamiques (turn-over) avant d'évaluer leurs conséquences sur la composition des différents compartiment membranaires en condition basales, d'agression et de récupération. Puis l'effet de la sur-expression d'*Hnf1b* dans des cellules ne l'exprimant habituellement peu ou pas suivi sur l'expression de ces cibles et leurs conséquences métaboliques pourrait être étudiés. Après cette validation initiale, il faudra identifier des conséquences potentielles attribuables à ces anomalies (prolifération, mort cellulaire, invasivité...) et faire la preuve de la relation par des épreuves de sauvetage. Du point de vue mécanistique, la fixation sur les séquences régulatrices devra être confirmé par ChIP-qPCR dans notre lignée de même que l'implication de cette fixation sur la régulation du gène via des expériences de reporting. Enfin, il serait intéressant de confirmer la persistance de ces anomalies dans notre lignée cellulaire humaine et in vivo, et d'identifier des conséquences phénotypiques en lien avec ces anomalies (pathologie tumorale, réparation post -agression). Pour l'exemple de *Chka*, à priori en condition basales la perte partielle d'activité (50%) n'entraîne pas de phénotype notable chez la souris mais les choses sont différentes en pathologie tumorale et la documentation manque après agression. Ces anomalies pourraient in fine devenir la cible d'interventions thérapeutiques ciblées en pratique clinique dans les contextes sus-cités.

## Annexe 1 :

### Lignées cellulaires utilisées

- **Mouse Cortical Tubule cells (MCT)** <sup>636</sup>:

Cette lignée a été utilisée pour la majorité des explorations proposées (métabolomique, approches ciblées initiales type ATP/mesure consommation glucose/RedOil, RT-qPCR).

Il s'agit d'une lignée cellulaire transformée ancienne (1988). Elle est dérivée de tubules proximaux micro-disséqués obtenus à partir du cortex rénal d'un individu de l'espèce *Mus musculus* (souche : SJL) de sexe non connu. L'immortalisation a été obtenue par infection non répliquante permettant l'expression de l'antigène T du virus SV40.

Cette lignée cellulaire présente de nombreuses caractéristiques épithéliales tubulaire rénale (présence de cytokératine, pousse en couche monocellulaire avec inhibition de contact, expression de molécules d'adhérence permettant la formation de structure type desmosomes et jonction serrées, production de protéine matricielles épithéliales type collagène 4, expression de certaines molécules impliquées dans la formation du cil primaire sans preuve de la présence d'un cil primaire fonctionnel, dépendance du sérum pour la prolifération...). Ces cellules présentent également certaines caractéristiques proches de cellules tubulaires proximales (expression de l'alkaline phosphatase, cubiline, megaline... mais avec certaines discordances par ailleurs (absence d'expression des transporteurs membranaires des acides aminés par exemple)).

A notre connaissance, ces cellules n'ont pas fait l'objet d'un phénotypage métabolique étendu mais entre nos mains ces cellules présentent une très forte dépendance au glucose pour leur prolifération et leur survie avec des stigmate d'un métabolisme oxydatif actif en conditions basales (SeaHorse).

- **Human Kidney 2 (HK2)** <sup>637</sup>:

Cette lignée a été utilisée pour les expérimentations de validation de la transférabilité à l'homme (CrispR-Cas9, dosage ATP, dosage consommation glucose et production lactates, Red Oil...).

Il s'agit d'une lignée cellulaire immortalisée humaine ancienne (1994). Elle est issue de cellules tubulaires proximales micro-disséquées à partir d'un transplant rénal (*Homo sapiens* adulte, sexe masculin) récusé pour la greffe. Ces cellules ont bénéficié d'une immortalisation par infection rétrovirale non répliquante permettant l'expression des gènes E6/E7 du Human papilloma virus (HPV).

Cette lignée présente des caractéristiques épithéliales nettes (morphologie cuboïde, pousse en monocouche cellulaire avec inhibition de contact, formation de jonctions cellulaires type desmosomes et jonction serrées, expression de marqueurs épithéliaux...) mais aussi tubulaire proximales (présence d'une bordure en brosse, expression de marqueurs tubulaires proximaux type Gamma-glutamyl-transférase ou

GGT, leucine aminopeptidase ou LAP ou alcaline phosphatase ou acid phosphatase, présence des capacités de transport transmembranaire fortement dépendant du sodium...).

Cette lignée cellulaire n'a pas fait l'objet d'un phénotypage bioénergétique étendue mais semble moins dépendante du glucose pour sa croissance et sa survie que les lignées immortalisées habituelles. Cela argumenta en faveur d'une dépendance au moins partielle du métabolisme oxydatif pour sa production énergétique.

- **Mouse Inner Medullary Collecting Duct 3 (mIMCD3)** <sup>638</sup>:

Cette lignée, non utilisée dans notre laboratoire, a été utilisée par l'équipe du MD PhD Peter Igarashi (Ref Chen et al, Aboudehen et al.) pour la réalisation des explorations génomiques ré-analysées dans notre travail (RNA-Seq, ChIP-Seq). Ces données ont pu être récupérées à partir de GEO.

Il s'agit d'une lignée cellulaire murine ancienne (1993). Elle a été obtenue à partir de cellules obtenues par microdissection de tubules collecteurs médullaires de rein de souris transgéniques (Tg(SV40)Bri7 fond génétique hybride C57/SJL, sexe inconnu) exprimant l'antigène T précoce immortalisant du virus SV40. Ces cellules présentent de nombreuses caractéristiques épithéliales (culture en couche monocellulaire avec inhibition de contact, résistance transépithéliale élevée (jonctions serrées), : expression de protéines du cil primaire et présence d'un embryon ciliaire...) et surtout de nombreuses caractéristiques typique du tubule collecteur (résistance osmotique, accumulation d'anion en réponse à un environnement hyperosmolaire, sensibilité à l'amiloride et expression de ENAC...).

Le métabolisme de telles cellules est à notre connaissance pas exploré mais est attendu glycolytique.

## Annexe 2 :

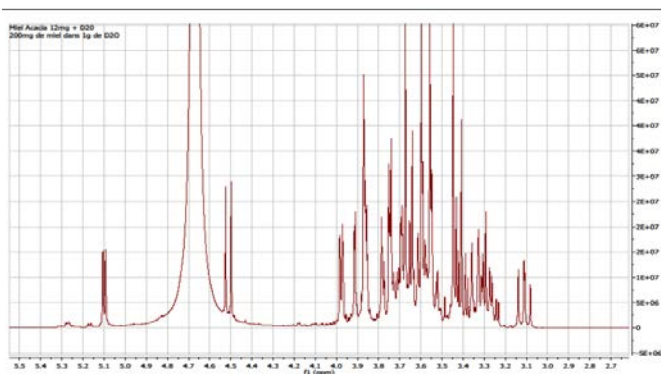
### Principe théorique et pratique de la H1-RMN spectrométrie

- **Principe de résonance magnétique nucléaire :**

Certains noyaux, notamment d'hydrogène (proton), se comporte comme un dipôle magnétique. Sous l'effet d'un champ magnétique, leur spin génère un moment magnétique animé d'un mouvement de précession centré sur l'axe du champ.

En RMN-spectrométrie, sous l'influence d'un champ magnétique basal intense, chaque noyau se présente dans un état basal énergétiquement minimal dans ce référentiel. Cet état correspond à un mouvement de son moment magnétique autour de l'axe de ce champ. Sous l'effet de l'exposition brève à un champs électromagnétique intermittent et orthogonal, le spin du noyau se dévie et atteint un nouvel état d'équilibre correspondant à une rotation de son moment magnétique autour d'un axe orthogonal aux deux axes des champs magnétiques. Lors de l'interruption du champ intermittent, le moment magnétique du spin va retourner à son état énergétique minimal autour de l'axe du champ basal, générant un signal électromagnétique de relaxation de fréquence mesurable.

La fréquence de ce signal est principalement déterminée par la nature du noyau en question permettant son identification. Cependant, elle est potentiellement influencée par l'environnement électromagnétique du noyau émetteur (effet bouclier) et donc la structure de la molécule (électrons, autres noyaux) au voisinage de celui-ci. Ce décalage de fréquence mesurable porte de nom de déplacement chimique. Ainsi chaque déplacement chimique correspond à un noyau dans un certain environnement électromagnétique. La H1-RMN spectrométrie utilise cette propriété du proton pour déterminer la composition d'un échantillon. La mesure d'une intensité de signal pour chaque déplacement chimique associé au proton dessine un spectre RMN comportant différents pics.



Exemple issu de :  
[http://www2.agroparistech.fr/IMG/pdf/rmn\\_du\\_miel\\_-2.pdf](http://www2.agroparistech.fr/IMG/pdf/rmn_du_miel_-2.pdf)

Ce spectre permet de déterminer l'environnement des protons et l'abondance de chaque dans l'échantillon. Il est alors possible de remonter à la composition moléculaire de celui-ci.

- **Mise en œuvre pratique pour l'étude des échantillons biologiques :**

L'échantillon biologique à analyser est extrait en présence d'un témoin d'extraction. Le choix de la procédure (en phase liquide avec récupération de la phase aqueuse dans notre cas) détermine la nature des espèces qui seront accessibles pour analyse.

Cet échantillon est préparé pour l'analyse (dosage protéine, reprise dans matrice d'analyse) avant une acquisition RMN permettant l'obtention d'un spectre [intensité =  $f(\text{déplacement chimique})$ ]. Ce spectre est alors normalisé (témoin d'extraction, dosage de protéine), découper en intervalles (buckets) de déplacement chimique régulier (binning, plusieurs résolutions possibles) et l'aire sous le spectre dans chaque bucket est mesurée.

Ces valeurs d'aires associées à chaque bucket pour les différents échantillons sont alors utilisées pour l'analyse statistique (PLSDA dans notre étude) permettant d'identifier les régions du spectre (buckets) différentielles entre des groupes d'échantillons.

A partir de ces buckets différentiels, il va être possible d'identifier les espèces moléculaires (métabolites) différentielles entre les groupes. Ce travail d'identification est complexe car chaque bucket peut correspondre à plusieurs molécules (présence de protons avec le même environnement) et chaque molécule peut être représentée par plusieurs buckets (présence de plusieurs protons avec des environnements différents). Cette étape requiert le recours à des atlas publiés recensant les spectres dans la matrice d'intérêt, à l'expérience de l'expérimentateur voire à des spikes à l'aide de molécules candidates ciblées. Malgré un gros travail d'analyse, il persiste souvent des buckets différentiels non attribués.

Au total ce type d'analyse fournit une quantification relative, supposée sans a priori, de l'ensemble des molécules extraites contenant des protons (métabolites). Une quantification absolue est possible mais nécessite une gamme de la molécule d'intérêt dans la même matrice.

#### Références :

- <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/spectroscopies/les-origines-de-l-irm-la-resonance-magnetique>.
- [https://pastel.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/503765/filename/these\\_jmagat\\_corps.pdf](https://pastel.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/503765/filename/these_jmagat_corps.pdf)



## Axe 2 : Anomalies de la biosynthèse du NAD et efficacité d'une supplémentation alternative

### 1. Introduction :

Le deuxième axe de mon travail de thèse s'est intéressé aux anomalies métaboliques de la biosynthèse du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) à partir du tryptophane en contexte d'IRA.

Le NAD, et son dérivé phosphorylé (NADP), sont des cofacteurs enzymatiques essentiels indispensables à de nombreuses réactions anaboliques et cataboliques notamment le métabolisme énergétique <sup>639</sup>. Les anomalies de la biosynthèse de ce métabolite pourraient expliquer une partie des modifications observées à la phase aigüe de l'IRA mais également une partie des promoteurs du développement de la fibrose tubulo-interstitielle.

Sa biosynthèse fait intervenir trois voies potentielles (**Figure 20**): la biosynthèse *de novo* à partir du tryptophane, la voie de biosynthèse *de novo* à partir de l'acide nicotinique (Preiss-Handler) et la voie dite de sauvetage à partir du nicotinamide (NAM) <sup>639</sup>. En contexte d'IRA, le synthèse *de novo* s'effondre entraînant un déficit en NAD tissulaire<sup>515,639,640</sup>. Ce déficit en NAD tissulaire est en lien avec l'altération de nombreuses fonctions enzymatiques cellulaires notamment le blocage du métabolisme énergétique oxydatif <sup>639</sup>. Ce blocage de la biosynthèse *de novo* à partir du tryptophane est en lien avec un déficit d'activité de l'enzyme QPRT mais aussi un déficit d'activité PGC-1 $\alpha$ , stimulant habituellement l'expression de différentes enzymes de cette voie. <sup>515,639,640</sup> Ce blocage s'associe au détournement des précurseurs vers des voies de dégradation dont les métabolites terminaux sont retrouvés en concentrations accrues dans les urines notamment la kynurénine ou le quinolinate <sup>515,639,640</sup>. Le maintien d'une concentration tissulaire suffisante de NAD peut être restauré par stimulation de la voie de sauvetage via un apport important oral ou parentéral de NAM (ou dérivés) permettant ainsi de limiter l'altération fonctionnelle induite par différentes formes d'IRA <sup>515,639-641</sup>.

Dans ce travail nous avons étudié, grâce à des analyses métabolomiques urinaires sur une grande cohorte cas-témoin, les concentrations urinaires de plusieurs métabolites de la voie de biosynthèse *de novo* du NAD à partir du tryptophane, à l'image des données préalablement publiées. Dans un second temps, nous avons évalué l'efficacité d'une supplémentation parentérale en NAM, un précurseur alternatif, superposable aux précédents protocoles publiés, sur la prévention de l'IRA induite par IRI chez la souris.

## Tryptophane Dependent NAD Biosynthesis

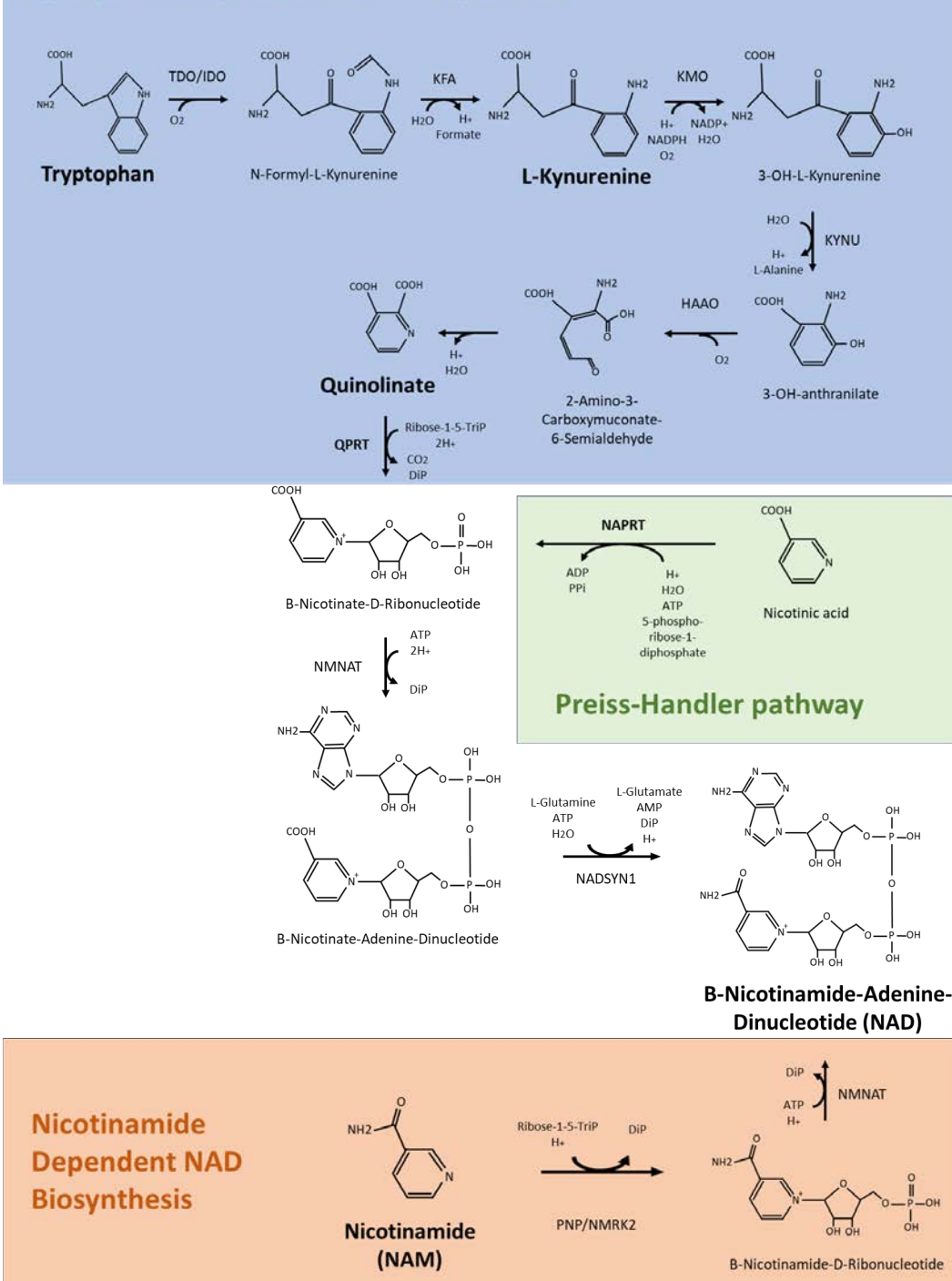


Figure 20 : Vision schématique des voies de biosynthèse du NAD.

(Inspiré de KEGG pathways <sup>642</sup>, Ralto et al. <sup>639</sup> Poyan Mehr et al. <sup>515</sup>)

## 2. Publication :



## ORIGINAL ARTICLE

# The tryptophan pathway and nicotinamide supplementation in ischaemic acute kidney injury

Alexis Piedrafita<sup>1,2,3</sup>, Stéphane Balayssac<sup>4</sup>, Nicolas Mayeur<sup>5</sup>,  
Stéphane Gazut<sup>6</sup>, Julia Grossac<sup>5</sup>, Marie Buleon<sup>1,2</sup>, Melinda Alves<sup>1,2</sup>,  
Julie Klein<sup>1,2</sup>, Vincent Minville<sup>5,7</sup>, Bertrand Marcheix<sup>7,8</sup>, Joost P. Schanstra<sup>1,2,\*</sup>  
and Stanislas Faguer<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR1297, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, France, <sup>2</sup>Université Paul Sabatier–Toulouse 3, Toulouse, France, <sup>3</sup>Département de Néphrologie et Transplantation d'Organes, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France, <sup>4</sup>Groupe de RMN Biomédicale, Laboratoire SPCMB (UMR CNRS 5068), Université Paul Sabatier–Toulouse 3, Toulouse, France, <sup>5</sup>Département d'Anesthésie et Réanimation, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France, <sup>6</sup>CEA, Université Paris-Saclay, Palaiseau, France, <sup>7</sup>RESTORE, UMR 1301 Inserm–5070 CNRS, Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, Toulouse, France and <sup>8</sup>Service de Chirurgie Cardiaque et Vasculaire, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France

\*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Stanislas Faguer; E-mail: stanislas.faguer@inserm.fr

## ABSTRACT

**Background.** Down-regulation of the enzymes involved in tryptophan-derived nicotinamide (NAM) adenine dinucleotide (NAD<sup>P</sup>) production was identified after acute kidney injury (AKI), leading to the hypothesis that supplementation with NAM may increase the kidney NAD<sup>P</sup> content, rescuing tryptophan pathways and subsequently improving kidney outcomes.

**Methods.** Urinary measurement of tryptophan and kynurenin using liquid chromatography–mass spectrometry metabolomics was used in a cohort of 167 cardiac bypass surgery patients along with tests for correlation to the development of postoperative AKI. A mouse model of ischaemic AKI using ischaemia–reperfusion injury (bilateral clamping of renal arteries for 25 min) was also used.

**Results.** We identified a significant decrease in urinary tryptophan and kynurenin in patients developing AKI, irrespective of the Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) stage. Although a significant difference was observed, tryptophan and kynurenin moderately discriminated for the development of all AKI KDIGO stages (area under the curve [AUC] 0.82 [95% confidence interval (CI) 0.75–0.88] and 0.75 [0.68–0.83], respectively) and severe KDIGO Stages 2–3 AKI [AUC 0.71 (95% CI 0.6–0.81) and 0.66 (0.55–0.77), respectively]. Sparked by this confirmation in humans, we aimed to confirm the potential preventive effect of NAM supplementation in wild-type male and female C57BL/6 mice subjected to ischaemic

Received: 16.12.2020; Editorial decision: 11.02.2021

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of ERA-EDTA.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)



AKI. NAM supplementation had no effect on renal function (blood urea nitrogen at Day 1, sinistrin-fluorescein isothiocyanate glomerular filtration rate), architecture (periodic acid–Schiff staining) and injury or inflammation (kidney injury molecule 1 and IL18 messenger RNA expression). In addition, NAM supplementation did not increase post-AKI NAD<sup>+</sup> kidney content.

**Conclusion.** Notwithstanding the potential role of NAM supplementation in the setting of basal NAD<sup>+</sup> deficiency, our findings in mice and the reanalysis of published data do not confirm that NAM supplementation can actually improve renal outcomes after ischaemic AKI in unselected animals and probably patients.

**Keywords:** acute tubular necrosis, AKI, biomarkers, cardiac surgery, ischaemia–reperfusion injury

## INTRODUCTION

Acute kidney injury (AKI) is a frequent and life-threatening condition. Despite extensive *in vitro* and *in vivo* research, translation of candidate drugs that positively affect renal outcomes in humans has failed so far. In recent years, down-regulation of the enzymes involved in tryptophan-derived nicotinamide (NAM) adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) production was identified after AKI, leading to the hypothesis that supplementation with NAM may increase the kidney NAD<sup>+</sup> content, owing to rescue tryptophan pathways, and subsequently improve kidney outcomes [1].

NAD<sup>+</sup>, a cofactor for redox reactions in the cytosol and mitochondria, is required to maintain the energy supply of cells. NAD<sup>+</sup> is also a substrate for sirtuins, enzymes that are pivotal for AKI prevention [2–4]. A recent study showed that mice with heterozygous deletion of quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRT<sup>+/-</sup>) develop NAD<sup>+</sup> deficiency and susceptibility to AKI [5]. Supplementation by NAM increases circulating NAD<sup>+</sup> in mice and humans, prevents AKI in QPRT<sup>+/-</sup> mice by rescuing tryptophan-derived NAD<sup>+</sup> production and may prevent cardiac bypass (CBP) surgery-induced AKI in humans [5]. These results are in line with the hypothesis that reversing disorders of epithelial cell metabolism and mitochondrial dysfunction may improve renal outcomes after ischaemic AKI [6, 7]. Owing to these findings, mainly derived from animal studies, interventional randomized studies in humans are now ongoing in the USA and France to test NAM supplementation after cardiac surgery or renal transplantation (ClinicalTrials.gov NCT04342975 and PHRC 19-0355, respectively). However, conflicting results were recently reported, suggesting that NAM supplementation may not reverse all forms of AKI or CKD [5, 8, 9]. In addition, previous studies showed NAD<sup>+</sup> deficiency after AKI and that NAD<sup>+</sup> increased after NAM supplementation in normal mice, but none demonstrated that NAM supplementation actually increases NAD<sup>+</sup> content after AKI.

In the current work, we aimed to collect further evidence for involvement of the tryptophan pathway in AKI by evaluating the value of urinary tryptophan and/or its derivative, kynurenin, to discriminate between patients who will develop severe AKI following CBP. While we confirm the decrease in urinary tryptophan and kynurenine after CBP in patients developing AKI, albeit with low predictive value, we observed in a mouse model of ischaemic AKI that NAM supplementation does not prevent AKI.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

From March 2016 to January 2017, we collected urine samples from 509 patients who had a CBP. Patients receiving chronic

renal replacement therapy were excluded from the analysis. Consent of the patients to be included in the clinical and biological collection of the University Hospital of Toulouse was obtained (agreement number DC-2008-463).

Among the initial cohort of 509 patients, we studied the clinical characteristics and urinary concentrations of tryptophan and kynurenin in the 32 patients who developed severe Stages 2–3 AKI (*n* = 32), the 70 who developed Stage 1 AKI and the 65 who did not develop AKI (these latter were randomly chosen). Overall, 167 patients were included in this study. The characteristics of the 332 patients with Stage 0 AKI not included in the study can be found in [Supplementary Table S1](#).

### Characteristics

Clinical and biological data were collected before, during and after the cardiac surgery. Baseline glomerular filtration rate (GFR) was estimated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration formula. AKI was staged according to the KDIGO classification established in 2012 ([Supplementary Table S2](#)) [11].

### Urinary tryptophan and kynurenin measurements

Urine samples were collected 24 h after the end of the CBP. Urinary concentrations of tryptophan and kynurenin were measured using targeted metabolome analysis (AbsoluteIDQ p180 assay, Biocrates Life Sciences, Innsbruck, Austria). Urinary samples were frozen and shipped to Biocrates Life Sciences. After thawing, samples were centrifuged at 2000 rpm for 5 min at 4°C, extracted and then analysed by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). Data were normalized on the urinary creatinine concentration. Missing data (below the limit of detection; *n* = 3) were replaced by the mean value of the considered variable divided by 100.

### Animal studies

Male (*n* = 8) and female (*n* = 8) mice (12 weeks old; Janvier Labs, Paris, France) were sedated using isoflurane. Median laparotomy was performed followed by bilateral clamping of the renal arteries for 25 min, according to a previous protocol [5]. NAM or saline vehicle was administered at a dose of 400 mg/kg by intraperitoneal injections. Drugs were given 24 and 1 h prior to the surgery and 4–6 h after the surgery. BUN was measured at Day 2. GFR was measured 1 day before ischaemia–reperfusion and at Day 1, using sinistrin–fluorescein isothiocyanate (FITC) fluorescence measurement [12]. Mice were euthanized at Day 2 following an intraperitoneal pentobarbital injection (180 µg/g). The timing of animal sampling and sacrifice were chosen to reproduce experiments that previously suggested positive effects of NAM supplementation [5]. Animal experiments were approved



Table 1. Characteristics of 167 patients who had cardiac surgery

Parameter	Global (n = 167)	KDIGO 0 (n = 65)	KDIGO 1 (n = 69)	KDIGO 2–3 (n = 33)	P-value 0 versus 1–3	P-value 0–1 versus 2–3
<b>Preoperative characteristics</b>						
Age (years), mean $\pm$ SD	69.59 $\pm$ 9.7	68.28 $\pm$ 10.5	69.6 $\pm$ 9.10	72.2.7	0.241	0.090
Male, n (%)	123 (73.7)	51 (78.5)	52 (75.4)	20 (60.6)	0.453	0.155
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), mean $\pm$ SD	27.17 $\pm$ 4.6	26.96 $\pm$ 3.7	27.17 $\pm$ 5.1	27.57 $\pm$ 5.3	0.629	0.661
Hypertension, n (%)	98 (58.7)	34 (52.3)	43 (62.3)	21 (63.6)	0.333	0.727
Diabetes, n (%)	49 (29.3)	19 (29.2)	19 (27.5)	11 (33.3)	1	0.727
LVEF (%), mean $\pm$ SD	56.56 $\pm$ 11.2	57.27 $\pm$ 12.3	55.65 $\pm$ 10.3	57.2 $\pm$ 7.11	0.594	0.727
Euroscore II, mean $\pm$ SD	3 $\pm$ 3	2.1 $\pm$ 11.9	3.4 $\pm$ 43.6	3.9 $\pm$ 0.93	0.005	0.091
Haemoglobin (g/dL), mean $\pm$ SD	13.13 $\pm$ 1.9	13.73 $\pm$ 1.9	13.13 $\pm$ 1.9	12.12 $\pm$ 1.6	0.008	0.001
Creatininaemia ( $\mu$ mol/L), mean $\pm$ SD	108.508 $\pm$ 57.9	93.83 $\pm$ 20.8	102.102 $\pm$ 46.8	150.650 $\pm$ 97.7	0.008	0.013
eGFR (CKD-EPI, mL/min/1.73 m <sup>2</sup> ), mean $\pm$ SD	65.15 $\pm$ 21.9	70.40 $\pm$ 17.5	67.77 $\pm$ 21.1	48.98 $\pm$ 24.1	0.017	<0.001
eGFR (CKD-EPI), <60 mL/min/1.73 m <sup>2</sup> , n (%)	41 (24.6)	20 (30.8)	21 (30.4)	23 (69.7)	0.241	<0.001
Kidney graft recipients, n (%)	5 (3)	0 (0)	2 (2.9)	3 (9.1)	0.241	0.095
<b>Peroperative characteristics</b>						
Surgery, n (%)						
CAB	61 (36.5)	28 (43.1)	22 (31.9)	11 (33.3)		
Valvular	53 (31.7)	19 (29.2)	20 (29)	14 (42.4)		
Combined	31 (18.6)	13 (20)	14 (20.3)	4 (12.1)	0.494	0.527
Thoracic aorta	20 (12)	5 (7.7)	12 (17.4)	3 (9.1)		
Left ventricle	2 (1.2)	0 (0)	1 (1.4)	1 (3)		
Catecholamines, n (%)	153 (91.6)	59 (90.8)	65 (94.2)	29 (87.9)	1	0.625
RBC (yes), n (%)	40 (24)	11 (16.9)	14 (20.3)	15 (45.5)	0.232	0.008
Number of packed RBCs, mean $\pm$ SD	0.6 $\pm$ 61.1	0.4 $\pm$ 40.9	0.5 $\pm$ 51.1	1.1 $\pm$ 11.3	0.110	0.037
<b>Postoperative characteristics</b>						
Volume expansion (mL/24 h), mean $\pm$ SD	1095.809 $\pm$ 680.9	961.561 $\pm$ 554.2	1155.815 $\pm$ 669.9	1234.823 $\pm$ 879.3	0.075	0.456
Catecholamines, n (%)	104 (62.3)	34 (52.3)	48 (69.6)	22 (66.7)	0.110	0.727
Sepsis, n (%)	39 (23.4)	7 (10.8)	22 (31.9)	10 (30.3)	0.013	0.570
Iodinated contrast agents, n (%)	15 (9)	4 (6.2)	7 (10.1)	4 (12.1)	0.545	0.625
RBCs (yes), n (%)	70 (41.9)	19 (29.2)	27 (39.1)	24 (72.7)	0.232	0.001
Number of packed RBCs, mean $\pm$ SD	1.44 $\pm$ 2.6	0.77 $\pm$ 1.2	1.22 $\pm$ 1.7	3.22 $\pm$ 4.5	0.006	0.018
<b>Outcomes</b>						
AKI KDIGO stage, n (%)						
0	65 (38.9)	65 (100)	0 (0)	0 (0)		
1	69 (41.3)	0 (0)	69 (100)	0 (0)	<0.001	<0.001
2	19 (11.4)	0 (0)	0 (0)	19 (57.6)		
3	14 (8.4)	0 (0)	0 (0)	14 (42.4)		
Diuresis 24 h (mL), mean $\pm$ SD	1133.813 $\pm$ 362.4	1309.530 $\pm$ 303.6	1137.413 $\pm$ 289.7	78080 $\pm$ 356.1	<0.001	<0.001
Death, n (%)	12 (7.2)	0 (0)	2 (2.9)	10 (30.3)	0.013	<0.001

Comparisons were made between patients who developed AKI (KDIGO Stages 1–3) or not (KDIGO Stage 0) and between patients who developed no or mild AKI (KDIGO Stages 0–1) or severe AKI (KDIGO Stages 2–3).

BMI, body mass index (kg/m<sup>2</sup>); LVEF, left ventricle ejection fraction (%); CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration.

by the local and national ethical committees (CREFRE Inserm/UPS, agreement C31 55507; protocol APAFIS#122-2015-23).

### Kidney pathology

Samples of the left kidney were collected and stored in liquid nitrogen or embedded in paraffin. Expression of the Kim-1 and IL18 genes was assessed by quantitative polymerase chain reaction (StepOnePlus System with SYBR Eurogentec MESABlue, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) of the messenger RNA (mRNA) extracted using the RNA Easy Minikit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). *Hprt* gene expression was used to normalize gene quantification. Four micrometre kidney slices were stained with periodic acid-Schiff and the injury score was

calculated. The kidney injury score was based on the extent of tubular dilatation, epithelial cell flattening or release from the basement membrane and casts within the tubular lumen. Lesions were ranked from 0 to 4 by three blinded observers.

### Kidney NAD measurement

NAD kidney content was measured with the NAD/NADH quantification kit (MAK037; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). A kidney sample (20–30 mg) was homogenized in NAD<sup>+</sup>/NADH extraction buffer and then centrifuged. Supernatant was diluted (1:2) and the assay was performed according to the manufacturer's instructions.



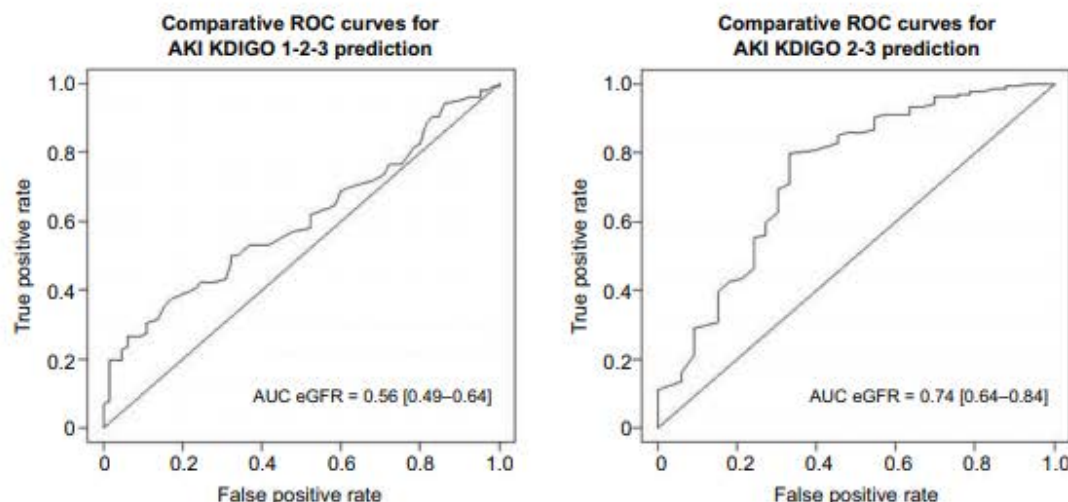


FIGURE 1: Ability of preoperative eGFR to predict the development of (A) AKI (all stages) and (B) severe AKI (KDIGO Stages 2–3) after cardiac surgery. Results are expressed as the AUROC and its 95% confidence interval.

### Statistical analyses

Continuous data are represented as mean and standard deviation (SD) and compared with the Wilcoxon test, Aspin–Welch test, Student's test, analysis of variance (followed by the Tukey post hoc test) or Kruskal–Wallis test (followed by a post hoc pairwise Wilcoxon test), as appropriate. Discontinuous data are represented as number and percentage and compared with the chi-squared or Fischer's exact test. P-values were adjusted using false discovery correction (Benjamini–Hochberg correction). An adjusted P-value <0.05 was considered significant. The ability of estimated GFR (eGFR) and urinary metabolites to predict the development of AKI and severe AKI was assessed by calculating the area under the receiver operating characteristics curve (AUROC) and 95% confidence interval (DeLong method). Statistical analyses were performed with R version 3.6.1 (additional packages readxl, stringr, ROCR and pROC; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and Prism 8 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## RESULTS

### Clinical characteristics

In this study we included 167 patients (mean age 69.5 years) who had CBP. Clinical data are shown in Table 1 and Supplementary Table S1. A total of 102 patients developed AKI, including 33 (19.8%) with severe Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Stage 2 or 3 AKI. AKI was diagnosed [maximal serum creatinine (SCr)] at Days 1–6 in 8 (7.8%), 59 (57.8%), 15 (14.7%), 4 (3.9%), 2 (2%) and 14 (13.7%) patients, respectively. Twelve patients died during hospitalization. Mortality was significantly higher in patients who developed AKI [12/102 (11.8%) versus 0/65 (0%);  $P=0.004$ ] and particularly in patients who developed severe Stages 2–3 AKI [10/33 (30.3%) versus 2/134 (1.5%);  $P<0.001$ ].

Univariate analysis showed that baseline estimated glomerular filtration rate (eGFR) and red blood cells (RBCs) transfusion during and after CBP were significantly associated with the risk of developing severe AKI. The AUROC of baseline eGFR (quantitative assessment) was 0.56 [95% confidence interval (CI) 0.49–0.64] for all AKI stages and 0.74 (95% CI 0.64–0.84) for severe AKI prediction (Figure 1).

### Urinary tryptophan after cardiac surgery

In an attempt to confirm at a larger scale the renal changes of the tryptophan pathway in humans developing AKI after CBP, we measured the urinary concentration of tryptophan and kynurenin (a tryptophan derivative) in this cohort of 167 patients using targeted metabolome analysis (AbsoluteIDQ p180 kit, Biocrates Life Sciences, Innsbruck, Austria).

We observed that 24 h post-CBP both urinary tryptophan and kynurenin were significantly reduced in patients developing all AKI stages (Figure 2A). This was confirmed in patients who developed severe AKI (Figure 2B). However, the associated AUROC values showed poor discrimination for the development of AKI and severe AKI (AUROCs <0.75) (Figure 2C and D). Urinary quinolinate could not be assessed because it was not included in the AbsoluteIDQ p180 assay.

Urinary tryptophan and kynurenin were also significantly decreased in patients who died during hospitalization (Supplementary Figure S1).

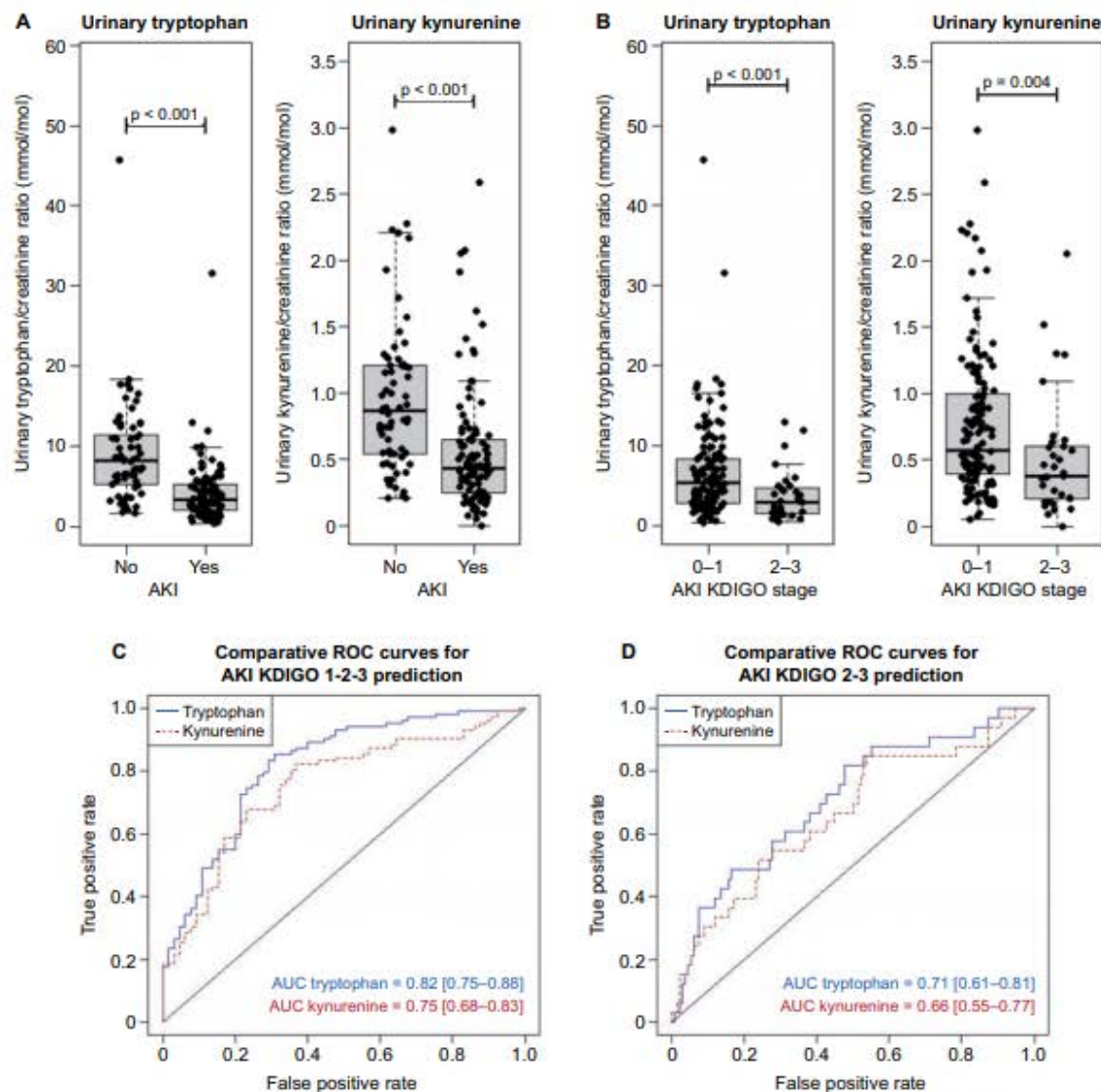
### NAM supplementation does not prevent ischaemic AKI in mice

Sparked by this confirmation in humans, we studied the potential preventive effect of NAM supplementation in wild-type (wt) male C57BL/6 mice ( $n=8$ ) subjected to ischaemic AKI (bilateral clamping of renal arteries for 25 min [ischaemia–reperfusion injury (IRI)]). NAM supplementation did not improve sinistrin-FITC clearance-based reduction in GFR 36 h after IRI (Figure 3A). Blood urea nitrogen (BUN) levels, assessed 48 h after IRI, were also not modified (Figure 3B). NAM treatment was without effect on renal architecture 2 days after IRI (Figure 3C). Finally, expression of kidney injury molecule-1 (Kim-1) mRNA, a prominent AKI marker, was even higher in kidneys of NAM-treated mice at Day 2 ( $P=0.05$ ) (Figure 3D).

Because female gender is associated with less severe AKI following ischaemic AKI, the experiments were reproduced in wt female mice ( $n=8$ ) to address whether NAM can prevent milder forms of AKI. Again, no improvement in AKI with NAM treatment was observed (Figure 3A–D).

At Day 2, the NAD<sup>+</sup> content within whole kidney (cortex and medulla) of male and female mice that received NAM





**FIGURE 2:** Urinary levels of tryptophan and kynurenin 24 h after cardiac surgery according to the AKI stage (KDIGO classification) (A,B). Ability of urinary tryptophan and kynurenin:creatinine ratio to identify patients who will develop all stages of AKI and severe AKI (KDIGO Stages 2–3). Results are expressed as the AUROC and its 95% confidence interval.

supplement was similar to that in mice that received vehicle (Figure 3E).

## DISCUSSION

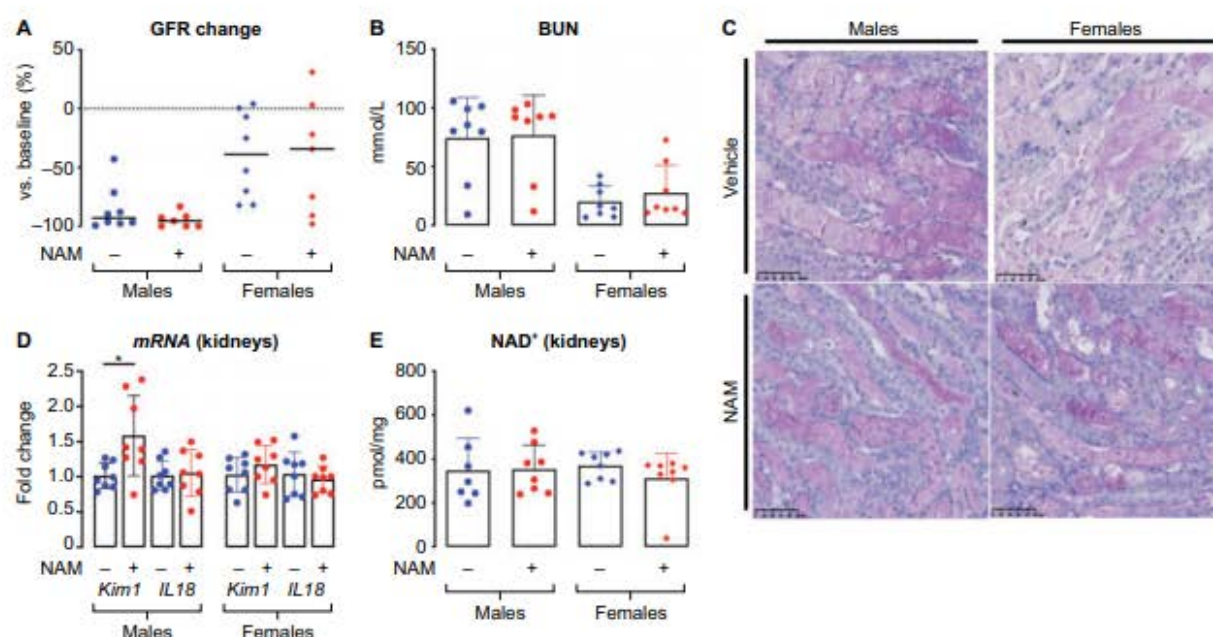
Our findings confirmed, in a large cohort of 167 patients, the initial observation of Poyan Mehr et al. [5] in six patients, that urinary tryptophan is reduced in patients who develop CBP-induced AKI, although urinary quinolinate could not be addressed in our cohort because it was not included in the metabolomic assay we used (Biocrates Life Sciences). However, since a strong overlap of urinary tryptophan abundance was observed between groups, tryptophan alone does not appear to be a good marker for the routine detection of early severe AKI.

In contrast to previous studies [5, 6], our results in the IRI mouse model showed that NAM supplementation did not improve AKI outcome. There are a number of differences between our study and these previous studies, despite a similar protocol

for NAM supplementation. The Poyan Mehr et al. [5] study used SCr to assess renal function, while we used BUN and measured GFR by sinistrin-FITC clearance. The use of SCr as surrogate for GFR in mice has been discouraged [10] and it is therefore unclear whether the small differences in the SCr are due to NAM supplementation or other external variables. Hence, depending on the experiments [5, 6], SCr after IRI varied between 0.4 and 1.7 mg/dL and overlapped with SCr in sham mice (0.05–0.7 mg/dL). This overlap does not allow us to adequately assess AKI at the individual level and should prompt, at least, determination of SCr levels before and after IRI at the individual level, or, better yet, to measure GFR before and after experiments, as performed in our study.

The way AKI is assessed in humans in the Poyan Mehr et al. [5] study may also be a serious pitfall. Indeed, data suggested that NAM supplementation prevented CBP-induced AKI, but most patients had no AKI or Stage 1 AKI (mean SCr increase was <0.25 mg/dL) and kidney improvement relied on a comparison of three postoperative SCr-derived AUROCs instead of the





**FIGURE 3:** Renal outcomes following bilateral kidney IRI after NAM supplementation. (A) Changes of GFR (sinistrin-FITC measurement before and 48 h after bilateral IRI;  $n = 8$  per group). (B) Post-ischaemic (24 h) BUN levels in male and female mice ( $n = 8$  per group). (C) Kidney pathology of male and female mice after bilateral IRI and vehicle or NAM supplementation. (D) mRNA kidney expression of Kim-1 and IL18 genes 48 h after IRI ( $P < 0.05$ ;  $n = 8$  per group). (E) NAD<sup>+</sup> kidney content at Day 2 after bilateral kidney IRI.

recommended use of the KDIGO classification. If the latter had been used, the incidence of AKI would not have differed significantly between groups. Moreover, the very small and non-clinically significant difference of SCr between treated and non-treated patients was only observed at Day 1, but NAM supplementation was associated with a decrease of SCr even before the kidney injury (i.e. before the CBP) [5], suggesting interference of NAM in SCr measurements or tubular secretion, challenging the interpretation of SCr curves in humans receiving NAM, and probably in mice.

Furthermore, whereas it was suggested that NAM supplementation can improve renal prognosis after AKI [1, 5, 8], previous data from one of these laboratories showed no improvement of kidney function by NAM supplementation in wt mice submitted to IRI (Figure 1i from references 5, 6), but only effects of NAM supplementation in mice with *Ppargc1a* or *Qprt* deficiency [5, 6]. We clearly confirmed this in our experiments. Whereas we used the same protocol for NAM supplementation, we did not observe improvement of kidney function in male and female wt mice receiving NAM by using measured, not estimated, GFR and BUN. The difference in how kidney NAD<sup>+</sup> deficiency was rescued may also be the origin of these discrepancies: NAM was given via intraperitoneal injection for 1 day before IRI in our study, similar to what is described by Poyan Mehr et al. [5], whereas oral administration of NAM riboside was performed by Faivre et al. [8]. In the latter study, NAM riboside, a NAM derivative, was started 10 days before bilateral kidney IRI. The employed methodology of the experiments was similar otherwise. Thus further studies may have to better define the optimal regimen to actually rescue NAD<sup>+</sup> deficiency in animal studies and in humans in order to adequately assess efficiency.

Finally, in previous studies the NAD<sup>+</sup> kidney content after NAM supplementation was only assessed at a basal state, but never after AKI. In our experiments, NAD<sup>+</sup> kidney content 2 days after IRI was similar in mice that received or did not

receive NAM supplementation, suggesting that NAM supplementation may actually fail to reverse NAD<sup>+</sup> deficiency in the setting of AKI, at least in wt mice.

## CONCLUSION

Notwithstanding the potential role of NAM supplementation in the setting of basal NAD<sup>+</sup> deficiency, our findings in mice and the reanalysis of published data did not confirm that NAM supplementation can actually improve renal outcomes after ischaemic AKI in unselected animals and probably patients. This emphasizes the need to use validated AKI criteria as endpoints in pre-clinical animal models as well as in preliminary studies in humans. This may help to increase the probability of success of interventional placebo-controlled trials in humans.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at ckj online.

## FUNDING

This work was partly funded by a European grant from the European Renal Association PerMed initiative (KIDNEY ATTACK ANR-18-PERM-0003) and the 'Fondation pour la Recherche Médicale' (grant DEQ20170336759). A.P. was supported by a research grant from Toulouse University.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None declared.

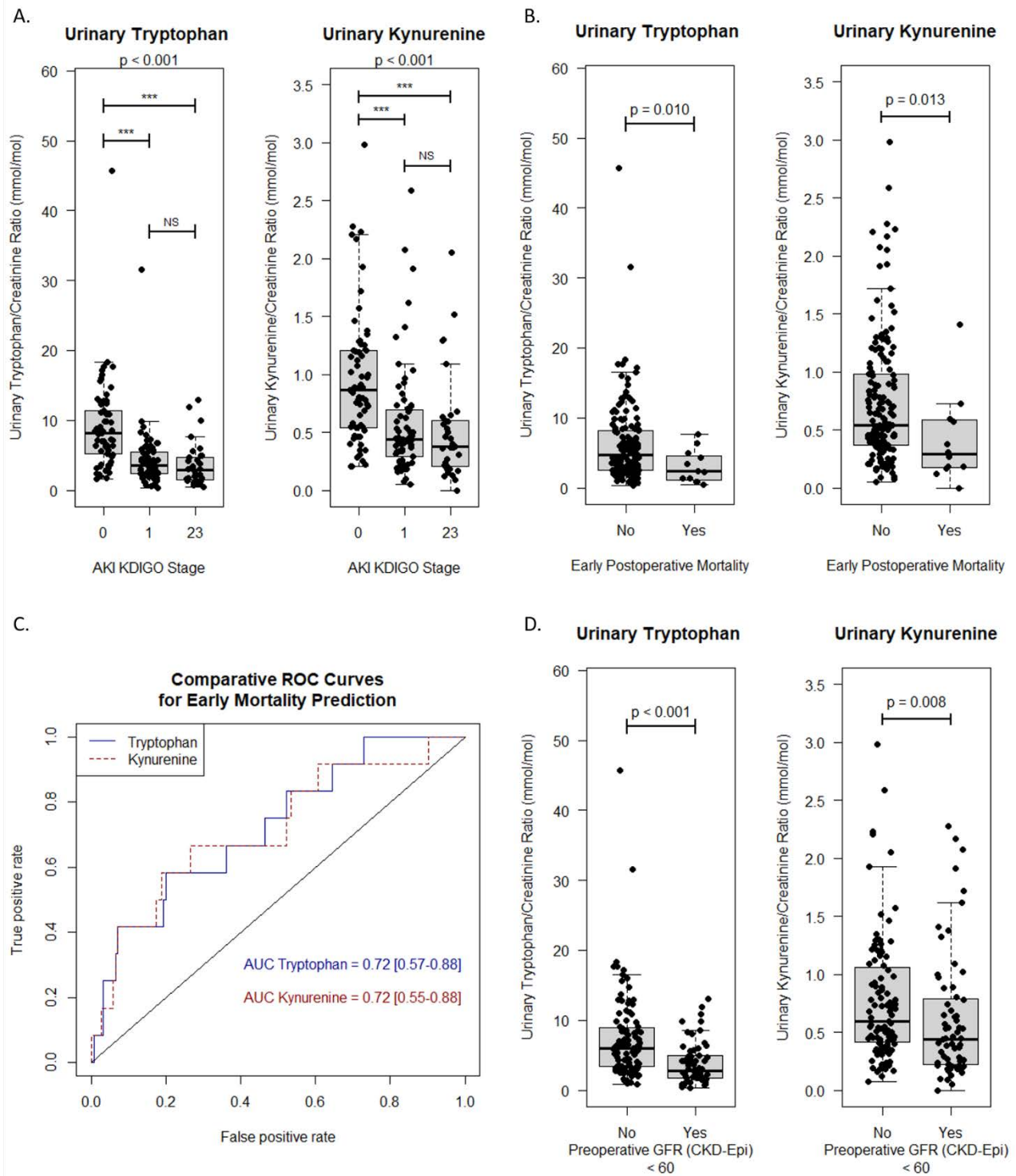
## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data are available upon request to the corresponding author.



## REFERENCES

1. Ralto KM, Rhee EP, Parikh SM. NAD<sup>+</sup> homeostasis in renal health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2020; 16: 99–111
2. Chiba T, Peasley KD, Cargill KR et al. Sirtuin 5 regulates proximal tubule fatty acid oxidation to protect against AKI. *J Am Soc Nephrol* 2019; 30: 2384–2398
3. Morigi M, Perico L, Rota C et al. Sirtuin 3-dependent mitochondrial dynamic improvements protect against acute kidney injury. *J Clin Invest* 2015; 125: 715–726
4. Guan Y, Wang SR, Huang XZ et al. Nicotinamide mononucleotide, an NAD<sup>+</sup> precursor, rescues age-associated susceptibility to AKI in a sirtuin 1-dependent manner. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28: 2337–2352
5. Poyan Mehr A, Tran MT, Ralto KM et al. De novo NAD<sup>+</sup> biosynthetic impairment in acute kidney injury in humans. *Nat Med* 2018; 24: 1351–1359
6. Tran MT, Zsengeller ZK, Berg AH et al. PGC1 $\alpha$  drives NAD biosynthesis linking oxidative metabolism to renal protection. *Nature* 2016; 531: 528–532
7. Emma F, Montini G, Parikh SM et al. Mitochondrial dysfunction in inherited renal disease and acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12: 267–280
8. Faivre A, Katsyuba E, Verissimo T et al. Differential role of nicotinamide adenine dinucleotide deficiency in acute and chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2021; 36: 60–68
9. Zheng M, Cai J, Liu Z et al. Nicotinamide reduces renal interstitial fibrosis by suppressing tubular injury and inflammation. *J Cell Mol Med* 2019; 23: 3995–4004
10. Eisner C, Faulhaber-Walter R, Wang Y et al. Major contribution of tubular secretion to creatinine clearance in mice. *Kidney Int* 2010; 77: 519–526
11. Kellum JA, Lameire N, KDIGO AKI Guideline Work Group. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (part 1). *Crit Care* 2013; 17: 204
12. Schreiber A, Shulhevich Y, Geraci S et al. Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303: F783–F788



**Supplementary Figure 1: Urinary concentrations of Tryptophan, kynurenine and creatinine ( $\mu\text{M}$ )**

Parameter	Global (n = 387)	Not selected (n = 322)	Selected (n = 65)	p- value	Adj-p- value
<b>Preoperative Characteristics</b>					
Age (years), Mean $\pm$ Sd	66.7 $\pm$ 11.9	66.4 $\pm$ 12.2	68.2 $\pm$ 10.5	0.277	0.796
Male, n (%)	293 (75.7)	242 (75.2)	51 (78.5)	0.682	0.982
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), Mean $\pm$ Sd	26.8 $\pm$ 4.2	26.8 $\pm$ 4.3	26.9 $\pm$ 3.7	0.829	1
Hypertension, n (%)	193 (49.9)	159 (49.4)	34 (52.3)	0.768	0.982
Diabetes, n (%)	93 (24)	74 (23)	19 (29.2)	0.359	0.827
LVEF (%), Mean $\pm$ Sd	55.9 $\pm$ 11.4	55.7 $\pm$ 11.2	57.2 $\pm$ 12.3	0.319	0.816
Euroscore II, Mean $\pm$ Sd	2.1 $\pm$ 2.2	2.1 $\pm$ 2.3	2.1 $\pm$ 1.9	0.953	1
Creatininemia ( $\mu$ mol/L), Mean $\pm$ Sd	92.5 $\pm$ 25.1	92.2 $\pm$ 25.9	93.8 $\pm$ 20.8	0.574	0.982
eGFR (CKD-Epi, mL/min/1.73m <sup>2</sup> ), Mean $\pm$ Sd	72.9 $\pm$ 18.3	73.4 $\pm$ 18.4	70.4 $\pm$ 17.5	0.232	0.796
eGFR (CKD-Epi), < 60 mL/min/1.73m <sup>2</sup> , n (%)	87 (22.5)	67 (20.8)	20 (30.8)	0.111	0.796
Kidney Graft Recipients, n (%)	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0)	1	1
<b>Per-operative Characteristics</b>					
Surgery					
CAB, n (%)	155 (40.1)	127 (39.4)	28 (43.1)		
Valvular, n (%)	135 (34.9)	116 (36)	19 (29.2)		
Combined, n (%)	49 (12.7)	36 (11.2)	13 (20)	0.233	0.796
Thoracic Aorta, n (%)	41 (10.6)	36 (11.2)	5 (7.7)		
Left Ventricle, n (%)	7 (1.8)	7 (2.2)	0 (0)		
Catecholamines, n (%)	343 (88.6)	284 (88.2)	59 (90.8)	0.703	0.982
RBC Yes/No, n (%)	56 (14.5)	45 (14)	11 (16.9)	0.672	0.982
Number of packed RBC, Mean $\pm$ Sd	0.3 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.9	0.613	0.982
<b>Post-operative Characteristics</b>					
Volume Expansion (mL/24h), Mean $\pm$ Sd	920.5 $\pm$ 578.1	912.3 $\pm$ 583.3	961.5 $\pm$ 554.2	0.531	0.982
Catecholamines, n (%)	193 (49.9)	159 (49.4)	34 (52.3)	0.768	0.982
Sepsis, n (%)	43 (11.1)	36 (11.2)	7 (10.8)	1	1
Iodinated Contrast Agents, n (%)	11 (2.8)	7 (2.2)	4 (6.2)	0.095	0.796
RBC Yes/No, n (%)	90 (23.3)	71 (22)	19 (29.2)	0.276	0.796
Number of packed RBC, Mean $\pm$ Sd	0.5 $\pm$ 1.1	0.5 $\pm$ 1.1	0.7 $\pm$ 1.2	0.133	0.796
<b>Outcomes</b>					
Diuresis 24h (mL), Mean $\pm$ Sd	1263.5 $\pm$ 290.6	1254.2 $\pm$ 287.5	1309.5 $\pm$ 303.6	0.162	0.796
Death, n (%)	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0)	1	1

**Supplementary Table 1: Characteristics of patients with KDIGO stage 0 AKI selected (n=65) or not (n=322) in the metabolic analysis.** CAB, coronary artery bypass; BMI, Body Mass Index (kg/m<sup>2</sup>); LVEF, left ventricle ejection fraction (%); RBC, red blood cells; eGFR, estimated glomerular filtration rate; BMI, body mass index; Sd, standard deviation

AKI KDIGO stage	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
All	8 (7.8)	59 (57.8)	15 (14.7)	4 (3.9)	2 (2.0)	14 (13.7)
1	4 (5.8)	47 (68.1)	9 (13.0)	2 (2.9)	1 (1.4)	6 (8.7)
2	2 (10.5)	7 (36.8)	5 (26.3)	2 (10.5)	0 (0)	3 (15.8)
3	2 (14.3)	5 (35.7)	1 (7.1)	0 (0)	1 (7.1)	5 (35.7)

**Supplementary Table 2: Daily number of patients who reached criteria of acute kidney injury (AKI) following cardiac surgery (n, %).**

Stage	Serum Creatinine	Urine Output	RRT
0	SCr < 1.5 times baseline And SCr increase < 26.5 µM (0.3 mg/dL)	≥ 0.5 mL/kg/h	No
1	SCr 1.5-1.9 times baseline or SCr increase ≥ 26.5µM (0.3 mg/dL)	< 0.5 mL/kg/h for at least 6 hours	No
2	SCr 2-2.9 times baseline	< 0.5 mL/kg/h for at least 12 hours	No
3	SCr 3 times baseline or SCr increase ≥ 353.6 µmol/L (4 mg/dL) or eGFR < 35 mL/min per 1.73 m <sup>2</sup> and < 18 year-old.	< 0.3 mL/kg/h for at least 24 hours Or Anuria for at least 12 hours	Yes

**Supplementary Table 3: Criteria for staging of acute kidney injury, according to the 2012 KDIGO classification.** SCr, serum creatinine; eGFR, estimated glomerular filtration rate; RRT, renal replacement therapy.

Species	Sample	KDIGO stage	Analyte Name	Tryptophan	Creatinine	Kynurenine
Human	Urine	2	L1 - 1	168	14158	15
Human	Urine	1	L1 - 2	8.8	3675	2.4
Human	Urine	1	L1 - 3	35	10815	6.4
Human	Urine	0	L1 - 4	788	17227	38
Human	Urine	1	L1 - 5	5.2	8162	0.78
Human	Urine	3	L1 - 6	7.7	10699	2.6
Human	Urine	0	L1 - 7	101	17650	16
Human	Urine	1	L1 - 8	51	12339	20
Human	Urine	1	L1 - 9	105	16860	22
Human	Urine	1	L1 - 10	20	17627	3.4
Human	Urine	0	L1 - 11	322	20554	40
Human	Urine	0	L1 - 12	138	10588	15
Human	Urine	1	L1 - 13	3.8	10579	0.50
Human	Urine	2	L1 - 14	7.9	3332	0.61
Human	Urine	2	L1 - 15	18	8070	3.1
Human	Urine	1	L1 - 16	46	7212	10
Human	Urine	0	L1 - 17	26	10531	4.2
Human	Urine	3	L1 - 18	73	9547	5.7
Human	Urine	1	L1 - 19	1.3	1937	0.35
Human	Urine	0	L1 - 20	108	12686	11
Human	Urine	0	L1 - 21	69	9810	6.4
Human	Urine	1	L1 - 22	111	15559	6.9
Human	Urine	0	L1 - 23	111	17613	9.9
Human	Urine	0	L1 - 24	134	10493	14
Human	Urine	2	L1 - 25	21	14528	6.5
Human	Urine	0	L1 - 26	93	9536	11
Human	Urine	1	L1 - 27	18	8510	3.5
Human	Urine	1	L1 - 28	8.0	6433	1.9
Human	Urine	1	L1 - 29	14	7075	3.0
Human	Urine	1	L1 - 30	54	15226	10
Human	Urine	1	L1 - 31	17	4368	1.7
Human	Urine	3	L1 - 32	91	18342	10
Human	Urine	0	L1 - 33	76	13463	12
Human	Urine	1	L1 - 34	78	13523	6.8
Human	Urine	1	L1 - 35	94	15587	7.4
Human	Urine	1	L1 - 36	69	15978	7.3
Human	Urine	0	L1 - 37	68	12877	5.9
Human	Urine	0	L1 - 38	52	15158	3.4
Human	Urine	3	L1 - 39	45	11413	5.7
Human	Urine	2	L1 - 40	22	6633	8.6
Human	Urine	0	L1 - 41	65	9866	12
Human	Urine	0	L1 - 42	95	11131	25
Human	Urine	2	L1 - 43	13	11167	1.0
Human	Urine	0	L1 - 44	65	10376	5.6
Human	Urine	1	L1 - 45	25	9834	2.5
Human	Urine	0	L1 - 46	314	17079	21
Human	Urine	0	L1 - 47	63	12876	10
Human	Urine	0	L1 - 48	66	7912	8.1
Human	Urine	1	L1 - 49	326	10332	27
Human	Urine	0	L1 - 50	98	19312	9.9
Human	Urine	1	L1 - 51	48	18737	3.2
Human	Urine	1	L1 - 52	37	13285	4.7
Human	Urine	0	L1 - 53	139	19705	9.2
Human	Urine	0	L1 - 54	99	11754	4.0
Human	Urine	1	L1 - 55	58	14869	6.7
Human	Urine	0	L1 - 56	19	5347	2.4
Human	Urine	0	L1 - 57	153	12360	14
Human	Urine	0	L1 - 58	124	10060	8.7
Human	Urine	1	L1 - 59	17	7199	2.9
Human	Urine	1	L1 - 60	64	14611	12
Human	Urine	1	L1 - 61	19	13874	2.5
Human	Urine	1	L1 - 62	20	10122	2.3
Human	Urine	0	L1 - 63	109	12940	17
Human	Urine	0	L1 - 64	150	10981	13
Human	Urine	1	L1 - 65	21	10152	2.5
Human	Urine	2	L1 - 66	14	8344	1.3
Human	Urine	1	L1 - 67	8.2	8664	1.4
Human	Urine	0	L1 - 68	46	14379	7.9
Human	Urine	3	L1 - 69	35	11356	5.2

Human	Urine	0	L1 - 70	35	14478	6.6
Human	Urine	3	L1 - 71	2.8	6285	< LOD
Human	Urine	1	L1 - 72	47	10976	4.9
Human	Urine	1	L1 - 73	51	11166	21
Human	Urine	2	L1 - 74	22	12570	4.5
Human	Urine	0	L1 - 75	148	8386	12
Human	Urine	2	L1 - 76	49	10413	6.6
Human	Urine	0	L1 - 77	133	13455	29
Human	Urine	0	L1 - 78	208	12565	14
Human	Urine	0	L1 - 79	59	14672	5.0
Human	Urine	1	L1 - 80	88	13728	10
Human	Urine	0	L1 - 81	37	11446	7.9
Human	Urine	0	L2 - 1	191	19534	15
Human	Urine	2	L2 - 2	5.0	5858	1.00
Human	Urine	1	L2 - 3	18	10073	2.6
Human	Urine	0	L2 - 4	137	15060	14
Human	Urine	0	L2 - 5	34	4289	4.3
Human	Urine	1	L2 - 6	52	14810	5.0
Human	Urine	1	L2 - 7	20	11251	4.3
Human	Urine	0	L2 - 8	93	14267	32
Human	Urine	1	L2 - 9	128	13015	27
Human	Urine	1	L2 - 10	165	18300	8.3
Human	Urine	1	L2 - 11	104	19411	9.9
Human	Urine	0	L2 - 12	42	5880	7.4
Human	Urine	1	L2 - 13	107	14761	7.9
Human	Urine	0	L2 - 14	6.0	2639	2.0
Human	Urine	1	L2 - 15	23	9541	3.0
Human	Urine	1	L2 - 16	35	10644	9.9
Human	Urine	0	L2 - 17	205	13984	8.1
Human	Urine	0	L2 - 18	169	15547	15
Human	Urine	1	L2 - 19	7.4	9444	1.5
Human	Urine	1	L2 - 20	18	5139	3.7
Human	Urine	0	L2 - 21	145	8238	25
Human	Urine	0	L2 - 22	222	26519	30
Human	Urine	1	L2 - 23	72	16193	11
Human	Urine	3	L2 - 24	25	5840	1.6
Human	Urine	0	L2 - 25	146	17969	21
Human	Urine	2	L2 - 26	92	9235	6.3
Human	Urine	3	L2 - 27	71	11806	4.7
Human	Urine	1	L2 - 28	110	19974	4.3
Human	Urine	1	L2 - 29	12	4897	5.3
Human	Urine	0	L2 - 30	107	9715	9.5
Human	Urine	1	L2 - 31	64	13547	13
Human	Urine	0	L2 - 32	15	7478	4.0
Human	Urine	1	L2 - 33	6.5	3377	1.8
Human	Urine	3	L2 - 34	28	9641	2.1
Human	Urine	0	L2 - 35	191	14937	12
Human	Urine	0	L2 - 36	36	5726	1.8
Human	Urine	1	L2 - 37	64	10484	9.4
Human	Urine	0	L2 - 38	170	15581	8.5
Human	Urine	1	L2 - 39	93	11604	12
Human	Urine	0	L2 - 40	42	11370	2.9
Human	Urine	3	L2 - 41	50	10099	6.1
Human	Urine	1	L2 - 42	4.7	3017	1.3
Human	Urine	0	L2 - 43	120	13722	17
Human	Urine	3	L2 - 44	5.3	4632	3.0
Human	Urine	1	L2 - 45	3.7	2135	0.47
Human	Urine	1	L2 - 46	29	9613	7.1
Human	Urine	1	L2 - 47	42	16559	3.1
Human	Urine	0	L2 - 48	88	7970	10
Human	Urine	2	L2 - 49	20	6525	1.3
Human	Urine	1	L2 - 50	77	14228	5.9
Human	Urine	3	L2 - 51	11	5565	2.0
Human	Urine	2	L2 - 52	73	12814	26
Human	Urine	1	L2 - 53	43	14764	1.1
Human	Urine	0	L2 - 54	26	9628	3.8
Human	Urine	0	L2 - 55	69	9879	12
Human	Urine	1	L2 - 56	39	14114	4.8
Human	Urine	1	L2 - 57	75	9021	6.2
Human	Urine	0	L2 - 58	18	10355	2.9

Human	Urine	0	L2 - 59	10	6501	1.3
Human	Urine	1	L2 - 60	121	18098	7.9
Human	Urine	1	L2 - 61	7.5	2402	1.5
Human	Urine	2	L2 - 62	9.1	6931	1.3
Human	Urine	2	L2 - 63	187	14540	22
Human	Urine	0	L2 - 64	300	17422	13
Human	Urine	0	L2 - 65	145	9055	14
Human	Urine	1	L2 - 66	78	15202	3.7
Human	Urine	2	L2 - 67	8.8	6382	0.79
Human	Urine	0	L2 - 68	231	20223	16
Human	Urine	0	L2 - 69	149	11530	9.7
Human	Urine	1	L2 - 70	51	11485	5.7
Human	Urine	1	L2 - 71	48	11508	3.8
Human	Urine	3	L2 - 72	42	11097	14
Human	Urine	1	L2 - 73	68	10043	5.3
Human	Urine	1	L2 - 74	44	10371	8.1
Human	Urine	1	L2 - 75	56	9435	3.5
Human	Urine	2	L2 - 76	27	13036	1.7
Human	Urine	1	L2 - 77	51	13381	5.3
Human	Urine	1	L2 - 78	30	10728	4.6
Human	Urine	1	L2 - 79	24	9331	4.1
Human	Urine	0	L2 - 80	88	13873	10
Human	Urine	2	L2 - 81	49	11654	4.3
Human	Urine	0	L3 - 1	81	22274	4.6
Human	Urine	2	L3 - 2	7.8	4478	2.4
Human	Urine	0	L3 - 3	113	18749	32
Human	Urine	0	L3 - 4	63	8731	6.5
Human	Urine	3	L3 - 5	5.6	7151	2.2

**Supplementary Table 4: Urinary concentrations of Tryptophan, kynurenin and creatinine (μM)**



N°	Gender	Treatment	Score
1	F	NAM	3.5
2	F	NAM	4
3	F	NAM	3
4	F	NAM	2.5
5	F	NaCl	3.5
6	F	NaCl	2
7	F	NaCl	4
8	F	NaCl	2
9	M	NAM	4
10	M	NAM	4
11	M	NAM	4
12	M	NAM	4
13	M	NaCl	1.5
14	M	NaCl	4
15	M	NaCl	4
16	M	NaCl	4

**Supplementary Table 5: Injury score (mean of 3 blinded scoring).** NAM, nicotinamide; F, female; M, male; NaCl, sodium chloride.

### **Supplementary File 1: Definitions of clinical and biological criteria.**

- Body Mass Index was calculated with the preoperative weight and size (  $BMI = \text{Weight (kg)} / [\text{Size (m)}]^2$ ).
- Hypertension referred to patients with a past medical history of clinical hypertension according to current guidelines (ESH/ERC Guidelines), with or without antihypertensive treatment.
- Patients were considered as diabetic if they fulfilled diabetes criteria according to current guidelines (WHO 2006), irrespective of their treatment.
- Left Ventricle Ejection fraction (LVEF) was determined by echocardiography during standard preoperative screening.
- Euroscore II evaluating mortality risk associated to cardiac surgery was calculated based on recommended criteria (Age, Sex, Creatinine Clearance, Chronic lung disease, Extracardiac arteriopathy, Insulin dependent Diabetes mellitus, poor mobility, NYHA class, CCS class, Critical Preoperative state, Emergency, Endocarditis, Previous cardiac surgery, Left Ventricle function, recent myocardial infarction, weight of procedure) according to published model (see. Nashef et al. 2012)
- Baseline glomerular filtration rate was estimated using the CKD-EPI formula based on creatinine IDMS measurement. (Levey et al. 2009)
- Patients were considered as kidney graft recipients when having a functional kidney graft without RRT requirement before surgery.
- Type of surgery was defined by the following : CAB corresponded to isolated, single or multiple Coronary artery Bypass (CAB) ; Valvular surgery corresponded to isolated valvular repair by plasty or valvular replacement ; Combined Surgery corresponded to an association of coronary artery bypass and valvular surgery ; Thoracic Aorta corresponded to a surgery that include a aorta replacement associated or not with coronary artery bypass and/or valvular surgery ; Left Ventricle corresponded to a surgery that involve directly myocardium especially of left ventricle (Ventricular septal defect cure, Left ventricle aneurysm...) with or without coronary artery bypass or valvular surgery associated.
- Catecholamines corresponded to the use or not of catecholamine (Epinephrine, Norepinephrine, Dobutamine...) during or after surgery.
- RBC Yes/No indicated the requirement for red blood cells transfusion during or after surgery.
- Number of packed RBC corresponded to the number of packed red blood cells transfused in each group during or after surgery.
- Postoperative volume expansion was the total volume of infusion during the first 24 hours after surgery.
- Postoperative sepsis was defined as an infection (fever, specific organ symptoms, detection of pathogen bacteria in a significant localization, necessity of antibiotic treatment...) that occurs during the 7 days following surgery.
- Postoperative iodinated contrast agents corresponded to at least one infusion of contrast agent for RX-imaging purpose during early postoperative period.

Diuresis 24 hours was defined as the urine output during the first 24 hours after surgery.

### 3. Discussion :

Dans ce travail, grâce à des analyses métabolomiques urinaires sur une cohorte cas-témoin de 167 malades, nous avons confirmé la présence d'anomalies concernant plusieurs métabolites de la voie de biosynthèse de novo du NAD à partir du tryptophane à l'image des données préalablement publiées<sup>515</sup>. Ces métabolites peuvent même être utilisés comme biomarqueurs avec des performances intéressantes pour le diagnostic de l'IRA. Cependant, dans notre modèle murin d'IRI, une supplémentation parentérale en NAM, superposable aux précédents protocoles publiés, ne permet pas d'améliorer l'IRA induite par une IRI. Le désaccord avec les conclusions des précédentes études est potentiellement en lien avec une surinterprétation de certains de leurs résultats notamment grâce à l'utilisation de critères de jugement flatteurs mais inadaptés ou de terrains génétiques particuliers (invalidation de *Qprt* ou *Ppargc1a*).

Malgré nos conclusions notre travail présente des limites. Concernant la partie humaine, il aurait déjà été intéressant d'avoir accès à l'ensemble des métabolites de la voie de biosynthèse de novo du NAD à partir du tryptophane à l'image des données publiées par Poyan Mehr et al.<sup>515</sup>. Malheureusement le kit utilisé (Absolute IDQ p 180) ne donnait accès qu'à ces deux métabolites (tryptophane et kynurénine) et la Spectrométrie H1-RMN ne parvenait pas à détecter les pics associés aux autres métabolites de cette voie (quinolinate, acide kynurénique et NAD notamment), malgré un spike, probablement en lien avec des concentrations urinaires trop faibles par rapport à la sensibilité de la technique. Une autre limite pour cette partie humaine correspond à la sélection des patients. Ainsi, pour des raisons de coût, un échantillon cas-témoin a été sélectionné dans la cohorte AKIOmics1 que nous détaillerons plus loin. Ce type de sélection expose toujours un risque de biais d'échantillonnage et altère certains estimateurs de performances par modification de la prévalence du end-point. Concernant *l'in vivo*, la principale limite de ce travail correspond à l'absence de dosage du NAM (circulant et tissulaire) pour s'assurer de la bonne exposition au traitement injecté. En effet, malgré notre injection, respectant les protocoles précédemment publiés nous n'apportons pas la preuve de l'efficacité de notre apport en NAM, n'excluant pas un déficit de résorption intra-péritonéale. Une autre limite de ce volet correspond à l'absence de calcul *a priori* de la puissance (et donc du risque  $\beta$ ) pour choisir le nombre de souris à inclure. Ainsi, nous nous retrouvons en aveugle sur le risque que nous avons pris de passer à côté d'un effet bien réel du NAM dans cette indication. Néanmoins, l'absence complète d'efficacité identifiable pour un nombre de souris non négligeable, est peu cohérente avec un bénéfice majeur de ce traitement dans l'IRI chez la souris.

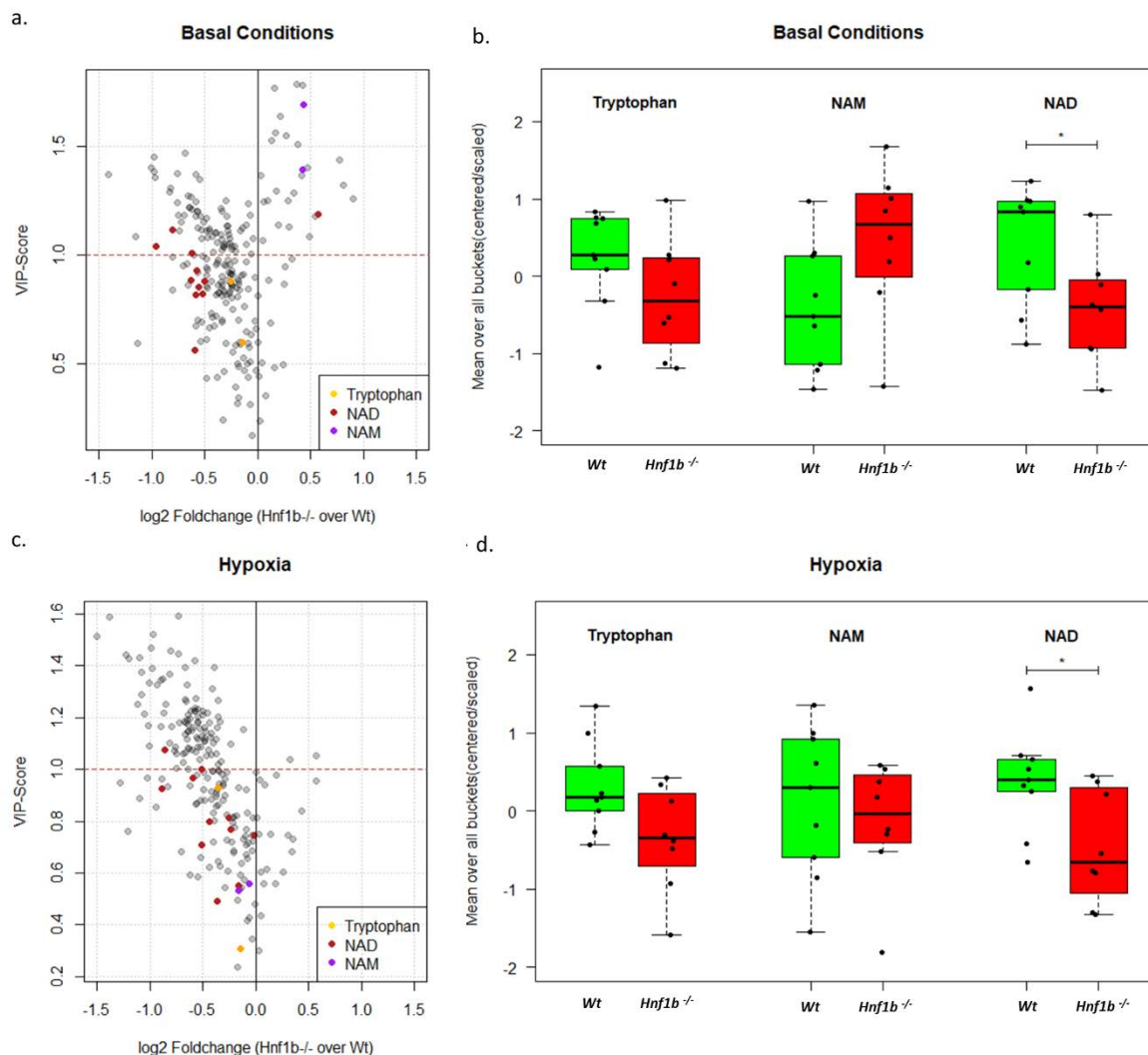
Cet article est en fait le fruit d'expérimentations préliminaires avec initialement un objectif différent. Ainsi, nous envisagions de déterminer une signature métabolomique urinaire de l'IRA dans un modèle murin d'IRI, d'en faire le parallèle avec les anomalies urinaires humaines que nous décrirons sommairement plus loin (humanisation) et d'en évaluer la corrélation avec les anomalies métabolomiques tissulaires. Le groupe traité

devait servir pour valider le concept de screening de candidats traitements sur la base d'une réversibilité de la signature métabolomique. Pour cela nous avons choisi le NAM, traitement agissant sur le métabolisme et dont l'efficacité était suggérée dans le traitement de l'IRA. Devant les résultats initiaux hautement discordants avec les données publiées, nous avons poussé plus loin les explorations pour confirmer la surprenante absence d'efficacité, entre nos mains, de ce traitement dans un modèle murin d'IRI, pourtant en cours d'évaluation dans plusieurs essais cliniques randomisés.

Bien qu'en défaveur d'une efficacité du nicotinamide dans la prise en charge de l'IRA, ce travail ne signe pas l'arrêt de cet axe d'exploration.

L'idée d'origine de développer une signature métabolomique urinaire humanisée dans un une plusieurs modèles d'AKI murines puis de valider l'association entre une réversibilité de tout ou partie de cette signature et l'efficacité d'une molécule ciblant le métabolisme restent d'actualité. Un autre témoin positif que le NAM devra être choisi. Ce type d'outils pourrait ensuite être utilisé pour sélectionner de nouveaux candidats traitements à une évaluation plus approfondie.

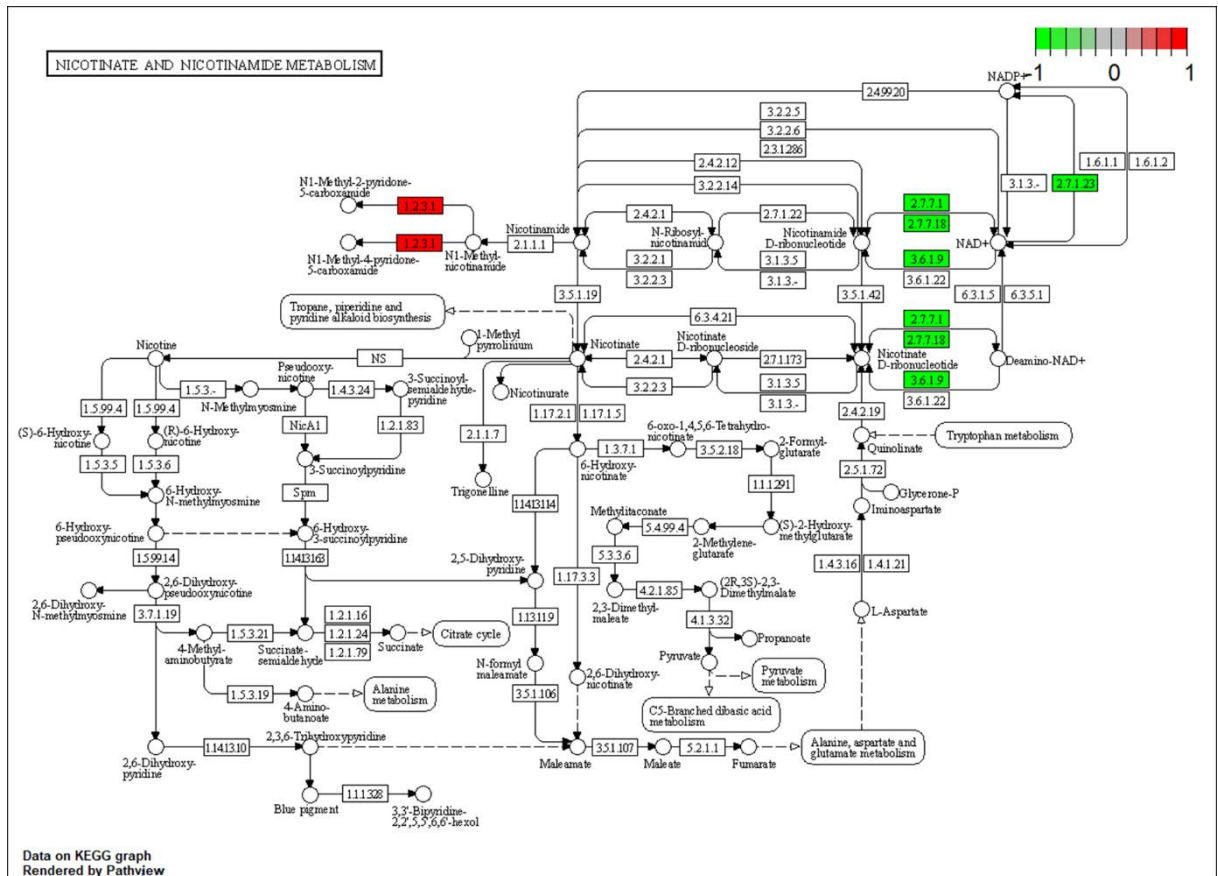
Une autre perspective intéressante à envisager serait de faire le lien avec la partie précédente en s'intéressant aux conséquences sur le NAD après invalidation du gène *Hnf1b*. En effet, vu le rôle essentiel de *PGC-1 $\alpha$* , une cible connue d'*HNF-1 $\beta$* <sup>214</sup>, dans la stimulation de la biosynthèse de novo du NAD à partir du tryptophane<sup>639,640</sup>, on est en droit d'attendre une réduction du contenu intra-cellulaire en NAD dans les cellules invalidées pour *Hnf1b*, en conditions basales mais surtout d'agression. Une supplémentation en NAM pourrait alors avoir un effet protecteur à l'image de ce que l'on observe en cas d'invalidation de *Ppargc1a* même si cela n'est pas le cas en contexte général<sup>640</sup>. Les résultats de la spectrométrie H<sub>1</sub>-RMN dans les cellules MCT *Hnf1b*<sup>-/-</sup> comparativement aux *Wt* ne montrent pas une réduction drastique et significative du contenu intracellulaire en NAD en condition basales (**Figure 21ab**) ou d'hypoxie (**Figure 21cd**) mais une tendance homogène sur l'ensemble des buckets existe. De la même manière des tendances sont identifiables sur certains précurseurs. (**Figure 21abcd**)



**Figure 21 : Anomalies du tryptophane, du nicotinamide et du nicotinamide adénine dinucleotide dans les cellules MCT *Hnf1b*<sup>-/-</sup> en conditions basales et d'agression.** a. Volcanoplot représentant les foldchanges et VIP scores des buckets H<sub>1</sub>-RMN issus du modèle PLSDA comparant les cellules MCT *Hnf1b*<sup>-/-</sup> et Wt en conditions basales. Les buckets associés aux métabolites impliqués dans la biosynthèse du NAD sont colorées comme indiqué (rouge : NAD, or : Tryptophane, violet : Nicotinamide). b. Boxplot représentant les abondances relatives globales de chaque métabolite associé à la voie de biosynthèse du NAD (moyenne de variation centrée réduite de tous les buckets) en fonction du statut *Hnf1b* dans les cellules MCT en conditions basales. c. Volcanoplot représentant les foldchanges et VIP scores des buckets H<sub>1</sub>-RMN issus du modèle PLSDA comparant les cellules MCT *Hnf1b*<sup>-/-</sup> et Wt en hypoxie (1%, 24h). Les buckets associés aux métabolites impliqués dans la biosynthèse du NAD sont colorées comme indiqué (rouge : NAD, or : Tryptophane, violet : Nicotinamide). d. Boxplot représentant les abondances relatives globales de chaque métabolite associé à la

voie de biosynthèse du NAD (moyenne de variation centrée réduite de tous les buckets) en fonction du statut *Hnf1b* dans les cellules MCT en hypoxie (1%, 24h).

La réanalyse de la RNASeq effectuée sur la lignée mIMCD3 retrouve plusieurs gènes modérément sous exprimés, communs aux trois voies de la biosynthèse du NAD et sans anomalies identifiables en amont, plaidant en défaveur d'une efficacité potentielle de la supplémentation en nicotinamide sans l'exclure formellement. (**Figure 22**). Il pourrait être intéressant, dans un premier temps, de confirmer par un dosage biochimique simple, le déficit en NAD basal observé dans les cellules murines et humaines invalidées pour *Hnf1b*. En cas de confirmation, le contenu en NAD de ces cellules dans divers modèles d'agression type cytokines inflammatoires, LPS ou myoglobine mériterait d'être étudié de même que le contenu tissulaire rénal ou urinaire des patients ou de souris mutées.



**Figure 22 : Différences d'expression relatives induites par l'invalidation d'Hnf1b des gènes codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse du NAD dans les cellules mIMCD3 en conditions basales.**

Résultats obtenus via une réanalyse de données de RNASeq préalablement publiées (Chan et al. 2018) et représentés grâce au package pathview.

# Axe 3 : Utilisation des « Omics » dans le diagnostic précoce de l'IRA post-chirurgie cardiaque avec CEC

## 1. Introduction :

L'objectif de ce deuxième axe a été d'améliorer le diagnostic de l'IRA dans un modèle de pathologie humaine. Comme nous l'avons vu, cette thématique correspond à un enjeu important dans le champ de l'IRA et de nouveaux outils sont nécessaires pour redéfinir le cadre de l'IRA.

Pour cela nous avons tenté, d'une part d'identifier, grâce à l'utilisation de techniques « omics », des nouveaux biomarqueurs ou signatures permettant le diagnostic précoce d'une IRA et d'autre part, d'évaluer l'intérêt d'une combinaison de ces biomarqueurs/signatures entre eux et avec les données cliniques dans le cadre d'approches multimodales. Nous avons pu utiliser la cohorte monocentrique de patients mise en place par le Pr Faguer. Il s'agissait de patients ayant bénéficié d'une chirurgie cardiaque avec circulation extra-corporelle au CHU de Toulouse pour lesquels des échantillons urinaires post-opératoires précoces étaient disponibles.

Ces échantillons ont été analysés par une approche peptidomique (CE-MS). Cette analyse a permis d'identifier des anomalies précoces associées à la survenue d'une IRA et de construire des scores peptidomiques permettant de diagnostiquer dès la 4<sup>ème</sup> heure post-CEC la survenue d'une IRA dans les 7 jours suivant la chirurgie, avec des performances supérieures aux biomarqueurs traditionnels et à une signature peptidomique antérieurement publiée. Ces performances ont été également confirmées dans une autre cohorte de recrutement très différent (FrogICU – admission en réanimation) sur un vaste panel de contextes étiologiques. Cette partie du projet fait l'objet de la première publication jointe, en cours de finalisation.

## 2. Publication :



# A urinary peptidome predictive and mechanistic signature architects across acute kidney injury settings

Alexis PIEDRAFITA<sup>1,2,3#</sup>, Justyna SIWY<sup>4,#</sup>, Julie KLEIN<sup>2,3,#</sup>, Amal AKKARI<sup>5</sup>, Alexandre MEBAAZA<sup>6</sup>, Bertrand MARCHEIX<sup>3,7</sup>, François DEPRET<sup>6</sup>, Vincent MINVILLE<sup>3,8</sup>, KIDNEY ATTACK study group\*, Julia GROSSAC<sup>8</sup>, Harald MISCHAK<sup>4</sup>, Alberto ORTIZ<sup>9</sup>, Stéphane GAZUT<sup>5</sup>, Joost P. SCHANSTRA<sup>2,3,‡</sup>, Stanislas FAGUER<sup>1,2,3‡</sup>

1 Department of Nephrology and Organ Transplantation, University Hospital of Toulouse, and French Intensive care Renal Network, F-31000 Toulouse, France

2 National Institute of Health and Medical Research (INSERM), UMR 1297, Institute of Cardiovascular and Metabolic Disease, F-31000 Toulouse, France.

3 University Paul Sabatier, Toulouse-III, F-31000 Toulouse, France

4 Mosaiques diagnostics GmbH, Hannover, Germany.

5 CEA LIST, Laboratory for Data Analysis and Systems' Intelligence, Gif-sur-Yvette, France.

6 Department of Anesthesiology, Critical Care and Burn Unit, Hôpitaux Universitaires Saint Louis-Lariboisière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Paris Diderot-Paris 7, Sorbonne Paris Cité, UMR-S 942, INSERM, Paris, France.

7 Department of Cardiac and Vascular Surgery, University Hospital of Toulouse, F-31000 Toulouse, France

8 Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, University Hospital of Toulouse, F-31000 Toulouse, France

9 IIS-Fundacion Jimenez Diaz, School of Medicine, University Autonoma of Madrid, FRIAT and REDINREN, Madrid, Spain.

**Keywords:** acute kidney injury, cardiac surgery, intensive care unit, urinary peptidomic, prediction

# Equal contribution.

‡ Corresponding authors: [stanislas.faguer@inserm.fr](mailto:stanislas.faguer@inserm.fr) and [joost-peter.schanstra@inserm.fr](mailto:joost-peter.schanstra@inserm.fr)

## **KIDNEY ATTACK study group**

Prof. Stanislas FAGUER, Department of Nephrology and Organ Transplantation, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France

Prof. Bertrand MARCHEIX, Department of Cardiac and Vascular Surgery, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France

Dr. Etienne GRUNENWALD, Department of Cardiac and Vascular Surgery, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France

Prof. Vincent MINVILLE, Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France

Dr. Julia GROSSAC, Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France

Dr. François LABASTE, Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France

Dr. Nicolas MAYEUR, Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France

Dr. Elsa TARDIF, Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France

Joost P. SCHANSTRA, Institute for Metabolic and Cardiovascular Disease, National Institute of Health and Medical Research, Toulouse, France

Julie KLEIN, Institute for Metabolic and Cardiovascular Disease, National Institute of Health and Medical Research, Toulouse, France

Benjamin BREUIL, Institute for Metabolic and Cardiovascular Disease, National Institute of Health and Medical Research, Toulouse, France

Melinda ALVES, Institute for Metabolic and Cardiovascular Disease, National Institute of Health and Medical Research, Toulouse, France

Audrey CASEMAYOU, Institute for Metabolic and Cardiovascular Disease, National Institute of Health and Medical Research, Toulouse, France

Stéphane GAZUT, CEA, LIST, Laboratory for Data Analysis and Systems' Intelligence, Gif-sur-Yvette, France, Saclay, France

Alberto ORTIZ, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Justyna SIWY, Mosaiques Diagnostics, Hannover, Germany

Harald MISCHAK, Mosaiques Diagnostics, Germany

## **Abbreviations**

**AKI**: acute kidney injury

**CBP**: cardiac bypass

**CKD**: chronic kidney disease

**eGFR**: estimated glomerular filtration rate

**KDIGO**: Kidney Diseases Improving Global Outcomes

**ICU**: intensive care unit

**OR**: odd-ratio

**RBC**: red blood cells

# Introduction

Acute kidney injury (AKI) is a life-threatening condition with an incidence of 13.5 million patients per year, which contributes to about 1.7 million deaths every year worldwide <sup>1</sup>. For survivors, the risk of chronic kidney disease (CKD) is nine-fold higher than in patients without AKI <sup>2</sup>. Worldwide, more than 850 million inhabitants have AKI, CKD or the need of renal replacement therapy <sup>1</sup>. Despite the recent intensive efforts in research, AKI is still detected at a late stage (1 to 3 days after the insult), contrasting the need for early detection (<12 hours after the insult). In addition, although treatments to reduce the impact of full-blown AKI exist, these are non-specific and are not focusing on the molecular mechanisms of AKI. The International Society of Nephrology has officially recognized this alarming situation in AKI as an important challenge and launched the “0by25” objective, aiming zero preventable deaths due to AKI by 2025 in low and high-income countries <sup>1</sup>. This challenge was echoed by the European Renal Association calling for increased European involvement in AKI <sup>3</sup>.

The delayed detection of AKI is largely related to the assessment of kidney dysfunction by serum creatinine, which is by nature downstream of advanced AKI, rather than based on signs of kidney injury <sup>4-8</sup>. In addition, even the recently discovered single molecular markers of kidney injury (eg. FGF-23, NGAL, IL-18, KIM-1, [TIMP-2].[IGFBP7]) only allow detection of AKI, at best, at 12-24 h post insult, when often irreversible damage is already present <sup>4-7,9</sup>. These single biomarkers mostly rely on specific tubular segment injuries, can be non-specific and do not inform on the timing and the mechanisms of the kidney injury <sup>4-8</sup>. To grasp the molecular complexity of AKI, a large-scale approach using multi-dimensional marker should thus be proposed, as it was already proposed in other acute conditions like acute respiratory distress syndrome, acute heart failure or sepsis <sup>10-16</sup>.

Urinary peptidomics emerged as a powerful method to non-invasively assess characteristics of the kidney parenchyma <sup>17,18</sup>, stratify patients according to their risk to progress toward kidney fibrosis <sup>19-21</sup> but also to assess specific risk of systemic diseases, including acute life-threatening conditions like COVID-19 <sup>22</sup>. In the context of AKI, early preliminary studies using a reduced number of patients (n=80-120) have shown the

feasibility of the use of urinary peptidome analysis to predict the development of AKI outperforming NGAL and KIM-1<sup>23,24</sup>. However, samples were collected very close to the AKI events.

In the current study, we explored the urinary peptidome of 1,170 cardiac surgery patients at a maximum of four hours after surgery. Using fully independent discovery and validation cohorts, we identified a 204-peptides profile that predicted with high accuracy the development of AKI in the validation cohort. Up-to-date bioinformatic algorithms allowed to reduce this signature to 17 peptides. It appeared that this signature is “universal” for the development of AKI since it predicted with a similar accuracy AKI in an external cohort of 1,569 non-selected patients admitted to the intensive care unit (ICU). Top-ranked peptides were mostly non-collagenic and pointed inflammation, innate immunity, immune cells trafficking, kidney component and hemolysis as discriminative pathways, with potential targetable molecular mechanisms.

## Results

### Cardiac surgery cohorts and AKI incidence

We prospectively included a total of 1,170 patients (mean age 66.7±12.0 years) referred for cardiac surgery with cardiac bypass (CBP) in a single center (Toulouse, France). Inclusion was performed in two different time periods leading to two independent cohorts: a derivation cohort (n=509) with patients included between March 2016 and January 2017 and a validation cohort (n=661) with patients included between January 2019 and March 2020 (Figure 1).

Pre- and per-operative characteristics of patients are summarized in Supplementary Table S1. Patients from validation cohort had higher baseline kidney function (eGFR 77.6±20.6 vs. 70.3±20.2 mL/min/1.73m<sup>2</sup>,  $p < 0.001$ ), were more frequently affected by hypertension ( $p=0.029$ , COPD ( $p<0.001$ ) and had more frequently undergone previous cardiac surgery ( $p=0.022$ ). Owing to anesthetic procedures changes, the number of red blood cell (RBC) transfusions during surgery was lower ( $p=0.001$ ) and the use of vasoactive agents was more frequent ( $p=0.003$ ) in the validation cohort. During the post-operative period, patients included in the validation cohort received less frequently iodine contrast agents ( $p=0.001$ ) and had a shorter length of stay within the intensive care unit ( $p<0.0001$ ).

The rates of AKI were similar (~23%) in the derivation and validation cohorts. Severe AKI (KDIGO stage 2 or 3) was identified in 42 (8.3%) and 93 (14.0%) patients, and 18 (3.5%) and 14 (2.1%) patients required dialysis in the derivation and validation cohorts, respectively.

### **Pre- and per-operative clinical parameters are moderate predictors of AKI after CBP**

In the 509 patients of the derivation cohort, univariate analysis identified several clinical features that were associated to the development of AKI (**Table 1**). These included pre-operative (age, hypertension, kidney transplantation, baseline eGFR) and per-operative (CBP time, RBC transfusion) parameters. The majority remained significantly associated to the development of AKI after multivariate logistic regression adjustment. These parameters, both used as single markers or included in more complex scores previously published (i.e., CSA-AKI <sup>25</sup>, Ng <sup>26</sup>, Cleveland <sup>27</sup>, AKICS <sup>28</sup> or SRI <sup>29</sup> scores) had poor discriminative power (area under the received operating curves (AUC) of 0.62 – 0.70 in the validation cohort **Figure 2A**). We therefore built a local clinical score using six pre- and per-operative variables identified by logistic regression in the derivation cohort (age, hypertension, eGFR, kidney transplantation, valvular surgery and CBP time) (**Figure 2B**). However, although there was a clear difference in the local score of patients developing AKI (**Figure 2C**,  $p < 0.001$ ), this score was not significantly better than the previously established scores nor baseline eGFR (**Figure 2D**,  $p > 0.1$  for all). It is therefore clear that complementary strategies are needed to improve on the prediction of patients developing AKI following CBP-surgery at an early stage.

### **AKI leads to early changes of the urinary peptidome**

We analyzed for the first time at a very early stage (<4 h after CBP-surgery) the urinary peptide content in this large CBP-surgery cohort to identify biomarkers predictive of AKI that could help clinical decision making and stratifying patients for further interventional studies. Using the 509 patients in the derivation cohort, among the 1255 peptides analyzed, 204 were sequenced and displayed a significantly different abundance (Benjamini-Hochberg-adjusted Wilcoxon univariate testing ( $p < 0.05$ )) in urine of patients that developed AKI (up-regulated  $n=102$ ; down-regulated  $n=102$ ; **Figure 3A**). Peptides associated with AKI were derived from 48 proteins, including 16 collagens and 32 non-collagenic proteins. (**Figure 3B-C**) These latter are related to hemolysis (hemoglobin  $\alpha$  and  $\beta$ -subunit), inflammation (i.e. S100A9 (calprotectin), SERPINA1 ( $\alpha$  1-

antitrypsin), B2M ( $\beta$  2-microglobulin)), immune cells trafficking and activation (i.e. CD99, CX3CL1, PIGR), innate immunity (i.e. complement factor B), kidney epithelium (UMOD (uromodulin), FXD2) and cell growth and survival (ACTG1). (**Figure 3B**) When ranked according to their univariate adjusted p-values, top differential peptides were mainly derived from non-collagenic proteins (**Figure 3D**).

### **A urinary peptide-based signature predicts CBP-induced AKI and significantly outperforms clinical parameters.**

Next, the 204 peptides were included in a support vector machine-based mathematical model and trained on the derivation cohort. Application of this signature in the validation cohort showed a clear separation between patients developing or not AKI ( $p < 0.001$ , **Figure 4A**), with the risk of AKI increasing with an increased peptide-based score (**Figure 4B**,  $p < 0.001$ ).

Pre- and per-operative characteristics (diabetes mellitus, COPD, baseline eGFR, surgery indication, re-surgery, CBP time) partly correlated with the peptide-based score (**Supplementary Table S2**). However, the urinary peptide signature contained complementary information with respect to the clinical characteristics as suggested by (i) an adjusted-R-squared of the multivariate model of 0.246, (ii) the significant correlation between AKI development and the peptide score after adjustment on baseline eGFR ( $p < 0.001$ ), clinical score ( $p < 0.001$ ) and individual clinically significant characteristics ( $p < 0.001$  for all), and (iii) the significantly higher AUC of the peptide score (0.78 [0.73-0.83]) compared to that of the clinical score ( $p < 0.001$ ) or the baseline eGFR ( $p < 0.001$ ) (**Figure 4C**). A peptide-based score above the threshold (Youden index (threshold = - 0.0265)) was associated to an increased risk of AKI (OR = 6.13 [3.94-9.54],  $p < 0.001$ ) even after adjustment for the local clinical score or pre-operative clinical features (**Figure 4D**). Performances were superior to previously published peptide score<sup>23</sup> (**Supplementary Figure S1A**, AUC 0.68 [0.62-0.73],  $p < 0.001$ ) and the reference biomarker urinary NGAL (0.68 [0.63-0.74],  $p = 0.003$ , **Supplementary Figure S1A**).

Combining the clinical and the peptide-based scores, using logistic regression in the derivation cohort and testing in the validation cohort did not improve overall performances compared to peptide-based score alone (**Figure 4D**). On the other hand, the initial signature of 204 peptides could be reduced to 17 peptides using innovative bioinformatic approaches (genetic algorithms), with similar performances compared to the entire

signature in the validation cohort (AUC = 0.77 [0.72-0.82],  $p = 0.676$  for comparison between the two signatures) (**Figure Sup S1C**).

Of note, among the 58 patients that developed AKI within the first seven days after surgery, but that were not predicted by the peptide-based score, 14 exhibited at least one major complication (acute urinary retention  $n = 4$  ; nephrotoxic antibiotic overdose  $n = 1$  ; occlusive syndrome  $n = 4$  ; severe infection  $n = 3$  ; tamponade  $n = 2$  ; acute coronary syndrome with angiocoronarography  $n = 1$ ) that could be responsible for the development of AKI in the seven days after surgery (i.e. leading to AKI according to the KDIGO classification), independently of the initial CBP surgery.

### **Validation in an external cohort of patients admitted to the ICU**

CBP-surgery induced AKI is considered as a standardized setting of conditions with the potential to induce AKI. To study the potential generalization of the use of peptide signatures in AKI, we also evaluated the performance of the urinary peptide signature in 1569 patients admitted to an intensive care unit (ICU), with variable causes of AKI including sepsis, unplanned surgery and trauma (FROG-ICU cohort) <sup>30,31</sup>.

Interestingly, the urinary peptide-based signature assessed in patients at their admission in ICU was significantly associated with the development of AKI (**Figure 5A-D**) and its performances were not different from those obtained in CBP-surgery induced AKI (AUC 0.79 [0.77-0.81] versus 0.78 [0.73-0.83],  $p = 0.634$ ). These findings were confirmed when patients were split according to the timing of AKI diagnosis: diagnosis of AKI at the admission AUC 0.77 [0.75-0.80]; AKI in the 7 days of admission AUC 0.79 [0.76-0.81]. Subgroup analysis, according to diagnosis that justified ICU admission, showed quite good performances among groups despite some heterogeneity. The best AUCs were obtained in patients admitted after surgery ( $n = 146$ ; AUC 0.86 [0.80-0.92]), for sepsis ( $n = 378$  ; 0.78 [0.74-0.83]) or for impaired hemodynamic status ( $n = 193$ ; AUC 0.81 [0.75-0.88]) (**Supplementary Table S3**).

When compared to reference urinary AKI biomarkers, such as NGAL, those performances were globally equivalent (AUC = 0.78 [0.75-0.80],  $p = 0.426$ , **Figure 5D**) either for AKI at the admission and for AKI within seven days after admission (**Supplementary Figure S2**).

To note, in this setting, the reduced 17 peptide signature exhibited significantly decreased performances compared to the entire 204 peptide signature (AUC = 0.75 [0.73-0.78],  $p < 0.001$ ) (**Figure 5D**).

### **The urinary peptide-based AKI signature urinary provides insights on the early mortality**

Among the 1170 patients of the CBP cohort, 41 died during the hospitalization (3.5%), including 30 during the first month (2.5%). In-hospital mortality was strongly associated with the development of AKI (OR 16.2 [7.5-40.1-];  $p < 0.001$ ), even after adjustment on pre-operative mortality score (Euroscore-2: OR 13.8 [6.3-34.5];  $p < 0.001$ ) or after multivariate adjustment using a propensity score (OR 5.6 [2.4-14.8];  $p < 0.001$ ) (**Supplementary Table S4**). In both the derivation and validation cohorts, the peptidome-based score obtained <4 hours after the surgery was associated with higher in-hospital mortality (AUC 0.77 [0.66-0.88] ;  $p < 0.001$  ; OR when peptidome score was above threshold: 6.2 [2.5-15.2] ;  $p < 0.001$  ). Similarly, in the external ICU validation cohort, the peptidome-based score assessed at the admission was also associated with the in-hospital mortality ( $p < 0.001$ ).



## Discussion

In this study that included >2400 patients, we identified a urinary peptide signature predicting, as early as 4 hours after the initial insult, the onset of AKI in a variety of clinical at-risk situations, including CBP-surgery and ICU admission. Cardiac surgery with CBP is the prototypical cause of AKI, with a pathophysiology relying on various intricate mechanisms (inflammation, ischemia, hemolysis, oxidative stress...) <sup>32</sup>. The nature of the identified peptides can be clearly linked to these different mechanisms involved in the AKI pathophysiology <sup>8,32–36</sup> and potentially explains the good performance of the urinary peptide signature to predict future AKI. In addition, these mechanisms are shared by various other AKI etiologies <sup>8,33–36</sup> which may explain the excellent transferability of the urinary peptide signature to the ICU context.

In the CBP-surgery setting, the signature outperformed all clinical parameters and urinary NGAL, while the predictive value of the peptide-based signature was similar to NGAL in an ICU setting. This is most likely due to differences in the time-window with respect to the initial event leading to the development of AKI. While in the CBP-cohort all samples were obtained 4 hours after the initial insult, in the ICU validation cohort AKI biomarkers were evaluated within the first 24 hours after ICU admission. In addition, a number of the ICU patients already experienced a full-blown AKI on admission to the ICU <sup>30,31</sup>. This more advanced stage of AKI in the ICU setting could explain this comparable performance of NGAL and the urinary peptide signature.

Within the ICU cohort, the urinary peptide signature's performance was associated to diagnosis that justified ICU admission. As expected, due to the fact that the peptides were identified in the CBP-surgery setting, excellent performances were observed in post-operative context in the ICU patients but surprisingly also in hemodynamic distress or sepsis. However, performances were lower after cardiac arrest, potentially because of the high intensity of the aggression, and respiratory failure because of different mechanism involved (kidney congestion).

Although a number of the peptides in the signature can be easily tracked back to the AKI pathophysiology (eg Alpha-1-antitrypsin (SERPINA1), Calprotectin (S100A9), Serum amyloid A (SAA) for inflammation, Uromodulin (UMOD), Albumin (ALB), respectively), some of the peptides including Thymosin  $\beta$  4 (TMSB4X), CD99 or Na-K-ATPase  $\gamma$ -subunit (FXD2), currently not known to be involved in the AKI pathophysiology,

represent good candidates for further exploration of their role in AKI. Finally, the identified peptides also suggest candidate targets for specific AKI treatment. As an example, increased urinary abundance of the complement factor B (CFB) derived peptide in AKI argues in favor of alternative pathway complement targeting, using newly developed complement inhibitors<sup>37,38</sup>.

A limit for the direct clinical application in this urgent decision-making AKI setting of the peptide signature are the facts that specific equipment is currently necessary (capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-MS)) and the time needed for the analysis (currently 12 h). Future improvements on sample preparation, avoiding the 6h long lyophilization step and reducing instrument time, should allow bringing the analytical time-window down to a few hours, compatible with rapid decision-making necessary in patients at risk for AKI. Alternatively, peptides could be measured otherwise using strategies including multiplex ELISA, if the peptide abundance is correlated to the parental protein abundance. Targeted mass spectrometry (e.g. multiple reaction monitoring) is another alternative<sup>39</sup>. However, such strategies will need a significant reduction of the number of peptides. We have observed that reduction of the 204-peptide signature to 17 peptides is possible without significant performance loss in CPB-surgery cohort, but led to significant reduction in the AKI prediction efficacy in the ICU cohort. This may be due to the fact that entire 204 peptides signature incorporates information that appears redundant considering CBP-surgery induced-AKI but is essential in other at-risk situations encountered in the ICU. As some peptides correlates well with clinical features (data not shown), a way to furthermore reduce signature size would be to identified a score complementary to easily available clinical information.

**In conclusion**, we have identified and validated a urinary peptide signature predictive of AKI in a variety of at-risk situations. This overarching signature, containing many peptides directly associated to the AKI pathophysiology, has a significant promise to identify at an early stage after the insult a patient developing AKI and thus to develop tailored treatment.

# Methods

## Patients

In this study, cardiac surgery patients were prospectively recruited at the University hospital of Toulouse, France, during two distinct time periods (March 2016 – January 2017 for the derivation cohort, and January 2019 - March 2020 for the validation cohort). All patients who underwent scheduled cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CBP) were eligible. Patients aged of less than 18 years-old, who underwent non-programmed cardiac surgery or who required chronic dialysis before surgery were excluded. A total of 1170 patients were included in the derivation (n=509) and validation (n=661) cohorts. All the patients were orally informed of the inclusion during the anesthetic consultation performed the weeks before the surgery and non-opposition of the patients to be included in the clinical and biological collection of the University Hospital of Toulouse was obtained (agreement number DC-2008-463). The study was performed according to the Declaration of Helsinki, as revised in 2004.

Patients in the external ICU validation cohort were included in the Frog-ICU cohort 30,31.

## Characteristics, definitions and end-points

Pre, per and post-operative clinical data were gathered retrospectively for all patients based on hospital records. Baseline glomerular filtration rate was estimated using the CKD-EPI formula based on standardized creatinine measurement (IDMS) <sup>40</sup>. Euroscore-II was calculated as recommended <sup>41</sup>.

Surgery was divided in coronary artery bypass alone (CAB), valvular surgery (valvuloplasty or replacement) alone, CAB combined with valvular surgery (combined), surgery with replacement of ascending aorta with or without CAB (aortic surgery) ; surgery that directly affect cardiac myocardial wall such as inter-atrial communication, inter-ventricular communication, ventricular aneurism or cardiac transplantation (myocardium).

The main endpoint, acute kidney injury (AKI), was defined according to AKI KDIGO 2012 criteria <sup>42</sup> evaluated during the first seven days after surgery. Briefly, AKI was defined as a significant increase in serum creatinine (> 1.5 times baseline or > 26.5microM/0.3mg/dL increase) or a reduced urine output (< 0.5 mL/kg/h for at least 6 hours) or Renal Replacement Therapy (RRT) requirement.

CSA-AKI, Ng, Cleveland, AKICS and SRI scores were calculated as described <sup>25–29</sup>. Some parameters were approximated as followed: history of congestive heart failure was approximated as LVEF < 60%; pre-operative capillary glucose was assimilated with diabetic status whatever treatment received; central venous pressure was considered as the maximal pressure during the first 24 hours after surgery; low cardiac output was defined as the requirement of vasopressive or inotropic drugs.

## **Peptidomic**

In the CBP cohorts, urines samples were collected 2.5 to 4 hours after surgery and immediately frozen (-20°C) before subsampling and re-frozen for long-term conservation (-80°C). In the external ICU validation cohort (Frog-ICU), urines were collected in the first 24 hours of admission to the ICU, immediately frozen (-20°C) before subsampling and re-frozen for long-term conservation (-80°C). Peptide extraction and CEMS processing was performed as previously described <sup>43</sup>.

## **NGAL and creatinine measurement**

Urine samples used for peptidomic were centrifugated (2000g, 5 min, 4°C). NGAL was measured using ELISA (Human Lipocalin-2/NGAL DuoSet ELISA, R&D, DY1757) on diluted supernatant (1/10 or 1/100 for highly concentrated samples) according to manufacturer protocol. Creatinine was measured using colorimetric assay (QuantiChrom Creatinine Assay Kit, BioAssay Systems, DICT 500) according to manufacturer protocol. Normalized NGAL concentration (microg/g) were used for performances evaluation.

## **Statistics**

Statistical analyses were performed with the R (v4.0.3) software using RStudio interface. Additional packages were used (caret, pROC, ROCR, survival, survminer, mgcv).

For clinical descriptive analysis, missing data were removed (pairwise deletion) and data were not transformed prior to analysis. Quantitative variables were presented as mean  $\pm$  SD and qualitative variables as number and percentage. Two-group comparisons were conducted using the Aspin-Welch, Chi2 or Fisher Exact tests, as appropriate. Multivariate analysis was based on logistic regression and includes all preoperative variables with univariate adjusted-p-values < 0.1 (events per variable > 10). Survival was estimated using Kaplan-Meier curves with log-rank test for two-group comparison. Cox models were built to

further explore causality. Crude hazard ratios were extracted from univariate cox model. Adjusted hazard ratios were extracted from Cox models or multivariate logistic models using confounders as covariates. In the CBP derivation cohort, adjustment was done using the mortality score Euroscore II or a logistic propensity score based on clinical variables identified as associated to in-hospital mortality using univariate adjusted testing (**Supplementary Table S4**). Model qualities were verified with estimation of the C-Score and the likelihood ratio test. Global risk proportionality hypothesis was assessed using the `cox.zph` function, and when not verified, time-transformation of the considered variable was used.

For the development of the clinical score, all patients from the CBP discovery cohort were considered ( $n = 509$ ). A set of 14 variables (age, gender, body-mass index, diabetes mellitus, endocarditis, hypertension, peripheral artery obliterative disease, stroke, chronic obstructive pulmonary disease, left ventricle ejection fraction, eGFR, kidney transplant recipient, redux, kind of surgery, CPB duration, number of packed red blood cells) was first used, and a simple logistic regression on a reduced variable set obtained by stepwise selection was built (`caret`, “`glmStepAIC`”, repeated cross-validation number = 10/repeats = 3, “ROC” metric). Final model used only 6 easily available features (age, hypertension, eGFR (CKD-Epi), kidney transplant recipient, valvular surgery and CPB duration). For clinical score validation all patients from the CBP validation cohort except 8 with missing data ( $n = 653$ ) were considered. Results were extracted as probability scores from both cohorts and score were calculated as logit of those probabilities. Goodness of fit was verified using Hosmer-Lemeshow test and observed-predicted plot.

For peptidomic analysis, among the 5862 peptides, only sequenced peptides with less than 70% of missing data in at least one group were considered for analysis resulting in a set of 1255 peptides. For those peptides, missing values were replaced by 0 before further analysis. Univariate testing between AKI and non-AKI patients was performed using Wilcoxon signed-rank test and followed by Benjamini-Hochberg false discovery rate adjustment. Correlations were performed according to Pearson method.

For score derivation, all patients from the CBP discovery cohort with available peptidomics data were considered ( $n = 446$ ). A set of 204 differentially abundant peptides defined as significant Benjamini-Hochberg adjusted Wilcoxon signed-rank testing was identified in this cohort. On this peptide set, we built the main Support Vector Machine. Results were extracted as a calibrated score based on derivation. An alternative

simplified model was built the same way, based on a further reduced feature set ( $n = 17$ ) selected among available variables, by univariate (t.test, wilcoxon test, spearman test) and multivariate (RF-RFE, SVM-RFE, Shrunken centroid, Elastic Net) screening followed by genetic algorithm based selection. Score performances in the CBP discovery cohort was estimated using leave-one-out procedure. Validation of the score validation was then obtained in the CBP validation cohort (in patients with available peptidomic data;  $n = 480$ ). Univariate association with continuous clinical parameters were performed using Spearman correlation test. Univariate association with clinical qualitative features was performed using Wilcoxon or Kruskal-Wallis tests, as appropriate. Multivariate model was constructed using generalized additive model smooth multiple regression (mgcv R package). External validation in ICU context was obtained on all patients from FROG-ICU cohort with available AKI status and peptidomic data ( $n = 1569$ ).

For combination of clinical and peptidomic scores, all patients with available clinical and peptidomic data from validation cohort ( $n = 474$ ) were considered. Clinical score was used as AKI probability extracted from glm model. Peptides-based score was calibrated as a probability using logistic smooth regression built in the derivation cohort. Combination was achieved by product calculation of clinical and peptidomic calibrated probabilities. Other combination methods (addition, logistic regression based on scores/probabilities) were tried without further improvement in prediction performances, and thus were not shown in the manuscript. Performances of the various scores were evaluated with:

- Quantitative univariate testing according to AKI status (Aspin-Welch Test).
- Logistic univariate and multivariate generalized additive models for AKI prediction adjusted for clinical score, eGFR or pre/peroperative clinical variables significantly associated to AKI (Table 1) using multiple smooth regression (mgcv package).
- Area Under Receiver Operating Characteristic (AUROC) obtained using ROCR and pROC packages. Confidence Intervals (CI) were calculated using DeLong method. Results were presented as AUC [95% confidence intervals]. Comparison between ROC curves were performed using either paired Delong test or unpaired Delong test, as needed.
- Odds-ratios from univariate or multivariate logistic regression, using scores as a binary variable according to chosen threshold. Test were conducted in all available individuals in the corresponding

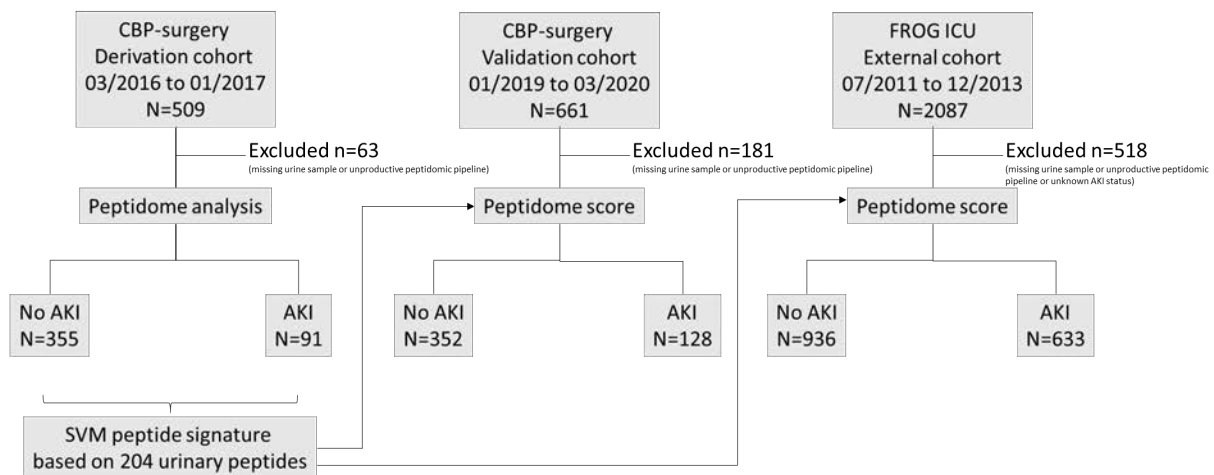
dataset. The regression was adjusted for clinical variables only for peptidomic score (Events per variable > 10). Optimal threshold for each score were chosen using the best Youden Index (Sensitivity - (1-Specificity)) in the derivation cohort.

- Sensibility, specificity, positive predictive value and negative predictive value in each cohort.

For all analysis, adjusted p-values < 0.05 were considered as significant.

## Figures

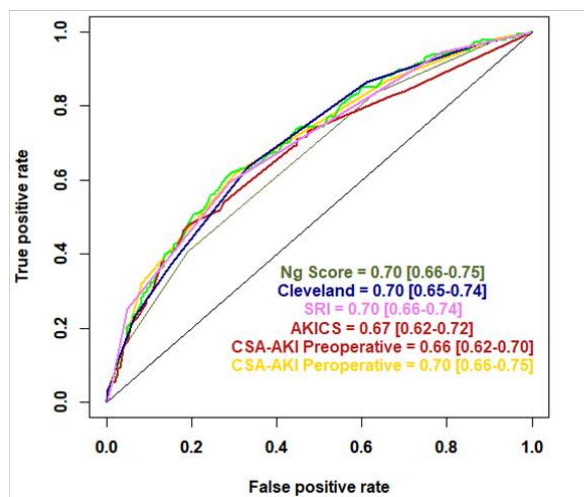




**Figure 1: Patient flow chart for the identification and validation of a predictive AKI urinary peptide signature.**

Three independent cohorts were used: a derivation CBP-surgery cohort (n=509), a validation CBP-surgery cohort (n=661) both recruited in the Toulouse hospital but during different time-periods, and an external ICU cohort (external ICU validation cohort, n=2087). 63 patients from derivation and 181 from validation CBP-surgery cohorts were excluded because of missing urine samples or unproductive peptidomic pipeline. 518 patients from the external ICU validation cohort were excluded because of missing urine samples, unproductive peptidomic pipeline or unavailable information regarding AKI. CBP, cardiac bypass surgery; ICU, intensive care unit.

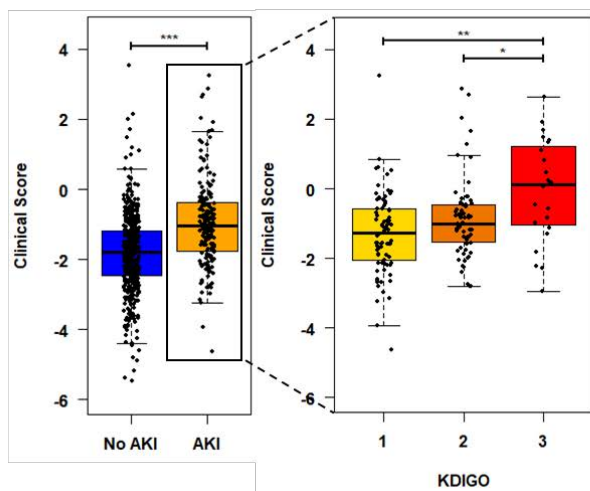
A.



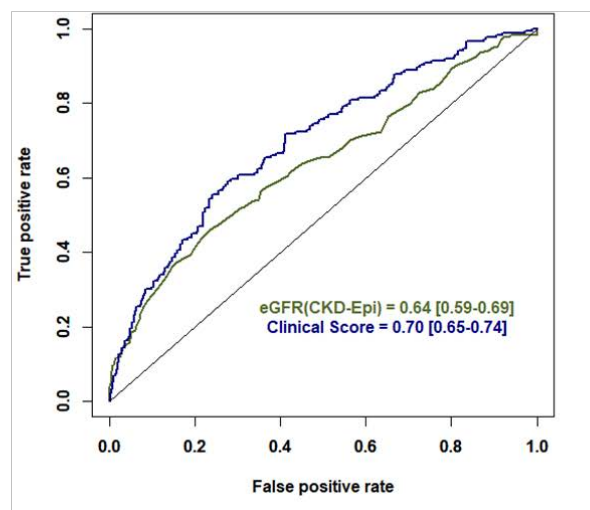
B.

Parameters	Coefficients	P-values
Age (years)	Ca = 0.024424	< 0.001
Hypertension	Ch = 0.528207	0.048
eGFR (mL/min.1,73m2)	Cg = - 0.023903	< 0.001
Kidney Graft Recipient	Ck = 3.205660	0.006
Valvular Surgery	Cs = 0.714751	0.007
CPB duration (min)	Cc = 0.022803	< 0.001
Intercept	l = - 3.911913	< 0.001

C.



D.



**Figure 2: AKI prediction based on clinical pre and peroperative features.**

A. ROC Curves and corresponding AUROC 95% CI of published scores for the prediction of AKI (KDIGO 1,2 or 3) in the CBP-surgery validation cohort.

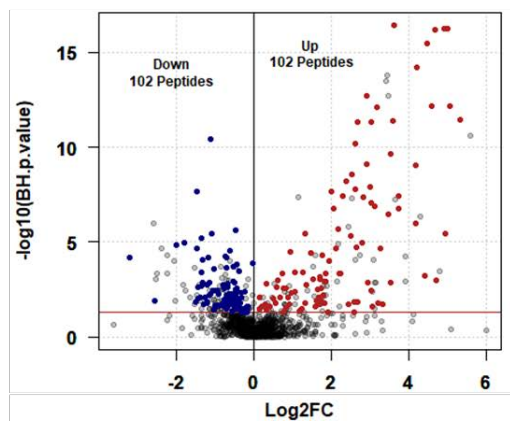
B. Parameters and associated coefficients of the local clinical model defined in the derivation cohort. The clinical score is calculated as follows:  $\text{logit}(p(\text{AKI})) = Ca \times \text{Age (Years)} + Ch \times \text{Hypertension (0/1)} + Cg \times \text{eGFR (mL/min.1.73m}^2) + Ck \times \text{Kidney Graft Recipient (0/1)} + Cs \times \text{Valvular Surgery (0/1)} + Cc \times \text{CPB duration (min)} + I.$

C. Association of the clinical score to the development of AKI in the validation cohort (all stages, left; according to KDIGO stages (right)). \*\*\*  $p < 0.001$

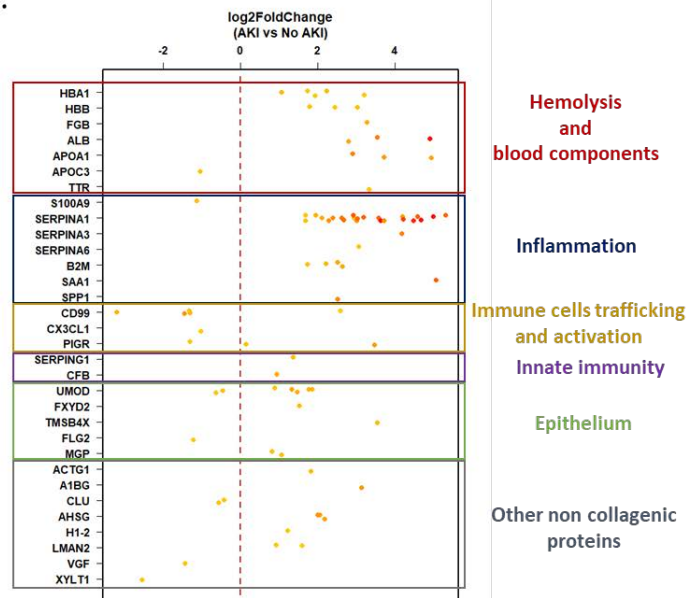
D. ROC Curves and corresponding AUROC 95% CI of the local clinical score compared to baseline eGFR for the prediction of all stages AKI in the validation cohort. The AUROCs of the local clinical score and eGFR were not significantly different (DeLong test ( $p > 0.103$ )).

ROC, receiver operating characteristics curves; AUROC, Area under the receiver operating characteristics curves; CI, confidence interval; AKI, acute kidney injury; CBP, cardiac bypass; eGFR, estimated glomerular filtration rate.

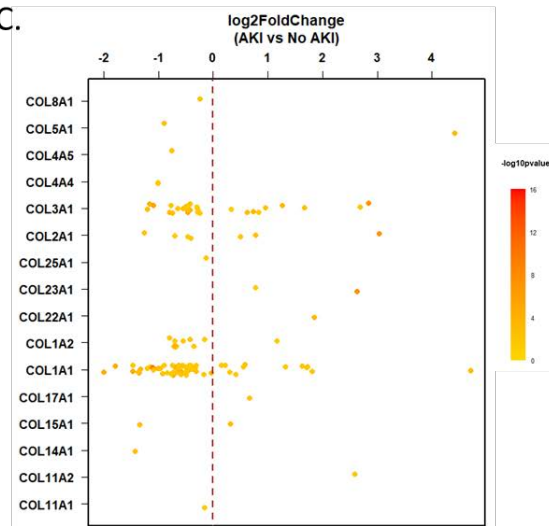
A.



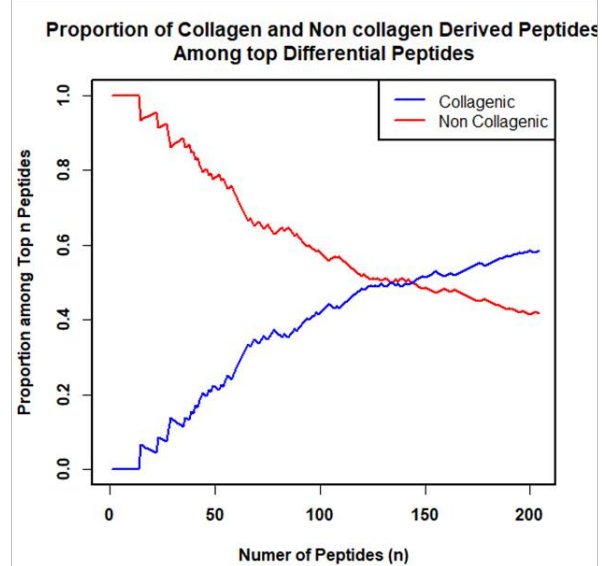
B.



C.

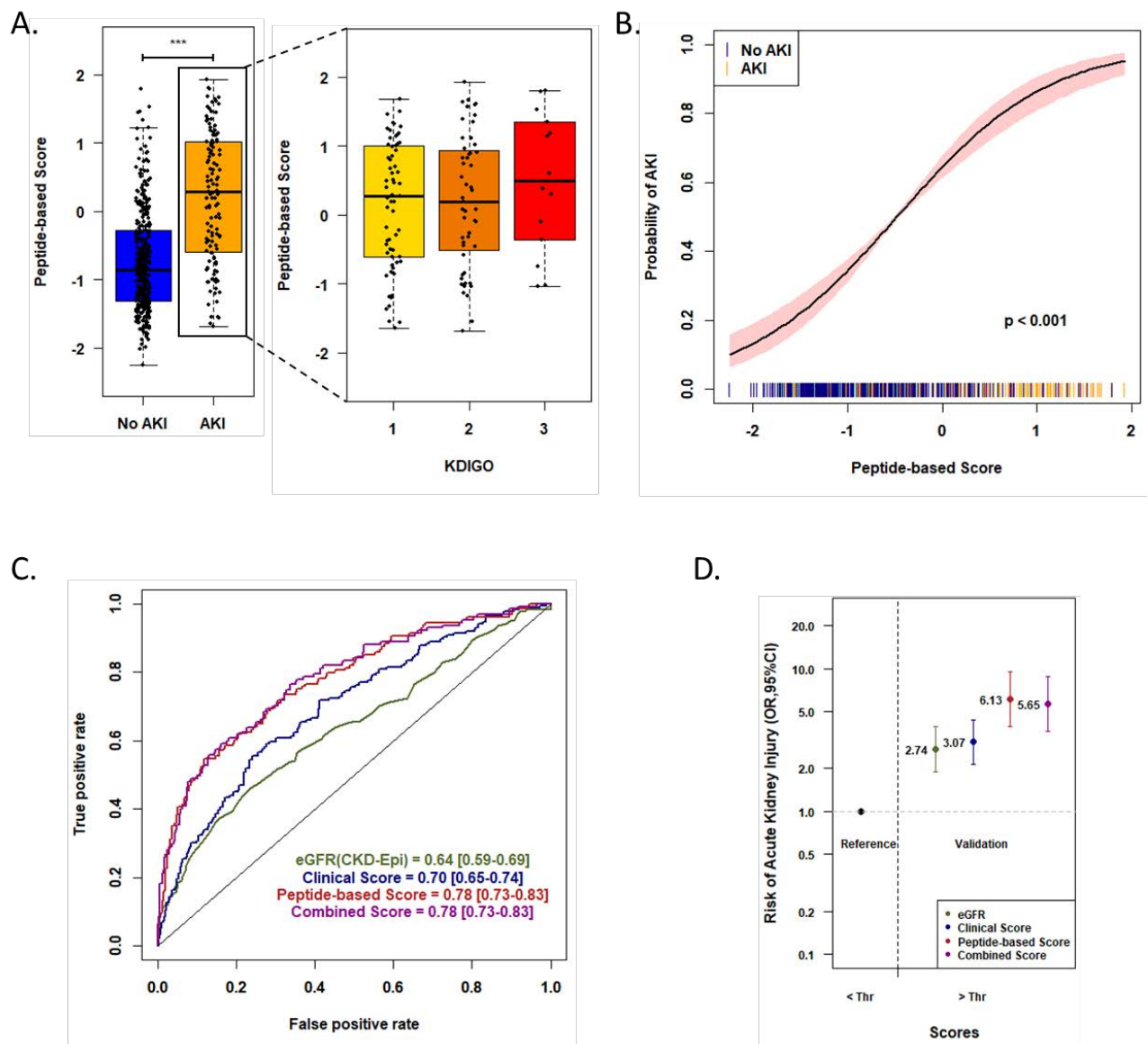


D.



### Figure 3: Urinary peptidomic changes in AKI patients.

- A. Sequenced peptides with significantly different abundance in AKI patients. The volcano-plot displays  $\log_{10}$  transformed and adjusted univariate p-values in function of  $\log_2$  transformed fold-changes. Sequenced peptides with differential abundance are represented in color (more abundant: red ; less abundant : blue).
- B. Sequenced peptides with significantly different abundance derived from non-collagenic proteins according to mother protein (y position),  $\log_2FC$  (x position) and  $-\log_{10}$  adjusted p-values (color scale). Brown dashed line represent  $\log_2FC = 0$ . Peptides are classed according to functional role during AKI (inflammation, epithelium, blood component, others...).
- C. Sequenced peptides with significantly different abundance derived from collagenic proteins according to mother protein (y position),  $\log_2FC$  (x position) and  $-\log_{10}$  adjusted p-values (color scale). Brown dashed line represent  $\log_2FC = 0$ .
- D. Evolution of collagenic and non-collagenic derived peptides according to Benjamini-Hochberg adjusted p-value ranking. Red line corresponds to non-collagenic and blue line to collagenic proteins-derived peptides.



**Figure 4: Independent validation of the predictive value of the urinary peptide signature for early AKI diagnosis after CBP-surgery.**

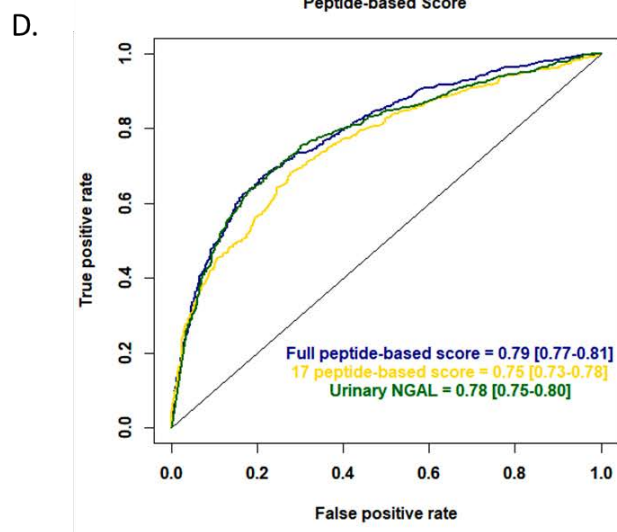
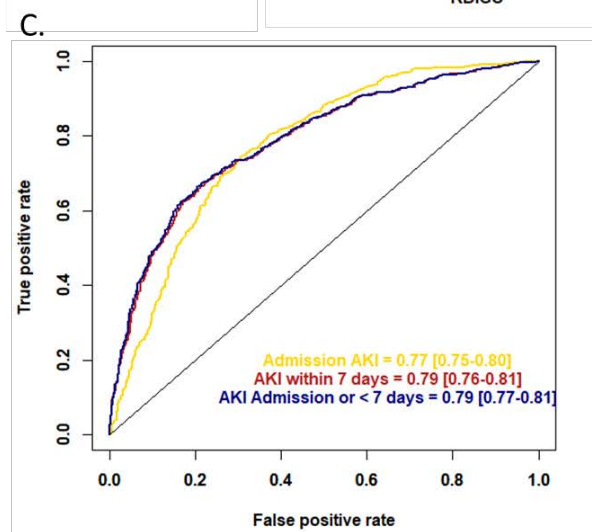
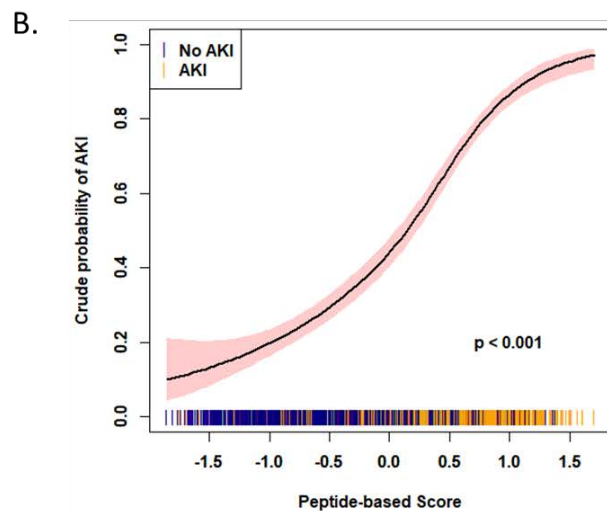
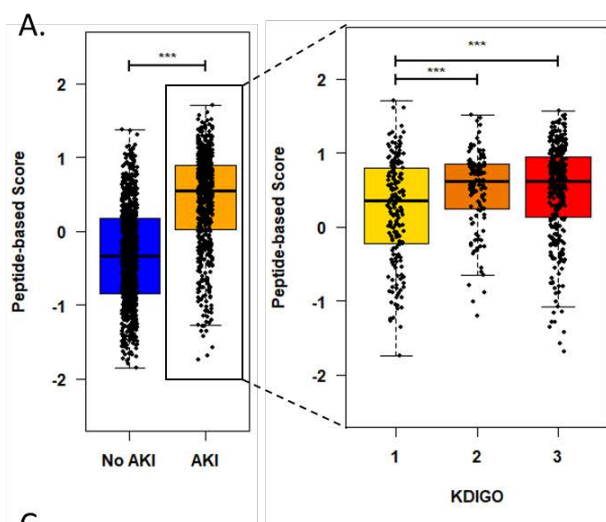
A. Association of the urinary peptide-based score to the development of AKI (all stages, left; according to KDIGO stages (right)) in the CBP-surgery validation cohort (n=480). \*\*\*  $p < 0.001$

B. Spline plot of the association between the peptide-based score and the risk to develop AKI. An univariate logistic generalized additive model was used. The black line indicates the estimated risk of AKI with respective 95% CIs. The spikes show the distribution of the peptidome-based scores.

C. ROC curves and corresponding AUROC 95% CIs of the peptide score, the local clinical score, the combination of both using logistic regression, and the eGFR for the prediction of AKI (all stages) in the validation cohort.

D. Odd-Ratios and corresponding 95% CIs in the validation cohort using a univariate logistic regression model including eGFR, the local clinical score, the peptide-based score or a combination of the local clinical and peptide-based scores as a qualitative value according to the selected threshold (optimal Youden Index in derivation cohort).

ROC, receiver operating characteristics curves; AUROC, Area under the receiver operating characteristics curves; CI, confidence interval.





**Figure 5: External validation of the predictive value of urinary peptide signature for AKI diagnosis in an intensive care unit (ICU) cohort of 1569 patients.**

A. Peptides-based score according to AKI status (all stages (left part); according to KDIGO stages (right part)) in the external ICU validation cohort. \*\*\*  $p < 0.001$

B. Spline plot of the association between the peptide-based score and the risk to develop AKI in the external ICU cohort. An univariate logistic generalized additive model was used. The black line indicates the estimated risk of AKI with respective 95% CIs. The spikes show the distribution of the peptidome-based scores

C. ROC Curves and corresponding AUROC 95% CIs of the peptide-based score at admission (yellow), within first seven days (red) or both (blue) for all stages AKI prediction in the external ICU validation cohort.

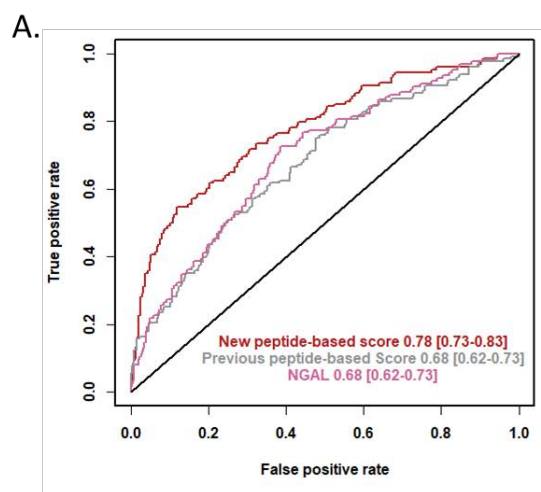
D. ROC Curves and corresponding AUROC 95% CIs of the full peptide-based score (blue), simplified peptide-based score (gold) or urinary reference biomarker NGAL (green) for all stages AKI prediction in the external ICU validation cohort.

Parameter	Global (n = 509)	No AKI (n = 389)	AKI (n = 120)	Adjusted Univariate p-value	Multivariate Odd- Ratio (95% CI)
Preoperative Features					
Past Medical Story					
Male, n (%)	381 (74.9)	295 (75.8)	86 (71.7)	0.504	-
Age (years), Mean $\pm$ Sd	67.6 $\pm$ 11.4	66.7 $\pm$ 12	70.3 $\pm$ 9.1	0.002	1.03 [1.00-1.05]
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), Mean $\pm$ Sd	26.9 $\pm$ 4.4	26.8 $\pm$ 4.2	27.5 $\pm$ 5.1	0.237	-
Diabetes, n (%)	127 (25)	93 (23.9)	34 (28.3)	0.492	-
Endocarditis, n (%)	28 (5.5)	20 (5.1)	8 (6.7)	0.759	-
Hypertension, n (%)	269 (52.8)	194 (49.9)	75 (62.5)	0.033	1.55 [0.98-2.50]
PAOD, n (%)	49 (9.6)	32 (8.2)	17 (14.2)	0.116	1.34 [0.63-2.72]
Stroke, n (%)	33 (6.5)	25 (6.4)	8 (6.7)	1.000	-
COPD, n (%)	29 (5.7)	23 (5.9)	6 (5)	0.911	-
Euroscore II, Mean $\pm$ Sd	2.4 $\pm$ 2.6	2.1 $\pm$ 2.2	3.4 $\pm$ 3.3	< 0.001	-
Cardiac Status					
LVEF (%), Mean $\pm$ Sd	55.9 $\pm$ 11.3	56 $\pm$ 11.4	55.7 $\pm$ 11.2	0.902	-
Renal Function					
Serum Creatinine ( $\mu$ mol/L), Mean $\pm$ Sd	98.3 $\pm$ 41.2	92.5 $\pm$ 25.1	117.4 $\pm$ 68.7	0.001	-
eGFR (CKD-Epi, mL/min.1.73m <sup>2</sup> ), Mean $\pm$ Sd	70.3 $\pm$ 20.2	72.9 $\pm$ 18.3	61.8 $\pm$ 23.7	< 0.001	0.80 [0.71-0.91]
Kidney Graft Recipients, n (%)	7 (1.4)	1 (0.3)	6 (5)	0.002	18.75 [2.64-385.1]
Peroperative Features					
Surgery					
CAB, n (%)	196 (38.5)	156 (40.1)	40 (33.3)	0.504	-
Valvular, n (%)	175 (34.4)	135 (34.7)	40 (33.3)		
Combined, n (%)	71 (13.9)	50 (12.9)	21 (17.5)		
Thoracic Aorta, n (%)	58 (11.4)	41 (10.5)	17 (14.2)		
Myocardium, n (%)	9 (1.8)	7 (1.8)	2 (1.7)	0.062	1.23 [0.39-3.65]
Previous Cardiac Surgery, n (%)	23 (4.5)	13 (3.3)	10 (8.3)		
CPB time (min), Mean $\pm$ Sd	85.3 $\pm$ 36.2	79.3 $\pm$ 30.8	104.8 $\pm$ 44.8		
RBC Yes/No, n (%)	91 (17.9)	56 (14.4)	35 (29.2)		
Number, Mean $\pm$ Sd	0.4 $\pm$ 0.9	0.3 $\pm$ 0.8	0.7 $\pm$ 1.2	0.003	1.34 [0.61-2.93]
Vasoactive agents, n (%)	456 (89.6)	345 (88.7)	111 (92.5)	0.403	-
Postoperative Features					
RBC Yes/No, n (%)	151 (29.7)	90 (23.1)	61 (50.8)	< 0.001	-
Number, Mean $\pm$ Sd	0.8 $\pm$ 1.8	0.5 $\pm$ 1.1	1.8 $\pm$ 2.9	< 0.001	-
Vasoactive agents, n (%)	277 (54.4)	194 (49.9)	83 (69.2)	0.001	-
Vasoactive agents Duration (d), Mean $\pm$ Sd	1.2 $\pm$ 2.1	0.9 $\pm$ 1.3	2.2 $\pm$ 3.6	0.001	-
Infection, n (%)	83 (16.3)	44 (11.3)	39 (32.5)	< 0.001	-
Iodinated Contrast Agents, n (%)	25 (4.9)	12 (3.1)	13 (10.8)	0.003	-
Mechanical Ventilation duration (d), Mean $\pm$ Sd	19.5 $\pm$ 77.2	11.1 $\pm$ 35.1	46.9 $\pm$ 143.4	0.014	-
ICU Stay (d), Mean $\pm$ Sd	5.6 $\pm$ 6.7	4.6 $\pm$ 3.8	8.8 $\pm$ 11.4	0.001	-
In Hospital Mortality, n (%)	15 (2.9)	1 (0.3)	14 (11.7)	< 0.001	-

**Table 1 : Clinical Features in Derivation Cohort according to AKI status and results of univariate and multivariate testing.**

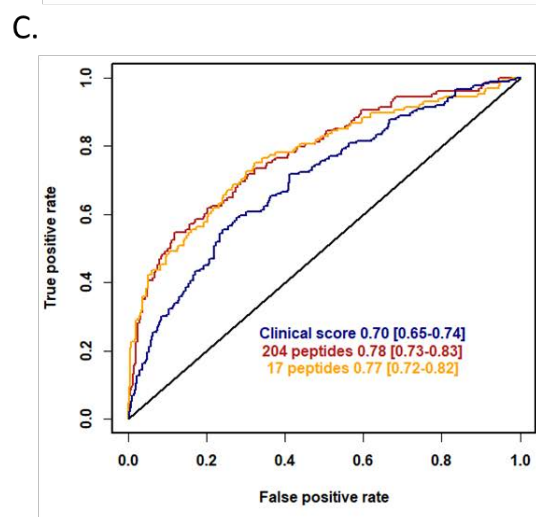
Quantitative variables are expressed as Mean  $\pm$  Sd and qualitative variables as n (%). Univariate p-values were obtained by adjustment (Benjamini-Hochberg False Discovery rate) of either Aspin-Welch, Chi2 or Fisher exact tests. Multivariate Odd-Ratios were obtained from a multivariate logistic regression model that included all pre and peroperative variables with adjusted univariate p-values < 0.2.

Acronyms : Body Mass Index (BMI) ; Peripheral Artery Occlusive Disease (PAOD) ; Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) ; Left Ventricle Ejection Fraction (LVEF) ; Estimated Glomerular Filtration Rate using CKD-Epi formula (eGFR) ; CardioPulmonary Bypass (CPB) ; Red Blood Cell Transfusion (RBC) ; Intensive Care Unit (ICU).



B.

Signature	Peptides according to mother proteins
17 peptides signature	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Albumin (n = 1)</li> <li>- Alpha-1 Antitrypsin (n = 4)</li> <li>- Collagen 1 (n = 2)</li> <li>- Collagen 3 (n = 3)</li> <li>- Collagen 11 (n = 1)</li> <li>- Collagen 17 (n = 1)</li> <li>- LMAN2 (n = 1)</li> <li>- Fibrinogen <math>\beta</math> (n = 1)</li> <li>- Hemoglobin <math>\beta</math> (n = 1)</li> <li>- MGP (n = 1)</li> <li>- Thymosin <math>\beta</math> 4 (n = 1)</li> </ul>



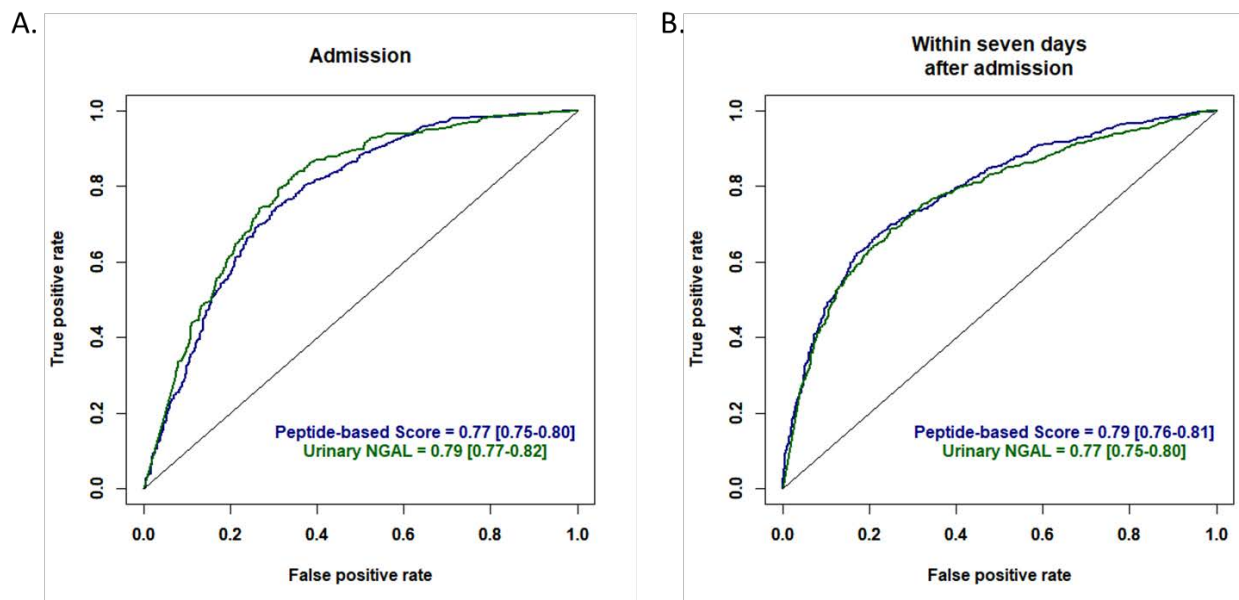
### Supplementary Figure S1 : Simplification of peptidomic signature.

A. ROC curves showing performances of our new peptidomic score, a previously published peptidomic score (Metzger et al. 2010) and NGAL/Creat ratio in validation cohort.

B. List of peptides included in simplified 17 peptides signature.

C. ROC curves showing performances of clinical score, full peptidomic score (n = 204) and simplified peptidomic score (n = 17).

LMAN2 : Lectin mannose binding 2 ; MGP : Matrix gla protein.



**Supplementary Figure S2 : Comparition of NGAL and peptidomic signature according to admission and within seven days AKI in external ICU cohort.**

A. ROC curves showing performances of our new peptidomic score and NGAL for admission AKI prediction in external ICU validation.

B. ROC curves showing performances of our new peptidomic score and NGAL for within seven days AKI prediction in external ICU validation.

Parameter	Discovery (n = 509)	Validation (n = 661)	Adjusted p-value
<b>Preoperative Features</b>			
<b>Past Medical Story</b>			
Male, n (%)	381 (74.9)	501 (75.8)	0.836
Age (years), Mean $\pm$ Sd	67.6 $\pm$ 11.4	66.1 $\pm$ 12.4	0.071
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), Mean $\pm$ Sd	26.9 $\pm$ 4.4	26.8 $\pm$ 4.7	0.811
Diabetes, n (%)	127 (25)	179 (27.1)	0.571
Endocarditis, n (%)	28 (5.5)	25 (3.8)	0.312
Hypertension, n (%)	269 (52.8)	399 (60.4)	0.029
PAOD, n (%)	49 (9.6)	59 (8.9)	0.836
Stroke, n (%)	33 (6.5)	57 (8.6)	0.312
COPD, n (%)	29 (5.7)	97 (14.7)	< 0.001
Euroscore II, Mean $\pm$ Sd	2.4 $\pm$ 2.6	2.7 $\pm$ 4.3	0.150
<b>Cardiac Status</b>			
LVEF (%), Mean $\pm$ Sd	55.9 $\pm$ 11.3	56.1 $\pm$ 11	0.844
<b>Renal Function</b>			
Serum Creatinine ( $\mu$ mol/L), Mean $\pm$ Sd	98.3 $\pm$ 41.2	88.3 $\pm$ 30.1	< 0.001
eGFR (CKD-Epi, mL/min.1.73m <sup>2</sup> ), Mean $\pm$ Sd	70.3 $\pm$ 20.2	77.6 $\pm$ 20.6	< 0.001
Kidney Graft Recipients, n (%)	7 (1.4)	6 (0.9)	0.771
<b>Peroperative Features</b>			
<b>Surgery</b>			
CAB, n (%)	196 (38.5)	245 (37.1)	0.220
Valvular, n (%)	175 (34.4)	199 (30.1)	
Combined, n (%)	71 (13.9)	105 (15.9)	
Thoracic Aorta, n (%)	58 (11.4)	87 (13.2)	0.022
Myocardium, n (%)	9 (1.8)	25 (3.8)	
Previous Cardiac Surgery, n (%)	23 (4.5)	57 (8.6)	
CPB time (min), Mean $\pm$ Sd	85.3 $\pm$ 36.2	88.5 $\pm$ 36.5	0.246
RBC Yes/No, n (%)	91 (17.9)	59 (8.9)	< 0.001
Number, Mean $\pm$ Sd	0.4 $\pm$ 0.9	0.2 $\pm$ 0.8	0.001
Vasoactive agents, n (%)	456 (89.6)	627 (94.9)	0.003
<b>Postoperative Features</b>			
RBC Yes/No, n (%)	151 (29.7)	155 (23.4)	0.045
Number, Mean $\pm$ Sd	0.8 $\pm$ 1.8	0.7 $\pm$ 1.9	0.368
Vasoactive agents, n (%)	277 (54.4)	445 (67.3)	< 0.001
Vasoactive agents Duration (d), Mean $\pm$ Sd	1.2 $\pm$ 2.1	1.6 $\pm$ 2.6	0.004
Infection, n (%)	83 (16.3)	112 (16.9)	0.858
Iodinated Contrast Agents, n (%)	25 (4.9)	7 (1.1)	0.001
Mechanical Ventilation duration (d), Mean $\pm$ Sd	19.5 $\pm$ 77.2	12.4 $\pm$ 42.6	0.122
ICU Stay (d), Mean $\pm$ Sd	5.6 $\pm$ 6.7	4.2 $\pm$ 5.2	< 0.001
<b>Outcomes</b>			
<b>AKI KDIGO</b>			
0, n (%)	389 (76.4)	486 (73.5)	0.005
1, n (%)	78 (15.3)	82 (12.4)	
2, n (%)	23 (4.5)	69 (10.4)	
3, n (%)	19 (3.7)	24 (3.6)	0.571
In Hospital Mortality, n (%)	15 (2.9)	26 (3.9)	

**Supplementary Table S1 : Clinical Features in Derivation and Validation Cohorts and results of univariate testing.**

Quantitative variables are expressed as Mean  $\pm$  Sd and qualitative variables as n (%). Univariate p-values were obtained by adjustment (Benjamini-Hochberg False Discovery rate) of either Aspin-Welch, Chi2 or Fisher exact tests.

Acronyms : Body Mass Index (BMI) ; Peripheral Artery Occlusive Disease (PAOD) ; Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) ; Left Ventricle Ejection Fraction (LVEF) ; Estimated Glomerular Filtration Rate using CKD-Epi formula (eGFR) ; CardioPulmonary Bypass (CPB) ; Red Blood Cell Transfusion (RBC) ; Intensive Care Unit (ICU) ; Acute Kidney Injury stage according to KDIGO guidelines (AKI KDIGO).

Variables	Univariate Adjusted-p-values	Multivariate p-values
Sex	0.202	-
Age	< 0.001	0.515
BMI	0.074	-
Diabetes	0.014	0.033
Endocarditis	0.058	-
Hypertension	< 0.001	0.168
PAOD	0.104	-
Stroke	0.125	-
COPD	0.033	0.034
LVEF	0.496	-
eGFR	< 0.001	< 0.001
Kidney Graft Recipient	0.095	-
Surgery type	< 0.001	< 0.001
Previous Cardiac Surgery	0.035	0.016
CPB time	0.006	0.007
RBC	0.006	0.062
Number	0.006	0.370

**Supplementary Table S2 : Univariate and multivariate association of peptide-based score with clinical pre and peroperative features.**

Univariate adjusted p-values were obtained by False Discovery rate Benjamini Hochberg adjustment of either spearman correlation test (quantitative variables) or wilcoxon test (qualitative variables) p values.

Multivariate p-values were obtained from a multiple linear regression thjat included all pre and peroperative clinical variables with adjusted univariate p-values < 0.05. R-Squared 0.246.

Acronyms : Body Mass Index (BMI) ; Peripheral Artery Occlusive Disease (PAOD) ; Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) ; Left Ventricle Ejection Fraction (LVEF) ; Estimated Glomerular Filtration Rate using CKD-Epi formula (eGFR) ; CardioPulmonary Bypass (CPB) ; Red Blood Cell Transfusion (RBC) ; Intensive Care Unit (ICU).

Diagnosis	AUC [95%CI]	p-value
Cardiac Arrest (n = 140)	0.71 [0.62-0.80]	0.050
Hemodynamic (n = 193)	0.81 [0.75-0.88]	0.374
Septic (n = 378)	0.78 [0.74-0.83]	0.862
Post-Operative (n = 146)	0.86 [0.80-0.92]	0.024
Acute Respiratory Failure (n= 325)	0.72 [0.66-0.79]	0.025
Neurological failure (n = 240)	0.74 [0.64-0.84]	0.408
Others (n = 154)	0.74 [0.65-0.74]	0.189

**Supplementary Table S3 : AUROC and 95% CI obtained in FrogICU cohort for AKI (admission or within seven days) prediction according to diagnosis that justified ICU admission.**

P-values compare AUC associated to a specific diagnosis to AUC associated to all other ones (DeLong test).

Acronyms : Intensive Care Unit (ICU).



AKI	Unadjusted LR	Euroscore II Adjusted LR	Propensity Score Adjusted LR	Unadjusted Cox	Euroscore II Adjusted Cox	Propensity Score Adjusted Cox*
No AKI (KDIGO 0)	1 (Reference)	1 (Reference)	1 (Reference)	1 (Reference)	1 (Reference)	1 (Reference)
AKI (KDIGO 123)	16.2 [7.5-40.1] p < 0.001	13.8 [6.3-34.5] p < 0.001	5.6 [2.4-14.8] p < 0.001	8.1 [3,2-20,1] p < 0.001	6.8 [2.7-16.9] p < 0.001	4.2 [1.6-11.4] p = 0.001

**Supplementary Table S4 : Odd-Ratios, 95 % CI and corresponding p-values from a unadjusted, Euroscore II adjusted or Propensity Score adjusted logistic Regression for In hospital mortality or Cox regression for D30 mortality in both derivation and validation cohorts.**

Euroscore 2 was calculated as recommended (ref). Propensity score was extracted from a logistic regression based on pre, per and post operative clinical features significantly associated to in hospital mortality (False Discovery rate Benjamini-Hochberg adjusted Aspin-Welch, Chi2 or Fisher Exact tests, p < 0.1).

Acronyms : Acute Kidney Injury (AKI) ; Logistic Regression (LR).

## Bibliography

1. Mehta, R. L. et al. International Society of Nephrology's Oby25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology. *Lancet* 385, 2616–2643 (2015).
2. Coca, S. G., Singanamala, S. & Parikh, C. R. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int* 81, 442–448 (2012).
3. Vanholder, R. et al. EDTAKI: a Nephrology and Public Policy Committee platform call for more European involvement in acute kidney injury. *Nephrology Dialysis Transplantation* (2021) doi:10.1093/ndt/gfab018.
4. Vaidya, V. S., Ferguson, M. A. & Bonventre, J. V. Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48, 463–493 (2008).
5. Teo, S. H. & Endre, Z. H. Biomarkers in acute kidney injury (AKI). *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 31, 331–344 (2017).
6. Rizvi, M. S. & Kashani, K. B. Biomarkers for Early Detection of Acute Kidney Injury. *The Journal of Applied Laboratory Medicine* 2, 386–399 (2017).
7. Charlton, J. R., Portilla, D. & Okusa, M. D. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant* 29, 1301–1311 (2014).
8. Ronco, C., Bellomo, R. & Kellum, J. A. Acute kidney injury. *Lancet* 394, 1949–1964 (2019).
9. Krawczeski, C. D. et al. Temporal relationship and predictive value of urinary acute kidney injury biomarkers after pediatric cardiopulmonary bypass. *J Am Coll Cardiol* 58, 2301–2309 (2011).
10. Zhang, Z. et al. Novel Urinary Peptidomic Classifier Predicts Incident Heart Failure. *Journal of the American Heart Association* 6, e005432.
11. Bowler, R. P. et al. Proteomic analysis of pulmonary edema fluid and plasma in patients with acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L1095–1104 (2004).
12. Bhargava, M. et al. Proteomic Profiles in Acute Respiratory Distress Syndrome Differentiates Survivors from Non-Survivors. *PLOS ONE* 9, e109713 (2014).
13. Stenemo, M. et al. Circulating proteins as predictors of incident heart failure in the elderly. *Eur J Heart Fail* 20, 55–62 (2018).
14. Bauzá-Martínez, J. et al. Proteolysis in septic shock patients: plasma peptidomic patterns are associated with mortality. *Br J Anaesth* 121, 1065–1074 (2018).
15. Hayashi, N. et al. Multiple biomarkers of sepsis identified by novel time-lapse proteomics of patient serum. *PLOS ONE* 14, e0222403 (2019).
16. Rogers, R. S. et al. The Proteomic Signature of Septic Shock Differs from Cardiogenic Shock or Bacteremia Without Sepsis or Shock. in D33. SEPSIS IMMUNOLOGY A6507–A6507 (American Thoracic Society, 2020). doi:10.1164/ajrccm-conference.2020.201.1\_MeetingAbstracts.A6507.
17. Marx, D. et al. Proteomics and Metabolomics for AKI Diagnosis. *Semin Nephrol* 38, 63–87 (2018).
18. Klein, J., Bascands, J.-L., Mischak, H. & Schanstra, J. P. The role of urinary peptidomics in kidney disease research. *Kidney Int* 89, 539–545 (2016).
19. Argilés, Á. et al. CKD273, a new proteomics classifier assessing CKD and its prognosis. *PLoS One* 8, e62837 (2013).
20. Nkuiy-Kenfack, E. et al. Assessment of Metabolomic and Proteomic Biomarkers in Detection and Prognosis of Progression of Renal Function in Chronic Kidney Disease. *PLOS ONE* 9, e96955 (2014).
21. Rodríguez-Ortiz, M. E. et al. Novel Urinary Biomarkers For Improved Prediction Of Progressive eGFR Loss In Early Chronic Kidney Disease Stages And In High Risk Individuals Without Chronic Kidney Disease. *Sci Rep* 8, 15940 (2018).
22. Wendt, R. et al. A urinary peptidomic profile predicts outcome in SARS-CoV-2-infected patients. *EClinicalMedicine* 36, 100883 (2021).
23. Metzger, J. et al. Urinary excretion of twenty peptides forms an early and accurate diagnostic pattern of acute kidney injury. *Kidney Int* 78, 1252–1262 (2010).
24. Metzger, J. et al. Acute kidney injury prediction in cardiac surgery patients by a urinary peptide pattern: a case-control validation study. *Crit Care* 20, 157 (2016).
25. Jiang, W. et al. Dynamic Predictive Scores for Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury. *J Am Heart Assoc* 5, e003754 (2016).

26. Ng, S. Y. et al. Prediction of acute kidney injury within 30 days of cardiac surgery. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 147, 1875-1883.e1 (2014).
27. Thakar, C. V., Arrigain, S., Worley, S., Yared, J.-P. & Paganini, E. P. A clinical score to predict acute renal failure after cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol* 16, 162–168 (2005).
28. Palomba, H., de Castro, I., Neto, A. L. C., Lage, S. & Yu, L. Acute kidney injury prediction following elective cardiac surgery: AKICS Score. *Kidney Int* 72, 624–631 (2007).
29. Mehta, R. H. et al. Bedside tool for predicting the risk of postoperative dialysis in patients undergoing cardiac surgery. *Circulation* 114, 2208–2216; quiz 2208 (2006).
30. Gayat, E. et al. Determinants of long-term outcome in ICU survivors: results from the FROG-ICU study. *Crit Care* 22, 8 (2018).
31. Nkuipou-Kenfack, E. et al. A novel urinary biomarker predicts 1-year mortality after discharge from intensive care. *Critical Care* 24, 10 (2020).
32. Wang, Y. & Bellomo, R. Cardiac surgery-associated acute kidney injury: risk factors, pathophysiology and treatment. *Nat Rev Nephrol* 13, 697–711 (2017).
33. Bonventre, J. V. & Yang, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 121, 4210–4221 (2011).
34. Devarajan, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 17, 1503–1520 (2006).
35. Bellomo, R., Kellum, J. A. & Ronco, C. Acute kidney injury. *Lancet* 380, 756–766 (2012).
36. Kellum, J. A. & Prowle, J. R. Paradigms of acute kidney injury in the intensive care setting. *Nat Rev Nephrol* 14, 217–230 (2018).
37. Morgan, B. P. & Harris, C. L. Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 14, 857–877 (2015).
38. Latuszek, A. et al. Inhibition of complement pathway activation with Pozelimab, a fully human antibody to complement component C5. *PLOS ONE* 15, e0231892 (2020).
39. Doerr, A. Mass spectrometry–based targeted proteomics. *Nat Methods* 10, 23–23 (2013).
40. Levey, A. S. et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* 150, 604–612 (2009).
41. Nashef, S. A. M. et al. EuroSCORE II. *Eur J Cardiothorac Surg* 41, 734–744; discussion 744-745 (2012).
42. Acute Kidney Injury (AKI) – KDIGO. <https://kdigo.org/guidelines/acute-kidney-injury/>.
43. Mischak, H., Vlahou, A. & Ioannidis, J. P. A. Technical aspects and inter-laboratory variability in native peptide profiling: the CE-MS experience. *Clin Biochem* 46, 432–443 (2013).

### 3. Discussion :

Ce papier démontre la présence de modifications du peptidome associées à la survenue précoce (avant J7) d'une IRA définie selon les critères AKI KDIGO, dans le contexte post-opératoire précoce (<4 heures post-opératoire) d'une chirurgie cardiaque avec circulation extra-corporelle programmée. Les anomalies peptidomiques sont complexes concernant des peptides issus de la dégradation de protéines impliquées dans les différents processus associés à la physiopathologie de l'IRA (inflammation, épithélium, fibrose...) dont certaines sont mêmes déjà proposés comme biomarqueurs (AAT1).

Le peptidome a pu être utilisé pour construire une signature permettant un diagnostic précoce de la survenue d'une IRA. Ces performances ont pu être validées dans une cohorte indépendante et même pour le diagnostic précoce de IRA dans un contexte plus large de patients de réanimation (Frog-ICU), renforçant nos conclusions. Ces performances isolées étaient au niveau des biomarqueurs les plus performants, et bien supérieurs aux scores cliniques les plus référencés ou même à la signature précédemment publiée.

Plus intéressant encore, les anomalies semblent porter une information complémentaire par rapport aux données cliniques et aux biomarqueurs habituels. Cela a pu être démontré pour la peptidomique notamment. Cependant on notera que l'information apportée par la clinique est incluse en grande partie dans la signature peptidomique initiale.

Ce travail présente plusieurs limites :

- **Une première limite** correspond au recrutement des patients utilisés pour cette étude. Ils ont été sélectionnés dans un seul centre (cohorte de chirurgie cardiaque). Une validation dans un autre contexte, multicentrique et binationale (FrogICU) mais toujours européenne, a été conduite avec des résultats intéressants mais ne remplace pas une validation externe vraie dans le même contexte pour s'assurer de la robustesse de nos résultats.
- **Une deuxième limite** est méthodologique, en lien avec le mode de collection des urines. En effet, les urines ne sont pas récupérées sur une miction spontanée mais dans la poche de recueil d'une sonde urinaire, chose susceptible de modifier les résultats autant de la peptidomique que de la métabolomique (présence anormale de cellule, inflammation au contact de la sonde...).<sup>502</sup> Ce mode de recueil pourrait compromettre la transférabilité des résultats vers des analyses sur miction spontanée beaucoup plus fréquentes en dehors du contexte particulier des services de soins intensifs. De plus, ces urines sont récupérées dans la poche de recueil d'une sonde urinaire après un séjour à l'intérieur de celle-ci de durée indéterminée, avec un volume d'air mort variable dans les tubes. Si cela ne pose pas de réel problème pour l'analyse des peptides dont la stabilité urinaire est relativement bonne<sup>502,504</sup>, la métabolomique est une technique dont les résultats peuvent être très fortement influencés par ce type de variations. Un autre souci correspond à l'absence de

centrifugation pré-congélation des urines sans documentation d'une éventuelle cellularité anormale (hématurie, leucocyturie). Ainsi lors de l'analyse, notamment métabolomique, rien ne permet d'attester que certains composants, abondants dans les cellules (membranes ou secteur intracellulaire), soit plus abondant à l'état soluble dans les urines et non simplement en lien avec la rupture induite par la congélation d'un nombre plus important de cellules. C'est notamment le cas pour certains métabolites comme les phospholipides membranaires ou les acyl-carnitines. Cependant, les variations en sens opposés de certains métabolites pourtant plus abondants en intracellulaire que dans les urines (acides aminés par exemples), signent que même si notre protocole n'est pas optimal, ce biais méthodologique n'explique pas l'ensemble des variations constatées.

- **Une troisième limite** correspond à la présence d'un biais d'observation, faisant que nos techniques, bien que présentées comme sans a priori, sont en fait à large échelle mais avec à priori. Déjà l'analyse du spectre obtenu après normalisation n'est pas exhaustive. En effet ne sont extraits que les abondances issues de certains buckets connus avec un temps de migration et un rapport m/z précis. Tout le reste du spectre est négligé laissant peut-être passer un grand nombre de peptides différentiels. D'autre part, nous avons encore réduit le set de peptide en ne considérant que les peptides séquencés négligeant là encore des biomarqueurs intéressants. De fait, ces approches avec a priori limitent la possibilité de découverte à un repositionnement de peptides ou métabolites connus.
- **Une quatrième limite**, importante mais conceptuelle, correspond à la faible compatibilité pratique de ces techniques avec le diagnostic de l'IRA. D'une part ces techniques ne sont pour le moment disponibles que dans un nombre très limité de centres et réservées pour des activités de recherche. Sur ce point, les progrès techniques, la réduction des coûts et le développement progressifs d'outils de routine utilisant ces techniques peuvent laisser espérer une meilleure accessibilité dans les années à venir. D'autre part, ces approches imposent un pipeline d'analyse long (extraction, lyophilisation, passage CE-MS, normalisation des spectres, analyse) peu compatible avec une application dans le cadre de l'aiguë à ce stade. Ainsi même en cas de prélèvement précoce, le rendu du résultat n'est actuellement pas possible en moins de 24h, ne permettant donc plus un diagnostic précoce. Cependant, l'obtention de signatures réduites avec des performances acceptables fait espérer, à terme, l'utilisation de sets réduits de peptides avec d'autres techniques plus compatibles avec la biologie de routine.
- **Une cinquième limite**, commune à tous les nouveaux biomarqueurs d'IRA, correspond à l'utilisation des critères KDIGO comme gold standard définissant ce end-point. En effet, ils présentent de nombreuses limites détaillées plus haut, notamment, ils ne tiennent compte seulement de

l'altération fonctionnelle et pas des lésions tissulaires ou encore en ils négligent complètement les IRA infracliniques pourtant associées à des conséquences cliniques significatives.

- **Enfin, une dernière limite**, malgré l'utilisation des données de FrogICU pour tenter d'élargir le champ d'application de cette signature diagnostique avec des résultats très encourageant, son utilisation reste cantonnée à la situation particulière de malades de soins intensifs (incidence élevée de l'IRA, malades sélectionnées avec des profils particuliers, profil de maladies particulier...).

Dans la suite de ce travail plusieurs perspectives sont intéressantes et sont déjà en cours d'explorations. D'autres, encore non en chantier seraient aussi intéressantes à étudier.

#### **a. Des validations indispensables :**

Afin d'obtenir une vraie validation externe des performances de ce score en contexte de chirurgie cardiaque avec CEC, il pourrait être intéressant de l'évaluer dans une population de patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque avec CEC mais provenant de centres indépendants idéalement issus de différents pays. Ce type d'étude est néanmoins complexe en l'absence de données peptidomiques déjà disponibles.

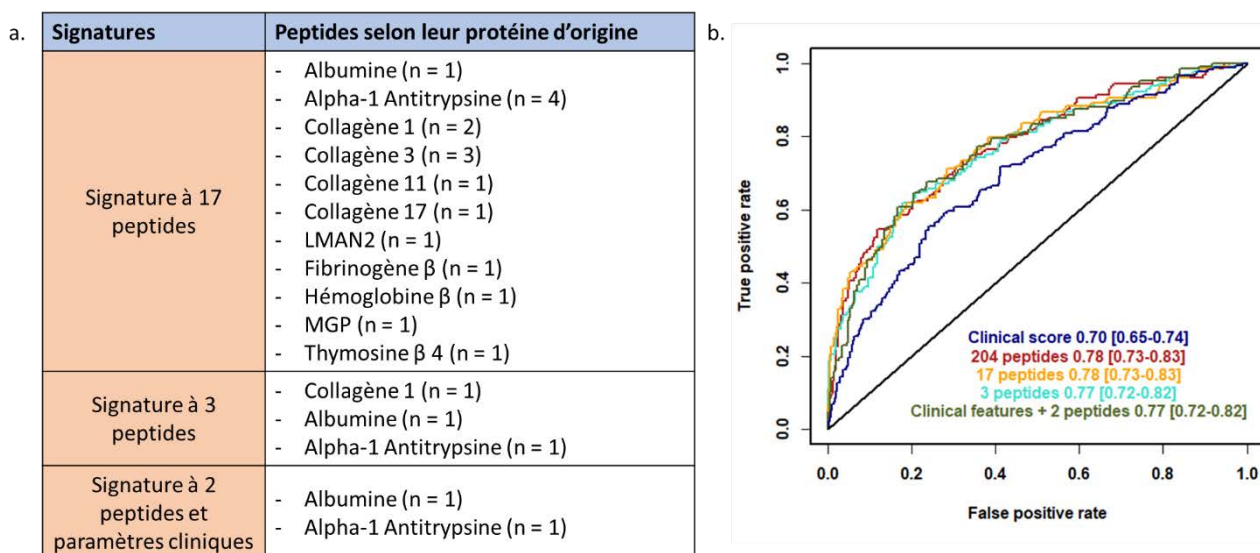
Il serait aussi intéressant de confirmer les performances observées, dans d'autres formes d'IRA et d'autres contextes hors soins intensifs (service d'urgence, médecine traditionnelle). Ces situations représentent une source de difficulté supplémentaire car moins standardisées avec notamment de multiples étiologies aux mécanismes variés, des timings de prise en charge changeants par rapport à l'agression et des terrains très différents et un recueil des urines sur mictions spontanées. De plus, la prévalence de l'IRA dans ces populations étant beaucoup plus faible, elle peut impacter fortement les performances sur certains indicateurs.

#### **b. Une simplification en vue d'une application pratique :**

A termes ces signatures, bien que non transposables immédiatement à la clinique, ouvrent la voie au développement d'outils diagnostiques plus simples (ELISA Multiplexé, Luminex, Aptamères...) multi-marqueurs basés sur le dosage de quelques peptides éventuellement combinés à des données cliniques de routine. Pour cela, une simplification de ces signatures est nécessaire et est permis par la forte corrélation de certains peptides entre eux et avec certaines variables cliniques.

Un travail a déjà été entrepris dans ce sens mais non publié à l'heure actuelle. Via l'utilisation d'un screening par multiples testing (Wilcoxon, Spearman, T-test, SVM-RFE, RF-RFE, Shrunk centroid, Elastic Net...), le set de peptides différentiels séquencés entre les IRA et les non IRA a pu être réduit à une centaine. Puis, pour le réduire encore plus, des approches par recherche incrémentale ont été conduites dans ce set, permettant l'identification de signatures incluant jusqu'à 3 peptides. (**Figure 23a**) Ces signatures offrent des performances non significativement réduites par rapport à la signature complète (**Figure 23b**, AUC 0.77 à

0.78,  $p > 0.7$ ). De même, l'utilisation de signatures optimisées incluant des peptides et des variables cliniques facilement disponibles, offrent des performances similaires malgré la réduction encore plus poussée du nombre de peptides ( $n = 2$ ). (**Figure 23ab**)



**Figure 23 : Signatures peptidiques réduites (a) et leurs performances dans la cohorte de validation (b).**

De telles approches, potentiellement basées à termes sur des techniques simples, ouvrent des perspectives d'utilisation en pratique courante bien plus réalistes que les stratégies non ciblées dans cette indication.

### c. Apport des autres techniques Omics et modèles multiomics :

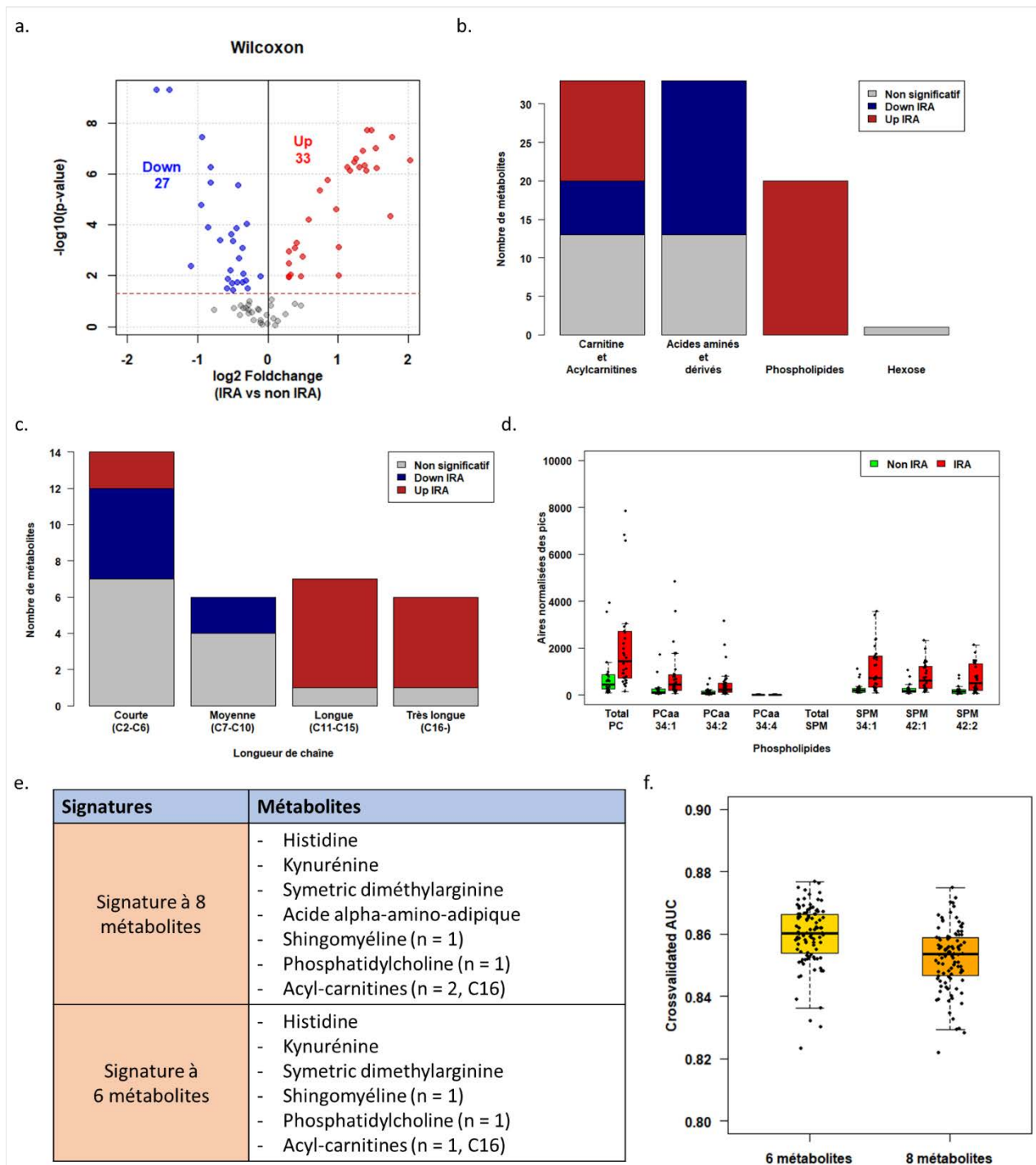
Enfin, des analyses métabolomiques (spectrométrie H1-RMN, LC-MS via le kit Absolute IDQ p180) ont été conduites sur un échantillon cas-témoin extrait de la cohorte de découverte ( $n = 157$ ).

Elles ont permis d'identifier un ensemble de métabolites différemment présents dans les urines de ces patients. (**Figure 24a**) Ces anomalies métabolomiques, biaisées par l'utilisation d'une approche large échelle mais ciblée, portent sur des familles moléculaires variées dont certaines sont cohérentes avec les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'IRA (augmentation des concentrations de phospholipides membranaires en lien avec la présence de débris cellulaires ou un relargage depuis les membranes, une augmentation des acyl-carnitine à chaînes intermédiaires ou longue et une réduction des chaînes courtes témoignant d'un probable blocage de la  $\beta$ -oxydation, augmentation de la kynurénine urinaire en lien avec le blocage de la biosynthèse de novo du tryptophane...). (**Figure 24bc**) Les anomalies métaboliques identifiées

ont pu être partiellement vérifiées (phospholipides) dans un échantillon aléatoire (n = 50, avec stratifié sur l'IRA) issu de la cohorte de validation. **(Figure 24d)** La vérification des autres anomalies est encore en cours (acides aminés et dérivés ; acyl-carnitines).

Ces anomalies, rappelant certaines anomalies décrites<sup>514,643–645</sup>, ont pu être utilisées pour l'élaboration d'une signature. **(Figure 24ef)** Ce score préliminaire présente une limite majeure : l'absence de validation de ses performances sur une cohorte indépendante exposant à une très probable surestimation des performances par overfitting. En effet, l'analyse par LC-MS n'a pas pu être reproduite dans l'échantillon de la cohorte de validation indépendante pour des raisons de coût. Une simple reproduction partielle des résultats a été obtenue mais par une technique ciblée différente, ne permettant pas l'utilisation du modèle en l'état. De fait, les performances de la signature métabolomique ont dû être évaluées sur la cohorte de découverte à l'aide d'une approche par validation croisée répétée. Même si ce type d'approche permet dans une certaine mesure de limiter la part de surestimation associée à la construction du modèle, elle ne la prévient pas complètement, notamment car la boucle de validation croisée n'a pas inclus la sélection des variables. De fait, la participation d'une surestimation, d'ampleur difficilement estimable, est certaine.





**Figure 24 : Anomalies métabolomiques urinaires associées à la survenue d'une IRA.** **a.** Volcanoplot représentant les métabolites urinaires différentiels chez les patients IRA (vs les non IRA) d'après les résultats d'un testing univarié. **b.** Variations des métabolites chez les patients IRA (vs les non IRA) en fonction des familles auxquelles ils appartiennent. **c.** Variations d'abondance chez les patients IRA (vs les non IRA) des acylcarnitines en fonction de la longueur de la chaîne d'acide gras associée. **d.** Validation des anomalies observées sur les principales espèces de phospholipides (phosphatidylcholines et sphingomyélines) dans un échantillon aléatoire issues de la cohorte de validation indépendante. Normalisation effectuée sur la

créatininurie. **e.** Signatures métabolomiques identifiées permettant la discrimination optimale des patients IRA et non IRA. **f.** Performances de ces signatures évaluées par 100x cross-validation.

D'autres analyses métabolomiques ont été conduites utilisant la  $^1\text{H}$ -RMN spectrométrie, avec des résultats moins concluants (**Données non montrées**). En effet, outre une augmentation de certains métabolites après chirurgie avec CEC, peu sont associés à la survenue d'une IRA de manière significative à l'exception de l'acide hippurique et de quelques buckets en cours d'identification.

Outre les nécessaires validations, des analyses sont en cours pour évaluer les possibilités d'une combinaison par bloc des différentes données disponibles (peptidomique, métabolomique, clinique) pour voir si cela permet d'augmenter les performances via ce modèle multimodal.<sup>502</sup>.

Cette partie du projet devrait faire l'objet d'une publication distincte en cas de validation des résultats obtenus.

#### **d. Explorations réellement sans à priori :**

Un problème correspond au fait qu'en l'état actuel des choses, ces analyses omics sont en réalité des approches avec a priori limitant les possibilités de découverte.

Pour la peptidomique, des perspectives d'amélioration sont possibles dans le sens d'une approche moins biaisée. La première méthode correspond à l'utilisation de l'ensemble du jeu de données et non pas restreint aux peptides séquencés. Ainsi la conservation de ces peptides non séquencés permet de mettre en évidence 328 peptides (et non 204) différentiels. Néanmoins l'exploitation de ces résultats au-delà du cadre mathématique est complexe, avec la nécessité d'identifier les peptides et de les séquencer. Cependant ce type d'approche reste limité car il ne permet la quantification que des peptides dont les coordonnées dans le spectre ( $t, m/z$ ) sont connus. Pour aller encore plus loin dans le « sans a priori », une approche par analyse globale du spectre serait intéressante. Vu la masse de données présentes, elle ne peut pas reposer sur une méthodologie statistique traditionnelle. De nouvelles approches, inspirées de la génomique, émergent à l'image des procédures de « peak calling ». Elles permettent d'identifier réellement sans a priori des différences intergroupes au sein du spectre obtenu. Néanmoins ces approches posent d'autres problèmes notamment pour la confirmation et l'identification du peptide à l'origine de ce signal.

Sur le plan de la métabolomique, pour contourner cette limite, nous avons réalisé une analyse métabolomique urinaire sans à priori par  $^1\text{H}$ -RMN-spectrométrie sur le même échantillon case/control issus de AKIOmics 1. Les aires des buckets obtenues par binning haute résolution des spectres normalisés (TSP, propensity quotient) ont ensuite été analysées sans à priori par analyse univariées et multivariées multiples (Wilcoxon ajusté, T-Test ajusté, Spearman ajusté, RF-RFE, SVM-RFE, Shrunken centroid, Elastic Net...).

Malheureusement, seulement un faible nombre de buckets différentiels ont été sélectionnés sur cette base, correspondant presque tous à un même métabolite (acide hippurique). Cette approche certes, sans a priori dans son acquisition se heurte à son manque de sensibilité et aux difficultés d'identification des buckets différentiels ne permettant que d'identifier un nombre très restreint de métabolites dont la signature RMN est connue.

#### **e. Vers une nouvelle classification de l'IRA :**

Une autre perspective intéressante, commune à la plupart des modèles multi-marqueurs, serait l'utilisation des données obtenues dans une perspective descriptive avec à termes l'idée de redéfinir l'IRA.<sup>6,502</sup> En effet, celle-ci ne serait plus définie de manière unidimensionnelle en fonction de l'altération fonctionnelle comme actuellement, mais plutôt comme une entité multi-paramétrique avec plusieurs composantes : l'altération fonctionnelle, l'inflammation intra-rénale, les lésions ou le stress épithélial. Cette classification plus fine du retentissement tissulaire de l'IRA, éventuellement enrichie par les caractéristiques de l'agression et des données sur le terrain, permettrait de définir de nouveaux groupes homogènes de patients<sup>6</sup>. Ces sous-groupes pourraient être ciblées par des traitements différents en fonction des anomalies prédominantes pour s'adapter au profil particulier de chaque individu.

Pour aboutir à la constitution de ces modèles multi-marqueurs, les outils « omics » éventuellement combinés entre-eux et avec les données cliniques font de solides candidats car ils contiennent intrinsèquement cette complexité. Des tentatives préliminaires ont été faites, suivant deux méthodologies, sur la base des données peptidomiques seules, avec des résultats décevants mais qui méritent d'être poussées plus loin.

Une première méthode utilisée a reposé sur une approche sans a priori sur l'ensemble du peptidome analysable. Malheureusement, aussi bien par visualisation simple des résultats issus de différents types de réductions dimensionnelles, que par du clustering non supervisé, cette approche n'a pu identifier des groupes distincts de patients, l'ensemble correspondant à un continuum. **(Données non montrées)**

Une autre méthode a consisté en la sélection de quelques variables reflétant différentes composantes impliquées dans la physiopathologie de l'IRA et permettant la distinction entre les groupes (1 composante inflammatoire, 1 composante épithéliale, 1 composante fibreuse, altération fonctionnelle...). La localisation des individus dans ce nouveau repère pourrait permettre de mieux préciser l'atteinte et ses mécanismes permettant de cibler les traitements sur les anomalies. Dans ce modèle il serait également simple de rajouter des données cliniques (terrain, durée CEC) pour les combiner avec ces données peptidomiques/métabolomiques. Au sein de ce nouveau repère, le découpage de groupe homogène n'est là encore pas évident avec un continuum. **(Données non montrées)**

Dans ces deux méthodes, un forçage de segmentation peut être effectué mais sa pertinence clinique est difficilement justifiable à ce stade, d'autant plus que les clusters identifiables ne sont pas associés à la présence d'une altération fonctionnelle. Un passage par un modèle animal pour constater la corrélation entre la position dans ce nouveau repère et les dégâts tissulaires voire leur réversibilité sous tel ou tel traitement sera nécessaire avant d'aller plus loin dans cette voie.

#### **f. Intégration temporelle et concept de trajectoires :**

Une autre perspective intéressante sera d'introduire une dimension temporelle à ces différentes approches. La bio-banque contenant des échantillons provenant de chaque patient à plusieurs temps (H0-H4-H24), cela permettra, plus que de chercher des anomalies ponctuelles, d'identifier des variations caractéristiques d'une évolution donnée avec des performances attendues supérieures.

#### **g. Vers une médecine prédictive :**

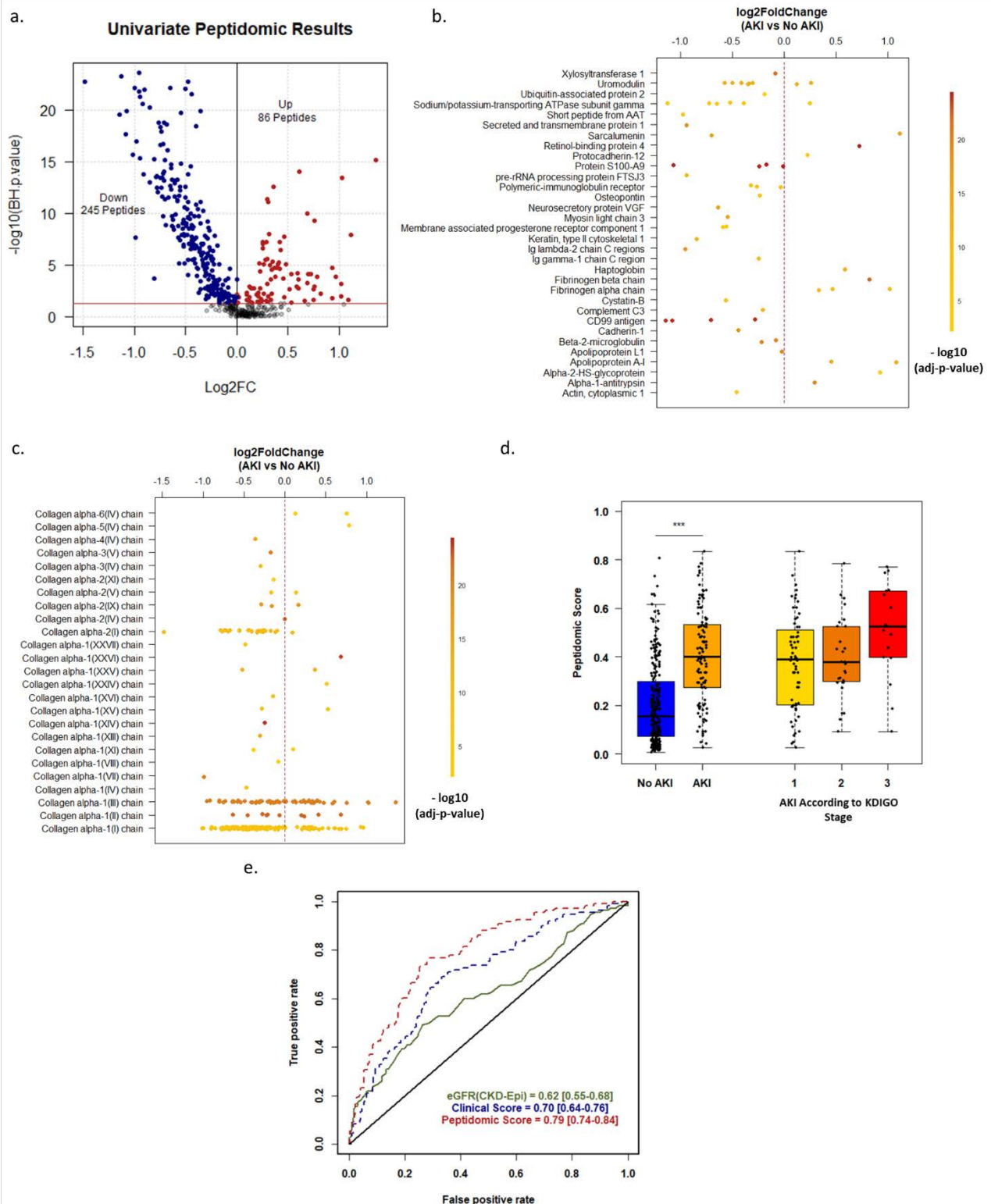
Une autre part de mon travail, non encore publiée, a porté sur l'utilisation de ces mêmes outils, notamment la peptidomique, non pas pour le diagnostic précoce de l'IRA post-agression, mais pour la prédiction préopératoire de l'IRA chez ces mêmes patients. Pour cela nous avons pu analyser le peptidome urinaire de ces mêmes patients, mais sur des prélèvements pré-opératoires. Ainsi nous avons identifié 331 peptides différenciellement abondants en préopératoire chez les patients AKI (86 peptides plus abondants et 245 moins abondants) issus de 57 protéines différentes (32 non collagéniques, 25 collagènes). (**Figure 25abc**) Certains de ces protéines sont connues associées à des facteurs prédisposants impliqués dans la physiopathologie de l'IRA (inflammation, fibrose, souffrance tubulaire...). (**Figure 25bc**)

Leur combinaison en un score, basé sur un modèle Random Forest (ou d'autres modèles : SVM, XgBoost, Neural Net, Elastic Net), permet la prédiction d'une IRA avec de bonnes performances dans un échantillon de validation (splitted validation). (**Figure 25de**) Le set de peptide utilisé peut, là encore, être considérablement réduit sans perte de performance majeure (**Données non montrées**). Des analyses complémentaires de validation sont en cours.

Bien que non aboutit à ce stade, cette application est probablement la plus prometteuse car plus facilement transférable à la pratique clinique, avec une chronologie permettant la mise en œuvre de la CE-MS. A termes, ce type d'outil probablement simplifié, à l'image de ce qui a pu être décrit pour la molécule DKK3<sup>609</sup>, pourrait être utilisé pour mieux évaluer le risque préopératoire d'IRA permettant d'aider à la décision opératoire, d'adapter la prise en charge de l'AKI voire d'identifier des patients à très haut risque pour les inclure dans des protocoles expérimentaux visant à prévenir ce type d'IRA.

Concernant l'apport de la métabolomique dans ce contexte, les mêmes approches ont été menées par approches métabolomiques non ciblées ( $^1\text{H}$ -RMN-Spectrométrie) mais sans parvenir à identifier de différence pertinente signant que les modifications du métabolisme détectables sont principalement postérieures à l'agression (**Données non montrées**).

Ces approches prédictives préopératoires pourront être combinées aux données cliniques (pré ou per-opératoires) ou à d'autres marqueurs (pré ou postopératoires précoces) pour encore tenter d'optimiser les performances.



**Figure 25 : Utilisation de la peptidomique urinaire préopératoire pour la prédiction de la survenue d'une IRA post chirurgie cardiaque.** **a.** Volcanoplot représentant les peptides différentiellement abondant dans les urines pré-opératoires des patients IRA (comparativement aux patients non IRA). **bc.** Dotplot représentant les Fondchange et les pvalues des peptides différentiellement abondants en fonction de leur protéine d'origine. Les peptides non collagéniques (b) et collagénique (c) ont été séparés. **d.** Représentation du score peptidomique obtenu en fonction de la présence ou non d'une AKI et de son stade KDIGO dans la cohorte de validation (splitted validation). **e.** Courbes ROC représentant les performances du score peptidomique (comparativement au DFG préopératoire seul et à un score clinique préopératoire optimisé) dans la cohorte de validation (splitted validation).

#### **h. Un pas vers la thérapeutique :**

Enfin, ces approches pourraient également déboucher sur des applications plus concrètes en recherche thérapeutiques. Ainsi l'identification de signatures métabolomiques ou peptidomiques associées à l'IRA pourrait permettre de guider le développement de thérapeutiques adaptées. Ainsi il est possible de sélectionner des molécules candidates via l'identification de médicaments induisant une signature inverse ou capables de reverser la signature<sup>646-648</sup>. Ce type d'approche nécessite le développement préalable de modèles animaux ou in vitro humanisés, qui pourront servir au screening de ces molécules. Cette perspective correspondait à l'objectif initial de notre étude sur le nicotinamide préalablement détaillée. De nouvelles tentatives seront effectués dans les années à venir.

# Conclusion générale

- L'IRA est un syndrome clinique fréquent et grave représentant un véritable problème de santé publique.
- La physiopathologie de ce syndrome reste mal comprise mais accorde un rôle prépondérant à la dysfonction épithéliale notamment du point de vue de son métabolisme énergétique.
- Le diagnostic de ce syndrome est également difficile et imparfait (tardif, critères fonctionnels seulement) en pratique.
- Nous avons tout d'abord démontré le rôle du facteur de transcription HNF-1 $\beta$  dans la régulation du métabolisme cellulaire. Cette nouvelle fonction le place potentiellement comme un régulateur essentiel de la réponse épithéliale à l'agression et la réparation tissulaire en plus d'apporter une explication à une partie du phénotype des patients porteurs de mutations de son gène.
- Nous avons également confirmé dans une importante cohorte de patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque avec CEC, l'association entre la survenue d'une IRA et la présence de stigmates urinaires d'une dysfonction de la biosynthèse de novo du NAD à partir du tryptophane, un cofacteur métabolique essentiel. Néanmoins la supplémentation en un précurseur alternatif (le nicotinamide) n'a pas permis entre nos mains d'amélioration dans un modèle murin d'IRA par IRI.
- Enfin, nous avons démontré que les patients allant développer une IRA après chirurgie cardiaque avec CEC, présentent des anomalies précoces (H4) de leur métabolome et peptidome urinaire, cohérentes avec certains aspects connus de la physiopathologie de cette affection. Ces anomalies peuvent être utilisées pour en faire le diagnostic avec de bonnes performances. Des travaux sont en cours pour le développement d'outils soit combinant différentes approches, soit rajoutant une dimension temporelle ou encore permettant la prédiction du risque d'IRA avant même la survenue d'une agression.



## Références

1. Thomas, M. E. *et al.* The definition of acute kidney injury and its use in practice. *Kidney Int* **87**, 62–73 (2015).
2. Kellum, J. A., Levin, N., Bouman, C. & Lameire, N. Developing a consensus classification system for acute renal failure. *Curr Opin Crit Care* **8**, 509–514 (2002).
3. Bellomo, R. *et al.* Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* **8**, R204-212 (2004).
4. Mehta, R. L. *et al.* Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* **11**, R31 (2007).
5. Kellum, J. A., Bellomo, R. & Ronco, C. Kidney attack. *JAMA* **307**, 2265–2266 (2012).
6. Kellum, J. A. & Prowle, J. R. Paradigms of acute kidney injury in the intensive care setting. *Nat Rev Nephrol* **14**, 217–230 (2018).
7. Bedford, M., Stevens, P. E., Wheeler, T. W. K. & Farmer, C. K. T. What is the real impact of acute kidney injury? *BMC Nephrol* **15**, 95 (2014).
8. Ronco, C., Bellomo, R. & Kellum, J. A. Acute kidney injury. *Lancet* **394**, 1949–1964 (2019).
9. Annual Data Report. *USRDS* <https://adr.usrds.org/>.
10. Susantitaphong, P. *et al.* World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* **8**, 1482–1493 (2013).
11. Zeng, X., McMahon, G. M., Brunelli, S. M., Bates, D. W. & Waikar, S. S. Incidence, outcomes, and comparisons across definitions of AKI in hospitalized individuals. *Clin J Am Soc Nephrol* **9**, 12–20 (2014).
12. Mehta, R. L. *et al.* International Society of Nephrology’s 0by25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology. *Lancet* **385**, 2616–2643 (2015).

13. Hoste, E. A. J. *et al.* Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* **14**, 607–625 (2018).
14. Swanepoel, C. R., Wearne, N. & Okpechi, I. G. Nephrology in Africa--not yet uhuru. *Nat Rev Nephrol* **9**, 610–622 (2013).
15. Lameire, N. H. *et al.* Acute kidney injury: an increasing global concern. *Lancet* **382**, 170–179 (2013).
16. Comprehensive Clinical Nephrology (5th Edition) - eBook — CST. *CollegeStudentTextBooks* <https://collegestudenttextbook.org/product/comprehensive-clinical-nephrology-5th-edition-ebook/>.
17. Xu, K. *et al.* Unique Transcriptional Programs Identify Subtypes of AKI. *J Am Soc Nephrol* **28**, 1729–1740 (2017).
18. Thongprayoon, C. *et al.* Diagnostics, Risk Factors, Treatment and Outcomes of Acute Kidney Injury in a New Paradigm. *Journal of Clinical Medicine* **9**, 1104 (2020).
19. Kellum, J. A. How can we define recovery after acute kidney injury? Considerations from epidemiology and clinical trial design. *Nephron Clin Pract* **127**, 81–88 (2014).
20. Gameiro, J., Branco, T. & Lopes, J. A. Artificial Intelligence in Acute Kidney Injury Risk Prediction. *J Clin Med* **9**, (2020).
21. Chawla, L. S. *et al.* Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup. *Nat Rev Nephrol* **13**, 241–257 (2017).
22. Duff, S. & Murray, P. T. Defining Early Recovery of Acute Kidney Injury. *Clin J Am Soc Nephrol* **15**, 1358–1360 (2020).
23. Coca, S. G., King, J. T., Rosenthal, R. A., Perkal, M. F. & Parikh, C. R. The duration of postoperative acute kidney injury is an additional parameter predicting long-term survival in diabetic veterans. *Kidney Int* **78**, 926–933 (2010).

24. Husain-Syed, F. *et al.* Persistent decrease of renal functional reserve in patients after cardiac surgery-associated acute kidney injury despite clinical recovery. *Nephrol Dial Transplant* **34**, 308–317 (2019).
25. Legrand, M. & Rossignol, P. Cardiovascular Consequences of Acute Kidney Injury. *N Engl J Med* **382**, 2238–2247 (2020).
26. Grams, M. E. & Rabb, H. The distant organ effects of acute kidney injury. *Kidney Int* **81**, 942–948 (2012).
27. Coca, S. G., Peixoto, A. J., Garg, A. X., Krumholz, H. M. & Parikh, C. R. The prognostic importance of a small acute decrement in kidney function in hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* **50**, 712–720 (2007).
28. Ronco, C., Kellum, J. A. & Haase, M. Subclinical AKI is still AKI. *Crit Care* **16**, 313 (2012).
29. Gameiro, J., Marques, F. & Lopes, J. A. Long-term consequences of acute kidney injury: a narrative review. *Clin Kidney J* **14**, 789–804 (2021).
30. Heung, M. *et al.* Acute Kidney Injury Recovery Pattern and Subsequent Risk of CKD: An Analysis of Veterans Health Administration Data. *Am J Kidney Dis* **67**, 742–752 (2016).
31. Perinel, S. *et al.* Transient and Persistent Acute Kidney Injury and the Risk of Hospital Mortality in Critically Ill Patients: Results of a Multicenter Cohort Study. *Crit Care Med* **43**, e269-275 (2015).
32. Chertow, G. M., Burdick, E., Honour, M., Bonventre, J. V. & Bates, D. W. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol* **16**, 3365–3370 (2005).
33. Coca, S. G., Yusuf, B., Shlipak, M. G., Garg, A. X. & Parikh, C. R. Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* **53**, 961–973 (2009).

34. See, E. J. *et al.* Long-term risk of adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis of cohort studies using consensus definitions of exposure. *Kidney Int* **95**, 160–172 (2019).
35. Lafrance, J.-P. & Miller, D. R. Acute kidney injury associates with increased long-term mortality. *J Am Soc Nephrol* **21**, 345–352 (2010).
36. Wu, V.-C. *et al.* Long-term risk of coronary events after AKI. *J Am Soc Nephrol* **25**, 595–605 (2014).
37. Lee, S. *et al.* Postdischarge long-term cardiovascular outcomes of intensive care unit survivors who developed dialysis-requiring acute kidney injury after cardiac surgery. *J Crit Care* **50**, 92–98 (2019).
38. Bhatraju, P. K. *et al.* Association Between Early Recovery of Kidney Function After Acute Kidney Injury and Long-term Clinical Outcomes. *JAMA Netw Open* **3**, e202682 (2020).
39. Goldberg, A., Kogan, E., Hammerman, H., Markiewicz, W. & Aronson, D. The impact of transient and persistent acute kidney injury on long-term outcomes after acute myocardial infarction. *Kidney Int* **76**, 900–906 (2009).
40. Chawla, L. S. *et al.* Association between AKI and long-term renal and cardiovascular outcomes in United States veterans. *Clin J Am Soc Nephrol* **9**, 448–456 (2014).
41. Ricci, Z., Cruz, D. & Ronco, C. The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int* **73**, 538–546 (2008).
42. Bagshaw, S. M., George, C., Bellomo, R., & ANZICS Database Management Committee. Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation. *Crit Care* **12**, R47 (2008).
43. Hoste, E. A. J. *et al.* Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med* **41**, 1411–1423 (2015).
44. Bucaloiu, I. D., Kirchner, H. L., Norfolk, E. R., Hartle, J. E. & Perkins, R. M. Increased risk of death and de novo chronic kidney disease following reversible acute kidney injury. *Kidney Int* **81**, 477–485 (2012).

45. Korenkevych, D. *et al.* The Pattern of Longitudinal Change in Serum Creatinine and 90-Day Mortality After Major Surgery. *Ann Surg* **263**, 1219–1227 (2016).
46. Bihorac, A. *et al.* Long-term risk of mortality and acute kidney injury during hospitalization after major surgery. *Ann Surg* **249**, 851–858 (2009).
47. He, L. *et al.* AKI on CKD: heightened injury, suppressed repair, and the underlying mechanisms. *Kidney Int* **92**, 1071–1083 (2017).
48. Coca, S. G., Singanamala, S. & Parikh, C. R. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int* **81**, 442–448 (2012).
49. Rangaswamy, D. & Sud, K. Acute kidney injury and disease: Long-term consequences and management. *Nephrology (Carlton)* **23**, 969–980 (2018).
50. Odutayo, A. *et al.* AKI and Long-Term Risk for Cardiovascular Events and Mortality. *J Am Soc Nephrol* **28**, 377–387 (2017).
51. Chawla, L. S., Eggers, P. W., Star, R. A. & Kimmel, P. L. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N Engl J Med* **371**, 58–66 (2014).
52. Askenazi, D. J., Feig, D. I., Graham, N. M., Hui-Stickle, S. & Goldstein, S. L. 3-5 year longitudinal follow-up of pediatric patients after acute renal failure. *Kidney Int* **69**, 184–189 (2006).
53. Hsu, C. *et al.* Elevated BP after AKI. *J Am Soc Nephrol* **27**, 914–923 (2016).
54. Tangren, J. S. *et al.* Pregnancy Outcomes after Clinical Recovery from AKI. *J Am Soc Nephrol* **28**, 1566–1574 (2017).
55. Basile, D. P., Anderson, M. D. & Sutton, T. A. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol* **2**, 1303–1353 (2012).
56. Devarajan, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* **17**, 1503–1520 (2006).
57. Ow, C. P. C., Ngo, J. P., Ullah, M. M., Hilliard, L. M. & Evans, R. G. Renal hypoxia in kidney disease: Cause or consequence? *Acta Physiol (Oxf)* **222**, e12999 (2018).

58. Bonventre, J. V. & Yang, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* **121**, 4210–4221 (2011).
59. Bridoux, F. *et al.* Kidney injury and disease in patients with haematological malignancies. *Nat Rev Nephrol* **17**, 386–401 (2021).
60. Cabral, B. M. I., Edding, S. N., Portocarrero, J. P. & Lerma, E. V. Rhabdomyolysis. *Dis Mon* **66**, 101015 (2020).
61. O’Neal, J. B., Shaw, A. D. & Billings, F. T. Acute kidney injury following cardiac surgery: current understanding and future directions. *Crit Care* **20**, 187 (2016).
62. Wang, Y. & Bellomo, R. Cardiac surgery-associated acute kidney injury: risk factors, pathophysiology and treatment. *Nat Rev Nephrol* **13**, 697–711 (2017).
63. Poston, J. T. & Koyner, J. L. Sepsis associated acute kidney injury. *BMJ* **364**, k4891 (2019).
64. Evans, R. G., Smith, D. W., Lee, C.-J., Ngo, J. P. & Gardiner, B. S. What Makes the Kidney Susceptible to Hypoxia? *Anat Rec (Hoboken)* **303**, 2544–2552 (2020).
65. Yamamoto, T. *et al.* Intravital videomicroscopy of peritubular capillaries in renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F1150–1155 (2002).
66. Sutton, T. A. *et al.* Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, F191–198 (2003).
67. Brodsky, S. V. *et al.* Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F1140–1149 (2002).
68. Roelofs, J. J. T. H. *et al.* Tissue-type plasminogen activator modulates inflammatory responses and renal function in ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* **17**, 131–140 (2006).
69. Bhargava, P. & Schnellmann, R. G. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol* **13**, 629–646 (2017).
70. Wirthensohn, G. & Guder, W. G. Renal substrate metabolism. *Physiol Rev* **66**, 469–497 (1986).

71. Evans, R. G., Harrop, G. K., Ngo, J. P., Ow, C. P. C. & O'Connor, P. M. Basal renal O<sub>2</sub> consumption and the efficiency of O<sub>2</sub> utilization for Na<sup>+</sup> reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol* **306**, F551-560 (2014).
72. Aukland, K. & Krog, J. Renal oxygen tension. *Nature* **188**, 671 (1960).
73. Brezis, M., Heyman, S. N. & Epstein, F. H. Determinants of intrarenal oxygenation. II. Hemodynamic effects. *Am J Physiol* **267**, F1063-1068 (1994).
74. Ngo, J. P. *et al.* Diffusive shunting of gases and other molecules in the renal vasculature: physiological and evolutionary significance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **311**, R797–R810 (2016).
75. Fry, B. C., Edwards, A., Sgouralis, I. & Layton, A. T. Impact of renal medullary three-dimensional architecture on oxygen transport. *Am J Physiol Renal Physiol* **307**, F263-272 (2014).
76. Thomson, S. C. & Blantz, R. C. Glomerulotubular balance, tubuloglomerular feedback, and salt homeostasis. *J Am Soc Nephrol* **19**, 2272–2275 (2008).
77. Darby, P. J. *et al.* Anemia increases the risk of renal cortical and medullary hypoxia during cardiopulmonary bypass. *Perfusion* **28**, 504–511 (2013).
78. Patel, N. N. *et al.* Reversal of anemia with allogenic RBC transfusion prevents post-cardiopulmonary bypass acute kidney injury in swine. *Am J Physiol Renal Physiol* **301**, F605-614 (2011).
79. Habib, R. H. *et al.* Role of hemodilutional anemia and transfusion during cardiopulmonary bypass in renal injury after coronary revascularization: implications on operative outcome. *Crit Care Med* **33**, 1749–1756 (2005).
80. Afsar, B. *et al.* Capillary rarefaction from the kidney point of view. *Clin Kidney J* **11**, 295–301 (2018).
81. Bábíčková, J. *et al.* Regardless of etiology, progressive renal disease causes ultrastructural and functional alterations of peritubular capillaries. *Kidney Int* **91**, 70–85 (2017).

82. Petejova, N. *et al.* Acute Kidney Injury in Septic Patients Treated by Selected Nephrotoxic Antibiotic Agents-Pathophysiology and Biomarkers-A Review. *Int J Mol Sci* **21**, E7115 (2020).
83. McCullough, P. A. *et al.* Contrast-Induced Acute Kidney Injury. *J Am Coll Cardiol* **68**, 1465–1473 (2016).
84. Bosch, X., Poch, E. & Grau, J. M. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *N Engl J Med* **361**, 62–72 (2009).
85. Sanders, P. W. Mechanisms of Light Chain Injury along the Tubular Nephron. *JASN* **23**, 1777–1781 (2012).
86. Arimura, Y. *et al.* Mitochondrial superoxide production contributes to vancomycin-induced renal tubular cell apoptosis. *Free Radic Biol Med* **52**, 1865–1873 (2012).
87. Sakamoto, Y. *et al.* Vancomycin induces reactive oxygen species-dependent apoptosis via mitochondrial cardiolipin peroxidation in renal tubular epithelial cells. *Eur J Pharmacol* **800**, 48–56 (2017).
88. Rabb, H. *et al.* Inflammation in AKI: Current Understanding, Key Questions, and Knowledge Gaps. *J Am Soc Nephrol* **27**, 371–379 (2016).
89. Molitoris, B. A. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis. *J Clin Invest* **124**, 2355–2363 (2014).
90. Linkermann, A. *et al.* Regulated cell death in AKI. *J Am Soc Nephrol* **25**, 2689–2701 (2014).
91. Kelly, K. J. *et al.* Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest* **97**, 1056–1063 (1996).
92. Belliere, J. *et al.* Specific macrophage subtypes influence the progression of rhabdomyolysis-induced kidney injury. *J Am Soc Nephrol* **26**, 1363–1377 (2015).
93. Ferenbach, D. A. *et al.* Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int* **82**, 928–933 (2012).



94. Yokota, N., Daniels, F., Crosson, J. & Rabb, H. Protective effect of T cell depletion in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* **74**, 759–763 (2002).
95. Ysebaert, D. K. *et al.* T cells as mediators in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* **66**, 491–496 (2004).
96. Burne-Taney, M. J. *et al.* B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol* **171**, 3210–3215 (2003).
97. Zhang, Z.-X. *et al.* NK cells induce apoptosis in tubular epithelial cells and contribute to renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* **181**, 7489–7498 (2008).
98. Gaut, J. P. & Liapis, H. Acute kidney injury pathology and pathophysiology: a retrospective review. *Clin Kidney J* **14**, 526–536 (2021).
99. Mulay, S. R. & Anders, H.-J. Crystal nephropathies: mechanisms of crystal-induced kidney injury. *Nat Rev Nephrol* **13**, 226–240 (2017).
100. Venkatachalam, M. A., Bernard, D. B., Donohoe, J. F. & Levinsky, N. G. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: differences among the S1, S2, and S3 segments. *Kidney Int* **14**, 31–49 (1978).
101. Desrochers, T. M., Palma, E. & Kaplan, D. L. Tissue-engineered kidney disease models. *Adv Drug Deliv Rev* **69–70**, 67–80 (2014).
102. Shiva, N., Sharma, N., Kulkarni, Y. A., Mulay, S. R. & Gaikwad, A. B. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models. *Life Sci* **256**, 117860 (2020).
103. Lieberthal, W. & Nigam, S. K. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F1–F12 (2000).
104. Khundmiri, S. J., Chen, L., Lederer, E. D., Yang, C.-R. & Knepper, M. A. Transcriptomes of Major Proximal Tubule Cell Culture Models. *J Am Soc Nephrol* **32**, 86–97 (2021).
105. Little, M. H. Generating kidney tissue from pluripotent stem cells. *Cell Death Discov* **2**, 16053 (2016).

106. Singh, A. P. *et al.* Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep* **64**, 31–44 (2012).
107. Bellomo, R., Kellum, J. A. & Ronco, C. Acute kidney injury. *Lancet* **380**, 756–766 (2012).
108. Olson, H. *et al.* Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* **32**, 56–67 (2000).
109. Knight, A. Systematic reviews of animal experiments demonstrate poor contributions toward human healthcare. *Rev Recent Clin Trials* **3**, 89–96 (2008).
110. Stafford-Smith, M. *et al.* Association of genetic polymorphisms with risk of renal injury after coronary bypass graft surgery. *Am J Kidney Dis* **45**, 519–530 (2005).
111. Vallon, V. Tubular Transport in Acute Kidney Injury: Relevance for Diagnosis, Prognosis and Intervention. *Nephron* **134**, 160–166 (2016).
112. Emlet, D. R., Shaw, A. D. & Kellum, J. A. Sepsis-associated AKI: epithelial cell dysfunction. *Semin Nephrol* **35**, 85–95 (2015).
113. Chevalier, R. L. The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction. *Am J Physiol Renal Physiol* **311**, F145–161 (2016).
114. Emma, F., Montini, G., Parikh, S. M. & Salviati, L. Mitochondrial dysfunction in inherited renal disease and acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* **12**, 267–280 (2016).
115. Schaub, J. A., Venkatachalam, M. A. & Weinberg, J. M. Proximal Tubular Oxidative Metabolism in Acute Kidney Injury and the Transition to CKD. *Kidney360* **2**, 355–364 (2021).
116. Bernhardt, W. M. *et al.* Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogenic kidney transplant model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21276–21281 (2009).
117. Bernhardt, W. M. *et al.* Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **17**, 1970–1978 (2006).
118. Tran, M. *et al.* PGC-1 $\alpha$  promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice. *J Clin Invest* **121**, 4003–4014 (2011).

119. Lan, R. *et al.* Mitochondrial Pathology and Glycolytic Shift during Proximal Tubule Atrophy after Ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol* **27**, 3356–3367 (2016).
120. Déry, M.-A. C., Michaud, M. D. & Richard, D. E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 535–540 (2005).
121. Fontecha-Barriuso, M. *et al.* The Role of PGC-1 $\alpha$  and Mitochondrial Biogenesis in Kidney Diseases. *Biomolecules* **10**, E347 (2020).
122. Ruiz-Andres, O. *et al.* The inflammatory cytokine TWEAK decreases PGC-1 $\alpha$  expression and mitochondrial function in acute kidney injury. *Kidney Int* **89**, 399–410 (2016).
123. Bastin, J., Cambon, N., Thompson, M., Lowry, O. H. & Burch, H. B. Change in energy reserves in different segments of the nephron during brief ischemia. *Kidney Int* **31**, 1239–1247 (1987).
124. Guder, W. G. & Ross, B. D. Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int* **26**, 101–111 (1984).
125. Colegio, O. R. *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* **513**, 559–563 (2014).
126. Wanet, A., Arnould, T., Najimi, M. & Renard, P. Connecting Mitochondria, Metabolism, and Stem Cell Fate. *Stem Cells Dev* **24**, 1957–1971 (2015).
127. Rudman-Melnick, V. *et al.* Single-Cell Profiling of AKI in a Murine Model Reveals Novel Transcriptional Signatures, Profibrotic Phenotype, and Epithelial-to-Stromal Crosstalk. *J Am Soc Nephrol* **31**, 2793–2814 (2020).
128. Takaori, K. *et al.* Severity and Frequency of Proximal Tubule Injury Determines Renal Prognosis. *J Am Soc Nephrol* **27**, 2393–2406 (2016).
129. Faguer, S. *et al.* Hnf-1 $\beta$  transcription factor is an early hif-1 $\alpha$ -independent marker of epithelial hypoxia and controls renal repair. *PLoS One* **8**, e63585 (2013).
130. Molitoris, B. A. Ischemia-induced loss of epithelial polarity: potential role of the actin cytoskeleton. *Am J Physiol* **260**, F769-778 (1991).

131. Molitoris, B. A., Falk, S. A. & Dahl, R. H. Ischemia-induced loss of epithelial polarity. Role of the tight junction. *J Clin Invest* **84**, 1334–1339 (1989).
132. Kieran, N. E. *et al.* Modification of the transcriptomic response to renal ischemia/reperfusion injury by lipoxin analog. *Kidney Int* **64**, 480–492 (2003).
133. Eadon, M. T. *et al.* Endotoxemia alters tight junction gene and protein expression in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **303**, F821–830 (2012).
134. Ichimura, T. *et al.* Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* **273**, 4135–4142 (1998).
135. Waanders, F., van Timmeren, M. M., Stegeman, C. A., Bakker, S. J. L. & van Goor, H. Kidney injury molecule-1 in renal disease. *J Pathol* **220**, 7–16 (2010).
136. Wang, Y. *et al.* IRF-1 promotes inflammation early after ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1544–1555 (2009).
137. Moonen, L., D’Haese, P. C. & Vervaeke, B. A. Epithelial Cell Cycle Behaviour in the Injured Kidney. *Int J Mol Sci* **19**, E2038 (2018).
138. Harashima, H., Dissmeyer, N. & Schnittger, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol* **23**, 345–356 (2013).
139. DiRocco, D. P. *et al.* CDK4/6 inhibition induces epithelial cell cycle arrest and ameliorates acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **306**, F379–388 (2014).
140. Megyesi, J., Andrade, L., Vieira, J. M., Safirstein, R. L. & Price, P. M. Positive effect of the induction of p21WAF1/CIP1 on the course of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* **60**, 2164–2172 (2001).
141. Price, P. M., Safirstein, R. L. & Megyesi, J. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F378–384 (2004).
142. Price, P. M. *et al.* Dependence of cisplatin-induced cell death in vitro and in vivo on cyclin-dependent kinase 2. *J Am Soc Nephrol* **17**, 2434–2442 (2006).

143. Pabla, N. *et al.* Mitigation of acute kidney injury by cell-cycle inhibitors that suppress both CDK4/6 and OCT2 functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 5231–5236 (2015).
144. Yang, L., Besschetnova, T. Y., Brooks, C. R., Shah, J. V. & Bonventre, J. V. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med* **16**, 535–543, 1p following 143 (2010).
145. Pérez-Garijo, A. & Steller, H. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development* **142**, 3253–3262 (2015).
146. Yu, P. *et al.* Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 128 (2021).
147. Havasi, A. & Borkan, S. C. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney Int* **80**, 29–40 (2011).
148. Martin-Sanchez, D. *et al.* TWEAK and RIPK1 mediate a second wave of cell death during AKI. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 4182–4187 (2018).
149. Anders, H.-J. Necroptosis in Acute Kidney Injury. *Nephron* **139**, 342–348 (2018).
150. Tammaro, A., Kers, J., Scantlebery, A. M. L. & Florquin, S. Metabolic Flexibility and Innate Immunity in Renal Ischemia Reperfusion Injury: The Fine Balance Between Adaptive Repair and Tissue Degeneration. *Front Immunol* **11**, 1346 (2020).
151. Bergmann, A. & Steller, H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal* **3**, re8 (2010).
152. Bertheloot, D., Latz, E. & Franklin, B. S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol* **18**, 1106–1121 (2021).
153. Singh, R., Letai, A. & Sarosiek, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 175–193 (2019).
154. Wang, Z. *et al.* GSK3 $\beta$  promotes apoptosis after renal ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* **21**, 284–294 (2010).
155. Hu, Z. *et al.* Emerging Role of Ferroptosis in Acute Kidney Injury. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, 8010614 (2019).

156. Belavgeni, A., Meyer, C., Stumpf, J., Hugo, C. & Linkermann, A. Ferroptosis and Necroptosis in the Kidney. *Cell Chem Biol* **27**, 448–462 (2020).
157. Miao, N. *et al.* The cleavage of gasdermin D by caspase-11 promotes tubular epithelial cell pyroptosis and urinary IL-18 excretion in acute kidney injury. *Kidney Int* **96**, 1105–1120 (2019).
158. Xia, W. *et al.* Gasdermin E deficiency attenuates acute kidney injury by inhibiting pyroptosis and inflammation. *Cell Death Dis* **12**, 139 (2021).
159. Zhang, Z. *et al.* Caspase-11-mediated tubular epithelial pyroptosis underlies contrast-induced acute kidney injury. *Cell Death Dis* **9**, 983 (2018).
160. Wang, Y. *et al.* TNF- $\alpha$ /HMGB1 inflammation signalling pathway regulates pyroptosis during liver failure and acute kidney injury. *Cell Prolif* **53**, e12829 (2020).
161. Ye, Z. *et al.* Caspase-11 Mediates Pyroptosis of Tubular Epithelial Cells and Septic Acute Kidney Injury. *Kidney Blood Press Res* **44**, 465–478 (2019).
162. Yang, J.-R. *et al.* Ischemia-reperfusion induces renal tubule pyroptosis via the CHOP-caspase-11 pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* **306**, F75-84 (2014).
163. Blantz, R. C. & Singh, P. Analysis of the prerenal contributions to acute kidney injury. *Contrib Nephrol* **174**, 4–11 (2011).
164. Singh, P. & Okusa, M. D. The role of tubuloglomerular feedback in the pathogenesis of acute kidney injury. *Contrib Nephrol* **174**, 12–21 (2011).
165. Sharma, A., Mucino, M. J. & Ronco, C. Renal functional reserve and renal recovery after acute kidney injury. *Nephron Clin Pract* **127**, 94–100 (2014).
166. Ronco, C., Bellomo, R. & Kellum, J. Understanding renal functional reserve. *Intensive Care Med* **43**, 917–920 (2017).
167. Bosch, J. P. *et al.* Renal functional reserve in humans. Effect of protein intake on glomerular filtration rate. *Am J Med* **75**, 943–950 (1983).

168. Ronco, C. *et al.* Renal functional reserve in pregnancy. *Nephrol Dial Transplant* **3**, 157–161 (1988).
169. Figurek, A., Luyckx, V. A. & Mueller, T. F. A Systematic Review of Renal Functional Reserve in Adult Living Kidney Donors. *Kidney Int Rep* **5**, 448–458 (2020).
170. KAMINA, P. *Anatomie clinique. Tome 2 : Tête, cou, dos.* (Maloine, 2006).
171. Guénard, H. Physiologie humaine. [https://www.jle.com/fr/ouvrages/e-docs/physiologie\\_humaine\\_300949/ouvrage.phtml](https://www.jle.com/fr/ouvrages/e-docs/physiologie_humaine_300949/ouvrage.phtml).
172. Woods, L. L. Mechanisms of renal hemodynamic regulation in response to protein feeding. *Kidney Int* **44**, 659–675 (1993).
173. ter Wee, P. M., Rosman, J. B., van der Geest, S., Sluiter, W. J. & Donker, A. J. Renal hemodynamics during separate and combined infusion of amino acids and dopamine. *Kidney Int* **29**, 870–874 (1986).
174. Samoni, S. *et al.* Intra-Parenchymal Renal Resistive Index Variation (IRRIV) Describes Renal Functional Reserve (RFR): Pilot Study in Healthy Volunteers. *Front Physiol* **7**, 286 (2016).
175. Fliser, D., Zeier, M., Nowack, R. & Ritz, E. Renal functional reserve in healthy elderly subjects. *J Am Soc Nephrol* **3**, 1371–1377 (1993).
176. Rook, M. *et al.* Predictive capacity of pre-donation GFR and renal reserve capacity for donor renal function after living kidney donation. *Am J Transplant* **6**, 1653–1659 (2006).
177. van Londen, M. *et al.* Renal functional reserve capacity before and after living kidney donation. *Am J Physiol Renal Physiol* **315**, F1550–F1554 (2018).
178. Barai, S., Gambhir, S., Prasad, N., Sharma, R. K. & Ora, M. Functional renal reserve capacity in different stages of chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* **15**, 350–353 (2010).
179. Grgic, I. *et al.* Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney Int* **82**, 172–183 (2012).

180. Basile, D. P., Zeng, P., Friedrich, J. L., Leonard, E. C. & Yoder, M. C. Low proliferative potential and impaired angiogenesis of cultured rat kidney endothelial cells. *Microcirculation* **19**, 598–609 (2012).
181. Basile, D. P. *et al.* Progression after AKI: Understanding Maladaptive Repair Processes to Predict and Identify Therapeutic Treatments. *J Am Soc Nephrol* **27**, 687–697 (2016).
182. Kang, H. M. *et al.* Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med* **21**, 37–46 (2015).
183. Humphreys, B. D. *et al.* Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell* **2**, 284–291 (2008).
184. Berger, K. *et al.* Origin of regenerating tubular cells after acute kidney injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 1533–1538 (2014).
185. Kramann, R., Kusaba, T. & Humphreys, B. D. Who regenerates the kidney tubule? *Nephrol Dial Transplant* **30**, 903–910 (2015).
186. Brilli Skvarca, L. *et al.* Enhancing regeneration after acute kidney injury by promoting cellular dedifferentiation in zebrafish. *Dis Model Mech* **12**, dmm037390 (2019).
187. Coelho, S., Cabral, G., Lopes, J. A. & Jacinto, A. Renal regeneration after acute kidney injury. *Nephrology (Carlton)* **23**, 805–814 (2018).
188. Fiorentino, M., Grandaliano, G., Gesualdo, L. & Castellano, G. Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition. *Contrib Nephrol* **193**, 45–54 (2018).
189. Funk, J. A. & Schnellmann, R. G. Persistent disruption of mitochondrial homeostasis after acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **302**, F853–864 (2012).
190. Canaud, G. *et al.* Cyclin G1 and TASCc regulate kidney epithelial cell G2-M arrest and fibrotic maladaptive repair. *Sci Transl Med* **11**, eaav4754 (2019).
191. Luo, C. *et al.* Wnt9a Promotes Renal Fibrosis by Accelerating Cellular Senescence in Tubular Epithelial Cells. *J Am Soc Nephrol* **29**, 1238–1256 (2018).



192. Kim, M.-G. *et al.* The Role of M2 Macrophages in the Progression of Chronic Kidney Disease following Acute Kidney Injury. *PLoS One* **10**, e0143961 (2015).
193. Yang, Q. *et al.* Bone marrow-derived Ly6C- macrophages promote ischemia-induced chronic kidney disease. *Cell Death Dis* **10**, 291 (2019).
194. Humphreys, B. D. *et al.* Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* **176**, 85–97 (2010).
195. Kuppe, C. *et al.* Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis. *Nature* **589**, 281–286 (2021).
196. Gu, Y.-Y., Liu, X.-S., Huang, X.-R., Yu, X.-Q. & Lan, H.-Y. Diverse Role of TGF- $\beta$  in Kidney Disease. *Front Cell Dev Biol* **8**, 123 (2020).
197. Meng, X.-M., Nikolic-Paterson, D. J. & Lan, H. Y. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* **12**, 325–338 (2016).
198. Basile, D. P. *et al.* Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **300**, F721-733 (2011).
199. Rey-Campos, J., Chouard, T., Yaniv, M. & Cereghini, S. vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *EMBO J* **10**, 1445–1457 (1991).
200. Igarashi, P., Shao, X., McNally, B. T. & Hiesberger, T. Roles of HNF-1 $\beta$  in kidney development and congenital cystic diseases. *Kidney Int* **68**, 1944–1947 (2005).
201. Hnf1b MGI Mouse Gene Detail - MGI:98505 - HNF1 homeobox B.  
<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:98505>.
202. GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search. <https://www.genecards.org/>.
203. Baumhueter, S., Courtois, G. & Crabtree, G. R. A variant nuclear protein in dedifferentiated hepatoma cells binds to the same functional sequences in the beta fibrinogen gene promoter as HNF-1. *EMBO J* **7**, 2485–2493 (1988).

204. Bürglin, T. R. & Affolter, M. Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma* **125**, 497–521 (2016).
205. Cereghini, S., Ott, M. O., Power, S. & Maury, M. Expression patterns of vHNF1 and HNF1 homeoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles. *Development* **116**, 783–797 (1992).
206. Coffinier, C., Thépot, D., Babinet, C., Yaniv, M. & Barra, J. Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development* **126**, 4785–4794 (1999).
207. Coffinier, C., Barra, J., Babinet, C. & Yaniv, M. Expression of the vHNF1/HNF1beta homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mech Dev* **89**, 211–213 (1999).
208. Nie, C., Wang, B., Wang, B., Lv, N. & Zhang, E. Integrative Analysis of HNF1B mRNA in Human Cancers Based on Data Mining. *Int J Med Sci* **17**, 2895–2904 (2020).
209. Liu, Y., Kanyomse, Q. & Xie, Y. Tumor-suppressive activity of Hnf1 $\beta$  in Wilms' tumor. *Biosci Biotechnol Biochem* **83**, 2008–2015 (2019).
210. Okamoto, T. *et al.* Hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ ) promotes glucose uptake and glycolytic activity in ovarian clear cell carcinoma. *Mol Carcinog* **54**, 35–49 (2015).
211. Bártů, M. *et al.* The Role of HNF1B in Tumorigenesis of Solid Tumours: a Review of Current Knowledge. *Folia Biol (Praha)* **64**, 71–83 (2018).
212. Quilichini, E. *et al.* Pancreatic Ductal Deletion of Hnf1b Disrupts Exocrine Homeostasis, Leads to Pancreatitis, and Facilitates Tumorigenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **8**, 487–511 (2019).
213. Yamaguchi, K. *et al.* Identification of an ovarian clear cell carcinoma gene signature that reflects inherent disease biology and the carcinogenic processes. *Oncogene* **29**, 1741–1752 (2010).
214. Casemayou, A. *et al.* Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$  Controls Mitochondrial Respiration in Renal Tubular Cells. *J Am Soc Nephrol* **28**, 3205–3217 (2017).

215. Hajarnis, S. S. *et al.* Transcription Factor Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ ) Regulates MicroRNA-200 Expression through a Long Noncoding RNA. *J Biol Chem* **290**, 24793–24805 (2015).
216. Hiesberger, T. *et al.* Role of the hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) C-terminal domain in Pkhd1 (ARPKD) gene transcription and renal cystogenesis. *J Biol Chem* **280**, 10578–10586 (2005).
217. Ma, Z. *et al.* Mutations of HNF-1beta inhibit epithelial morphogenesis through dysregulation of SOCS-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20386–20391 (2007).
218. Mann, R. S., Lelli, K. M. & Joshi, R. Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators. *Curr Top Dev Biol* **88**, 63–101 (2009).
219. Bai, Y., Pontoglio, M., Hiesberger, T., Sinclair, A. M. & Igarashi, P. Regulation of kidney-specific Ksp-cadherin gene promoter by hepatocyte nuclear factor-1beta. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**, F839–851 (2002).
220. Aboudehen, K. *et al.* Transcription Factor Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$  Regulates Renal Cholesterol Metabolism. *J Am Soc Nephrol* **27**, 2408–2421 (2016).
221. Chan, S. C. *et al.* Mechanism of Fibrosis in HNF1B-Related Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* **29**, 2493–2509 (2018).
222. Verdeguer, F. *et al.* A mitotic transcriptional switch in polycystic kidney disease. *Nat Med* **16**, 106–110 (2010).
223. Lerner, J. *et al.* Human mutations affect the epigenetic/bookmarking function of HNF1B. *Nucleic Acids Res* **44**, 8097–8111 (2016).
224. Zaidi, S. K. *et al.* Mitotic bookmarking of genes: a novel dimension to epigenetic control. *Nat Rev Genet* **11**, 583–589 (2010).
225. Lokmane, L., Heliot, C., Garcia-Villalba, P., Fabre, M. & Cereghini, S. vHNF1 functions in distinct regulatory circuits to control ureteric bud branching and early nephrogenesis. *Development* **137**, 347–357 (2010).

226. Gresh, L. *et al.* A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J* **23**, 1657–1668 (2004).
227. Haumaitre, C. *et al.* Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *PNAS* **102**, 1490–1495 (2005).
228. De Vas, M. G. *et al.* Hnf1b controls pancreas morphogenesis and the generation of Ngn3+ endocrine progenitors. *Development* **142**, 871–882 (2015).
229. Adalat, S. *et al.* HNF1B mutations associate with hypomagnesemia and renal magnesium wasting. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1123–1131 (2009).
230. Adalat, S. *et al.* HNF1B Mutations Are Associated With a Gitelman-like Tubulopathy That Develops During Childhood. *Kidney Int Rep* **4**, 1304–1311 (2019).
231. Aboudehen, K. *et al.* Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$  Regulates Urinary Concentration and Response to Hypertonicity. *J Am Soc Nephrol* **28**, 2887–2900 (2017).
232. Clissold, R. L., Hamilton, A. J., Hattersley, A. T., Ellard, S. & Bingham, C. HNF1B-associated renal and extra-renal disease-an expanding clinical spectrum. *Nat Rev Nephrol* **11**, 102–112 (2015).
233. DualGreg. HNF1b. *Orkid* <https://www.filiereorkid.com/hnf1b/> (2016).
234. Emma, F., Bertini, E., Salviati, L. & Montini, G. Renal involvement in mitochondrial cytopathies. *Pediatr Nephrol* **27**, 539–550 (2012).
235. Decramer, S. *et al.* Anomalies of the TCF2 gene are the main cause of fetal bilateral hyperechogenic kidneys. *J Am Soc Nephrol* **18**, 923–933 (2007).
236. Faguer, S. *et al.* Diagnosis, management, and prognosis of HNF1B nephropathy in adulthood. *Kidney Int* **80**, 768–776 (2011).
237. Edghill, E. L. *et al.* Hepatocyte nuclear factor-1beta gene deletions--a common cause of renal disease. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 627–635 (2008).
238. Ulinski, T. *et al.* Renal phenotypes related to hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) mutations in a pediatric cohort. *J Am Soc Nephrol* **17**, 497–503 (2006).

239. Heidet, L. *et al.* Spectrum of HNF1B mutations in a large cohort of patients who harbor renal diseases. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 1079–1090 (2010).
240. Nagano, C. *et al.* Clinical characteristics of HNF1B-related disorders in a Japanese population. *Clin Exp Nephrol* **23**, 1119–1129 (2019).
241. Okorn, C. *et al.* HNF1B nephropathy has a slow-progressive phenotype in childhood—with the exception of very early onset cases: results of the German Multicenter HNF1B Childhood Registry. *Pediatr Nephrol* **34**, 1065–1075 (2019).
242. Kołbuc, M. *et al.* Hypomagnesemia is underestimated in children with HNF1B mutations. *Pediatr Nephrol* **35**, 1877–1886 (2020).
243. Sun, M. *et al.* HNF1B Loss Exacerbates the Development of Chromophobe Renal Cell Carcinomas. *Cancer Res* **77**, 5313–5326 (2017).
244. Mefford, H. C. *et al.* Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy. *Am J Hum Genet* **81**, 1057–1069 (2007).
245. Dubois-Laforgue, D. *et al.* Diabetes, Associated Clinical Spectrum, Long-term Prognosis, and Genotype/Phenotype Correlations in 201 Adult Patients With Hepatocyte Nuclear Factor 1B (HNF1B) Molecular Defects. *Diabetes Care* **40**, 1436–1443 (2017).
246. Dubois-Laforgue, D. *et al.* Response to Comment on Dubois-Laforgue *et al.* Diabetes, Associated Clinical Spectrum, Long-term Prognosis, and Genotype/Phenotype Correlations in 201 Adult Patients With Hepatocyte Nuclear Factor 1B (HNF1B) Molecular Defects. *Diabetes Care* 2017;40:1436-1443. *Diabetes Care* **41**, e8–e9 (2018).
247. Hao, J. *et al.* MicroRNA-375 Is Induced in Cisplatin Nephrotoxicity to Repress Hepatocyte Nuclear Factor 1- $\beta$ . *J Biol Chem* **292**, 4571–4582 (2017).
248. Ogata, K. *et al.* Upregulation of HNF-1 $\beta$  during experimental acute kidney injury plays a crucial role in renal tubule regeneration. *Am J Physiol Renal Physiol* **303**, F689-699 (2012).

249. Xing, Y. *et al.* Chromatin accessibility of kidney tubular cells under stress reveals key transcription factor mediating acute and chronic kidney disease. *FEBS J* (2021) doi:10.1111/febs.15818.
250. Zhang, Y. *et al.* Inhibition of hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$  contributes to cisplatin nephrotoxicity via regulation of nf- $\kappa$ b pathway. *J Cell Mol Med* **25**, 2861–2871 (2021).
251. Mandai, M. *et al.* Ovarian clear cell carcinoma meets metabolism; HNF-1 $\beta$  confers survival benefits through the Warburg effect and ROS reduction. *Oncotarget* **6**, 30704–30714 (2015).
252. Amano, Y. *et al.* Metabolic alterations caused by HNF1 $\beta$  expression in ovarian clear cell carcinoma contribute to cell survival. *Oncotarget* **6**, 26002–26017 (2015).
253. Khwaja, A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract* **120**, c179-184 (2012).
254. Vaidya, V. S., Ferguson, M. A. & Bonventre, J. V. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**, 463–493 (2008).
255. Joncquel-Chevalier Curt, M. *et al.* Creatine biosynthesis and transport in health and disease. *Biochimie* **119**, 146–165 (2015).
256. Wyss, M. & Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* **80**, 1107–1213 (2000).
257. Magri, E., Baldoni, G. & Grazi, E. On the biosynthesis of creatine. Intramitochondrial localization of transamidinase from rat kidney. *FEBS Lett* **55**, 91–93 (1975).
258. Tormanen, C. D. Comparison of the properties of purified mitochondrial and cytosolic rat kidney transamidinase. *International Journal of Biochemistry* **22**, 1243–1250 (1990).
259. Wyss, M. & Schulze, A. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience* **112**, 243–260 (2002).
260. Chen, S. Retooling the creatinine clearance equation to estimate kinetic GFR when the plasma creatinine is changing acutely. *J Am Soc Nephrol* **24**, 877–888 (2013).

261. Rizvi, M. S. & Kashani, K. B. Biomarkers for Early Detection of Acute Kidney Injury. *The Journal of Applied Laboratory Medicine* **2**, 386–399 (2017).
262. Charlton, J. R., Portilla, D. & Okusa, M. D. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant* **29**, 1301–1311 (2014).
263. Teo, S. H. & Endre, Z. H. Biomarkers in acute kidney injury (AKI). *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **31**, 331–344 (2017).
264. Nankivell, B. J., Nankivell, L. F. J., Elder, G. J. & Gruenewald, S. M. How unmeasured muscle mass affects estimated GFR and diagnostic inaccuracy. *EClinicalMedicine* **29–30**, 100662 (2020).
265. Kellum, J. A., Ronco, C. & Bellomo, R. Conceptual advances and evolving terminology in acute kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 1–10 (2021) doi:10.1038/s41581-021-00410-w.
266. Cockcroft, D. W. & Gault, M. H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* **16**, 31–41 (1976).
267. Levey, A. S. *et al.* A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* **130**, 461–470 (1999).
268. Levey, A. S. *et al.* A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* **150**, 604–612 (2009).
269. Jelliffe, R. W. & Jelliffe, S. M. A computer program for estimation of creatinine clearance from unstable serum creatinine levels, age, sex, and weight. *Mathematical Biosciences* **14**, 17–24 (1972).
270. Moran, S. M. & Myers, B. D. Course of acute renal failure studied by a model of creatinine kinetics. *Kidney Int* **27**, 928–937 (1985).
271. Dewitte, A. *et al.* Kinetic eGFR and Novel AKI Biomarkers to Predict Renal Recovery. *Clin J Am Soc Nephrol* **10**, 1900–1910 (2015).

272. Chen, S. Kinetic Glomerular Filtration Rate in Routine Clinical Practice-Applications and Possibilities. *Adv Chronic Kidney Dis* **25**, 105–114 (2018).
273. Macedo, E. *et al.* Fluid accumulation, recognition and staging of acute kidney injury in critically-ill patients. *Crit Care* **14**, R82 (2010).
274. Liu, K. D. *et al.* Acute kidney injury in patients with acute lung injury: impact of fluid accumulation on classification of acute kidney injury and associated outcomes. *Crit Care Med* **39**, 2665–2671 (2011).
275. Prowle, J. R., Leitch, A., Kirwan, C. J. & Forni, L. G. Positive fluid balance and AKI diagnosis: assessing the extent and duration of ‘creatinine dilution’. *Intensive Care Med* **41**, 160–161 (2015).
276. Eisner, C. *et al.* Major contribution of tubular secretion to creatinine clearance in mice. *Kidney Int* **77**, 519–526 (2010).
277. Ciarimboli, G. *et al.* Proximal tubular secretion of creatinine by organic cation transporter OCT2 in cancer patients. *Clin Cancer Res* **18**, 1101–1108 (2012).
278. Vallon, V. *et al.* A role for the organic anion transporter OAT3 in renal creatinine secretion in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **302**, F1293–1299 (2012).
279. Carrie, B. J., Golbetz, H. V., Michaels, A. S. & Myers, B. D. Creatinine: an inadequate filtration marker in glomerular diseases. *Am J Med* **69**, 177–182 (1980).
280. Bauer, J. H., Brooks, C. S. & Burch, R. N. Clinical appraisal of creatinine clearance as a measurement of glomerular filtration rate. *Am J Kidney Dis* **2**, 337–346 (1982).
281. Levey, A. S., Perrone, R. D. & Madias, N. E. Serum creatinine and renal function. *Annu Rev Med* **39**, 465–490 (1988).
282. Shemesh, O., Golbetz, H., Kriss, J. P. & Myers, B. D. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int* **28**, 830–838 (1985).
283. Amphoux, A. *et al.* Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain. *Neuropharmacology* **50**, 941–952 (2006).



284. Kastrup, J., Petersen, P., Bartram, R. & Hansen, J. M. The effect of trimethoprim on serum creatinine. *Br J Urol* **57**, 265–268 (1985).
285. Singh, R., Dodkins, J., Doyle, J. F. & Forni, L. G. Acute Kidney Injury Biomarkers: What Do They Tell Us? *Contrib Nephrol* **193**, 21–34 (2018).
286. Liu, K. D. & Brakeman, P. R. Renal repair and recovery. *Crit Care Med* **36**, S187-192 (2008).
287. Haase, M. *et al.* The outcome of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-positive subclinical acute kidney injury: a multicenter pooled analysis of prospective studies. *J Am Coll Cardiol* **57**, 1752–1761 (2011).
288. Koeze, J. *et al.* Incidence, timing and outcome of AKI in critically ill patients varies with the definition used and the addition of urine output criteria. *BMC Nephrol* **18**, (2017).
289. Macedo, E., Malhotra, R., Bouchard, J., Wynn, S. K. & Mehta, R. L. Oliguria is an early predictor of higher mortality in critically ill patients. *Kidney Int* **80**, 760–767 (2011).
290. Macedo, E., Malhotra, R., Claire-Del Granado, R., Fedullo, P. & Mehta, R. L. Defining urine output criterion for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant* **26**, 509–515 (2011).
291. Allen, J. C. *et al.* Definition of hourly urine output influences reported incidence and staging of acute kidney injury. *BMC Nephrology* **21**, 19 (2020).
292. Prowle, J. R. *et al.* Oliguria as predictive biomarker of acute kidney injury in critically ill patients. *Crit Care* **15**, R172 (2011).
293. Cruz, D. N. *et al.* North East Italian Prospective Hospital Renal Outcome Survey on Acute Kidney Injury (NEiPHROS-AKI): targeting the problem with the RIFLE Criteria. *Clin J Am Soc Nephrol* **2**, 418–425 (2007).
294. Leedahl, D. D. *et al.* Derivation of urine output thresholds that identify a very high risk of AKI in patients with septic shock. *Clin J Am Soc Nephrol* **9**, 1168–1174 (2014).
295. Legrand, M. & Payen, D. Understanding urine output in critically ill patients. *Ann Intensive Care* **1**, 13 (2011).

296. Wlodzimirow, K. A. *et al.* A comparison of RIFLE with and without urine output criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Crit Care* **16**, R200 (2012).
297. Vaara, S. T. *et al.* Association of oliguria with the development of acute kidney injury in the critically ill. *Kidney Int* **89**, 200–208 (2016).
298. Koyner, J. L. *et al.* Furosemide Stress Test and Biomarkers for the Prediction of AKI Severity. *J Am Soc Nephrol* **26**, 2023–2031 (2015).
299. Chawla, L. S. *et al.* Development and standardization of a furosemide stress test to predict the severity of acute kidney injury. *Crit Care* **17**, R207 (2013).
300. Ho, K. M. & Power, B. M. Benefits and risks of furosemide in acute kidney injury. *Anaesthesia* **65**, 283–293 (2010).
301. Md Ralib, A., Pickering, J. W., Shaw, G. M. & Endre, Z. H. The urine output definition of acute kidney injury is too liberal. *Crit Care* **17**, R112 (2013).
302. Bagshaw, S. M. *et al.* Current state of the art for renal replacement therapy in critically ill patients with acute kidney injury. *Intensive Care Med* **43**, 841–854 (2017).
303. STARRT-AKI Investigators *et al.* Timing of Initiation of Renal-Replacement Therapy in Acute Kidney Injury. *N Engl J Med* **383**, 240–251 (2020).
304. Gaudry, S. *et al.* Initiation Strategies for Renal-Replacement Therapy in the Intensive Care Unit. *N Engl J Med* **375**, 122–133 (2016).
305. Wierstra, B. T. *et al.* The impact of ‘early’ versus ‘late’ initiation of renal replacement therapy in critical care patients with acute kidney injury: a systematic review and evidence synthesis. *Crit Care* **20**, 122 (2016).
306. Zarbock, A. *et al.* Effect of Early vs Delayed Initiation of Renal Replacement Therapy on Mortality in Critically Ill Patients With Acute Kidney Injury: The ELAIN Randomized Clinical Trial. *JAMA* **315**, 2190–2199 (2016).
307. Alge, J. L. & Arthur, J. M. Biomarkers of AKI: a review of mechanistic relevance and potential therapeutic implications. *Clin J Am Soc Nephrol* **10**, 147–155 (2015).

308. DEN130031.pdf.
309. Kamijo-Ikemori, A. *et al.* [Urinary L-type fatty acid binding protein (L-FABP) as a new urinary biomarker promulgated by the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan]. *Rinsho Byori* **61**, 635–640 (2013).
310. Levey, A. S., Coresh, J., Tighiouart, H., Greene, T. & Inker, L. A. Measured and estimated glomerular filtration rate: current status and future directions. *Nat Rev Nephrol* **16**, 51–64 (2020).
311. Levey, A. S. & Inker, L. A. GFR as the ‘Gold Standard’: Estimated, Measured, and True. *Am J Kidney Dis* **67**, 9–12 (2016).
312. Chardon, L. *et al.* [Measurement of glomerular filtration rate using a reference method]. *Ann Biol Clin (Paris)* **77**, 371–374 (2019).
313. Delanaye, P. *et al.* Iohexol plasma clearance for measuring glomerular filtration rate in clinical practice and research: a review. Part 1: How to measure glomerular filtration rate with iohexol? *Clin Kidney J* **9**, 682–699 (2016).
314. Delanaye, P. *et al.* Iohexol plasma clearance for measuring glomerular filtration rate in clinical practice and research: a review. Part 2: Why to measure glomerular filtration rate with iohexol? *Clin Kidney J* **9**, 700–704 (2016).
315. Russell, C. D. *et al.* Measurement of glomerular filtration rate: single injection plasma clearance method without urine collection. *J Nucl Med* **26**, 1243–1247 (1985).
316. Newman, D. J. Cystatin C. *Ann Clin Biochem* **39**, 89–104 (2002).
317. Filler, G. *et al.* Cystatin C as a marker of GFR--history, indications, and future research. *Clin Biochem* **38**, 1–8 (2005).
318. Abrahamson, M. *et al.* Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem J* **268**, 287–294 (1990).

319. Lignelid, H. & Jacobsson, B. Cystatin C in the human pancreas and gut: an immunohistochemical study of normal and neoplastic tissues. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **421**, 491–495 (1992).
320. Lignelid, H., Collins, V. P. & Jacobsson, B. Cystatin C and transthyretin expression in normal and neoplastic tissues of the human brain and pituitary. *Acta Neuropathol* **93**, 494–500 (1997).
321. Bjarnadóttir, M., Grubb, A. & Olafsson, I. Promoter-mediated, dexamethasone-induced increase in cystatin C production by HeLa cells. *Scand J Clin Lab Invest* **55**, 617–623 (1995).
322. Risch, L., Herklotz, R., Blumberg, A. & Huber, A. R. Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C concentrations in renal transplant patients. *Clin Chem* **47**, 2055–2059 (2001).
323. Fricker, M., Wiesli, P., Brändle, M., Schwegler, B. & Schmid, C. Impact of thyroid dysfunction on serum cystatin C. *Kidney Int* **63**, 1944–1947 (2003).
324. Wiesli, P., Schwegler, B., Spinass, G. A. & Schmid, C. Serum cystatin C is sensitive to small changes in thyroid function. *Clin Chim Acta* **338**, 87–90 (2003).
325. Obrenovic, R., Petrovic, D., Majkic-Singh, N., Trbojevic-Stankovic, J. & Stojimirovic, B. Serum cystatin C levels in normal pregnancy. *Clin Nephrol* **76**, 174–179 (2011).
326. Köttgen, A. *et al.* Serum cystatin C in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Am J Kidney Dis* **51**, 385–394 (2008).
327. Tenstad, O., Roald, A. B., Grubb, A. & Aukland, K. Renal handling of radiolabelled human cystatin C in the rat. *Scand J Clin Lab Invest* **56**, 409–414 (1996).
328. Dharnidharka, V. R., Kwon, C. & Stevens, G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis* **40**, 221–226 (2002).
329. Herget-Rosenthal, S. *et al.* Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int* **66**, 1115–1122 (2004).

330. Nejat, M., Pickering, J. W., Walker, R. J. & Endre, Z. H. Rapid detection of acute kidney injury by plasma cystatin C in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant* **25**, 3283–3289 (2010).
331. Haase-Fielitz, A. *et al.* Novel and conventional serum biomarkers predicting acute kidney injury in adult cardiac surgery--a prospective cohort study. *Crit Care Med* **37**, 553–560 (2009).
332. He, Y. *et al.* Predictive value of cystatin C and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in contrast-induced nephropathy: A meta-analysis. *PLoS One* **15**, e0230934 (2020).
333. Shukla, A. N. *et al.* Diagnostic accuracy of serum cystatin C for early recognition of contrast induced nephropathy in Western Indians undergoing cardiac catheterization. *Indian Heart J* **69**, 311–315 (2017).
334. Briguori, C. *et al.* Cystatin C and contrast-induced acute kidney injury. *Circulation* **121**, 2117–2122 (2010).
335. Yong, Z., Pei, X., Zhu, B., Yuan, H. & Zhao, W. Predictive value of serum cystatin C for acute kidney injury in adults: a meta-analysis of prospective cohort trials. *Sci Rep* **7**, 41012 (2017).
336. Arulkumaran, N. *et al.* Sequential Analysis of a Panel of Biomarkers and Pathologic Findings in a Resuscitated Rat Model of Sepsis and Recovery. *Crit Care Med* **45**, e821–e830 (2017).
337. O’Sullivan, E. D. & Doyle, A. The clinical utility of kinetic glomerular filtration rate. *Clin Kidney J* **10**, 202–208 (2017).
338. Conti, M. *et al.* Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction. *Clin Chem Lab Med* **44**, 288–291 (2006).
339. Uchida, K. & Gotoh, A. Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clin Chim Acta* **323**, 121–128 (2002).
340. Arthur, J. M. *et al.* Evaluation of 32 urine biomarkers to predict the progression of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int* **85**, 431–438 (2014).

341. Nickolas, T. L. *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* **59**, 246–255 (2012).
342. Nejat, M. *et al.* Albuminuria increases cystatin C excretion: implications for urinary biomarkers. *Nephrol Dial Transplant* **27 Suppl 3**, iii96-103 (2012).
343. Beunders, R. *et al.* Proenkephalin (PENK) as a Novel Biomarker for Kidney Function. *J Appl Lab Med* **2**, 400–412 (2017).
344. Ernst, A., Köhrle, J. & Bergmann, A. Proenkephalin A 119-159, a stable proenkephalin A precursor fragment identified in human circulation. *Peptides* **27**, 1835–1840 (2006).
345. Comb, M., Seeburg, P. H., Adelman, J., Eiden, L. & Herbert, E. Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* **295**, 663–666 (1982).
346. Denning, G. M. *et al.* Proenkephalin expression and enkephalin release are widely observed in non-neuronal tissues. *Peptides* **29**, 83–92 (2008).
347. Springhorn, J. P. & Claycomb, W. C. Translation of heart preproenkephalin mRNA and secretion of enkephalin peptides from cultured cardiac myocytes. *Am J Physiol* **263**, H1560-1566 (1992).
348. Khorashadi, M., Beunders, R., Pickkers, P. & Legrand, M. Proenkephalin: A New Biomarker for Glomerular Filtration Rate and Acute Kidney Injury. *Nephron* **144**, 655–661 (2020).
349. Donato, L. J. *et al.* Analytical performance of an immunoassay to measure proenkephalin. *Clin Biochem* **58**, 72–77 (2018).
350. Gayat, E. *et al.* Back-to-back comparison of penKID with NephroCheck® to predict acute kidney injury at admission in intensive care unit: a brief report. *Crit Care* **22**, 24 (2018).
351. Rosenqvist, M. *et al.* Proenkephalin a 119-159 (penKid) - a novel biomarker for acute kidney injury in sepsis: an observational study. *BMC Emerg Med* **19**, 75 (2019).
352. Kim, H. *et al.* Proenkephalin, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, and Estimated Glomerular Filtration Rates in Patients With Sepsis. *Ann Lab Med* **37**, 388–397 (2017).

353. Marino, R. *et al.* Diagnostic and short-term prognostic utility of plasma pro-enkephalin (pro-ENK) for acute kidney injury in patients admitted with sepsis in the emergency department. *J Nephrol* **28**, 717–724 (2015).
354. Hollinger, A. *et al.* Proenkephalin A 119-159 (Penkid) Is an Early Biomarker of Septic Acute Kidney Injury: The Kidney in Sepsis and Septic Shock (Kid-SSS) Study. *Kidney Int Rep* **3**, 1424–1433 (2018).
355. Shah, K. S. *et al.* Proenkephalin predicts acute kidney injury in cardiac surgery patients. *Clin Nephrol* **83**, 29–35 (2015).
356. Caironi, P. *et al.* Circulating Proenkephalin, Acute Kidney Injury, and Its Improvement in Patients with Severe Sepsis or Shock. *Clin Chem* **64**, 1361–1369 (2018).
357. Ng, L. L. *et al.* Proenkephalin, Renal Dysfunction, and Prognosis in Patients With Acute Heart Failure: A GREAT Network Study. *J Am Coll Cardiol* **69**, 56–69 (2017).
358. Kanagala, P. *et al.* Proenkephalin and prognosis in heart failure with preserved ejection fraction: a GREAT network study. *Clin Res Cardiol* **108**, 940–949 (2019).
359. Emmens, J. E. *et al.* Proenkephalin, an Opioid System Surrogate, as a Novel Comprehensive Renal Marker in Heart Failure. *Circ Heart Fail* **12**, e005544 (2019).
360. Matsue, Y. *et al.* Clinical Correlates and Prognostic Value of Proenkephalin in Acute and Chronic Heart Failure. *J Card Fail* **23**, 231–239 (2017).
361. Dépret, F. *et al.* PenKid measurement at admission is associated with outcome in severely ill burn patients. *Burns* **46**, 1302–1309 (2020).
362. Liu, R. *et al.* The value of plasma pro-enkephalin and adrenomedullin for the prediction of sepsis-associated acute kidney injury in critically ill patients. *Crit Care* **24**, 162 (2020).
363. Kieneker, L. M. *et al.* Plasma Proenkephalin and Poor Long-Term Outcome in Renal Transplant Recipients. *Transplant Direct* **3**, e190 (2017).

364. Beunders, R., van Groenendaal, R., Leijte, G. P., Kox, M. & Pickkers, P. Proenkephalin Compared to Conventional Methods to Assess Kidney Function in Critically Ill Sepsis Patients. *Shock* **54**, 308–314 (2020).
365. Lefèvre, P. & Badetti, C. [Metabolism of albumin]. *Ann Fr Anesth Reanim* **15**, 464–469 (1996).
366. D’Amico, G. & Bazzi, C. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int* **63**, 809–825 (2003).
367. Russo, L. M. *et al.* The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney Int* **71**, 504–513 (2007).
368. Nielsen, R., Christensen, E. I. & Birn, H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney Int* **89**, 58–67 (2016).
369. Argyropoulos, C. P. *et al.* Rediscovering Beta-2 Microglobulin As a Biomarker across the Spectrum of Kidney Diseases. *Front Med (Lausanne)* **4**, 73 (2017).
370. Dieterle, F. *et al.* Urinary clusterin, cystatin C, beta2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury. *Nat Biotechnol* **28**, 463–469 (2010).
371. Thielemans, N., Lauwerys, R. & Bernard, A. Competition between albumin and low-molecular-weight proteins for renal tubular uptake in experimental nephropathies. *Nephron* **66**, 453–458 (1994).
372. Davey, P. G. & Gosling, P. beta 2-Microglobulin instability in pathological urine. *Clin Chem* **28**, 1330–1333 (1982).
373. Donaldson, M. D., Chambers, R. E., Woolridge, M. W. & Whicher, J. T. Stability of alpha 1-microglobulin, beta 2-microglobulin and retinol binding protein in urine. *Clin Chim Acta* **179**, 73–77 (1989).
374. Blumsohn, A., Morris, B. W., Griffiths, H. & Ramsey, C. F. Stability of beta 2-microglobulin and retinol binding protein at different values of pH and temperature in normal and pathological urine. *Clin Chim Acta* **195**, 133–137 (1991).



375. Inker, L. A. *et al.* GFR Estimation Using  $\beta$ -Trace Protein and  $\beta$ 2-Microglobulin in CKD. *Am J Kidney Dis* **67**, 40–48 (2016).
376. Viberti, G. C., Keen, H. & Mackintosh, D. Beta 2-microglobulinaemia: a sensitive index of diminishing renal function in diabetics. *Br Med J (Clin Res Ed)* **282**, 95–98 (1981).
377. Donadio, C., Lucchesi, A., Ardini, M. & Giordani, R. Cystatin C, beta 2-microglobulin, and retinol-binding protein as indicators of glomerular filtration rate: comparison with plasma creatinine. *J Pharm Biomed Anal* **24**, 835–842 (2001).
378. Bianchi, C. *et al.* Reappraisal of serum beta2-microglobulin as marker of GFR. *Ren Fail* **23**, 419–429 (2001).
379. Zaleska-Kociecka, M. *et al.* Serum beta-2 microglobulin levels for predicting acute kidney injury complicating aortic valve replacement. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* **25**, 533–540 (2017).
380. Wang, R., Hu, H., Hu, S., He, H. & Shui, H.  $\beta$ 2-microglobulin is an independent indicator of acute kidney injury and outcomes in patients with intracerebral hemorrhage. *Medicine (Baltimore)* **99**, e19212 (2020).
381. Peterson, P. A., Evrin, P. E. & Berggård, I. Differentiation of glomerular, tubular, and normal proteinuria: determinations of urinary excretion of beta-2-macroglobulin, albumin, and total protein. *J Clin Invest* **48**, 1189–1198 (1969).
382. Gatanaga, H. *et al.* Urinary beta2-microglobulin as a possible sensitive marker for renal injury caused by tenofovir disoproxil fumarate. *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**, 744–748 (2006).
383. Barton, K. T. *et al.* Using the newer Kidney Disease: Improving Global Outcomes criteria, beta-2-microglobulin levels associate with severity of acute kidney injury. *Clin Kidney J* **11**, 797–802 (2018).
384. Du, Y. *et al.* Urinary biomarkers to detect acute kidney injury in the pediatric emergency center. *Pediatr Nephrol* **26**, 267–274 (2011).

385. Bergwik, J., Kristiansson, A., Allhorn, M., Gram, M. & Åkerström, B. Structure, Functions, and Physiological Roles of the Lipocalin  $\alpha$ 1-Microglobulin (A1M). *Front Physiol* **12**, 645650 (2021).
386. Terzi, I. *et al.* Alpha1-microglobulin as an early biomarker of sepsis-associated acute kidney injury: a prospective cohort study. *Hippokratia* **18**, 262–268 (2014).
387. Yu, H. *et al.* Alpha-1-microglobulin: an indicator protein for renal tubular function. *J Clin Pathol* **36**, 253–259 (1983).
388. Herget-Rosenthal, S. *et al.* Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin Chem* **50**, 552–558 (2004).
389. Noy, N. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* **348 Pt 3**, 481–495 (2000).
390. Frey, S. K. *et al.* Isoforms of retinol binding protein 4 (RBP4) are increased in chronic diseases of the kidney but not of the liver. *Lipids Health Dis* **7**, 29 (2008).
391. Bernard, A. M., Vyskocil, A. A., Mahieu, P. & Lauwerys, R. R. Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury. *Clin Chem* **33**, 775–779 (1987).
392. Che, M. *et al.* Clinical usefulness of novel biomarkers for the detection of acute kidney injury following elective cardiac surgery. *Nephron Clin Pract* **115**, c66-72 (2010).
393. Gonzalez-Calero, L. *et al.* Urinary Kininogen-1 and Retinol binding protein-4 respond to Acute Kidney Injury: predictors of patient prognosis? *Sci Rep* **6**, 19667 (2016).
394. Stetler-Stevenson, W. G., Kruttsch, H. C. & Liotta, L. A. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* **264**, 17374–17378 (1989).
395. Johnson, A. C. M. & Zager, R. A. Mechanisms Underlying Increased TIMP2 and IGFBP7 Urinary Excretion in Experimental AKI. *J Am Soc Nephrol* **29**, 2157–2167 (2018).

396. Emlet, D. R. *et al.* Insulin-like growth factor binding protein 7 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2: differential expression and secretion in human kidney tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **312**, F284–F296 (2017).
397. Stetler-Stevenson, W. G., Brown, P. D., Onisto, M., Levy, A. T. & Liotta, L. A. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *J Biol Chem* **265**, 13933–13938 (1990).
398. Kai, A. K.-L. *et al.* Down-regulation of TIMP2 by HIF-1 $\alpha$ /miR-210/HIF-3 $\alpha$  regulatory feedback circuit enhances cancer metastasis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **64**, 473–487 (2016).
399. Nalesso, F. *et al.* Evaluating Nephrocheck® as a Predictive Tool for Acute Kidney Injury. *Int J Nephrol Renovasc Dis* **13**, 85–96 (2020).
400. Seo, D.-W. *et al.* Shp-1 mediates the antiproliferative activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **281**, 3711–3721 (2006).
401. Peeney, D. *et al.* TIMP-2 suppresses tumor growth and metastasis in murine model of triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis* **41**, 313–325 (2020).
402. Vizioli, M. G. *et al.* IGFBP7: an oncosuppressor gene in thyroid carcinogenesis. *Oncogene* **29**, 3835–3844 (2010).
403. Benatar, T. *et al.* IGFBP7 reduces breast tumor growth by induction of senescence and apoptosis pathways. *Breast Cancer Res Treat* **133**, 563–573 (2012).
404. Chen, D. *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein-7 (IGFBP7): a promising gene therapeutic for hepatocellular carcinoma (HCC). *Mol Ther* **21**, 758–766 (2013).
405. Kashani, K. *et al.* Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Crit Care* **17**, R25 (2013).
406. Meersch, M. *et al.* Urinary TIMP-2 and IGFBP7 as early biomarkers of acute kidney injury and renal recovery following cardiac surgery. *PLoS One* **9**, e93460 (2014).

407. Mayer, T. *et al.* Urine Biomarkers of Tubular Renal Cell Damage for the Prediction of Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery-A Pilot Study. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **31**, 2072–2079 (2017).
408. Cummings, J. J. *et al.* Intraoperative prediction of cardiac surgery-associated acute kidney injury using urinary biomarkers of cell cycle arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* **157**, 1545–1553.e5 (2019).
409. Beitland, S. *et al.* Urine biomarkers give early prediction of acute kidney injury and outcome after out-of-hospital cardiac arrest. *Crit Care* **20**, 314 (2016).
410. Adler, C. *et al.* TIMP-2/IGFBP7 predicts acute kidney injury in out-of-hospital cardiac arrest survivors. *Crit Care* **22**, 126 (2018).
411. Titeca-Beauport, D. *et al.* The urine biomarkers TIMP2 and IGFBP7 can identify patients who will experience severe acute kidney injury following a cardiac arrest: A prospective multicentre study. *Resuscitation* **141**, 104–110 (2019).
412. Schanz, M., Hoferer, A., Shi, J., Alscher, M. D. & Kimmel, M. Urinary TIMP2-IGFBP7 for the prediction of platinum-induced acute renal injury. *Int J Nephrol Renovasc Dis* **10**, 175–181 (2017).
413. Schanz, M., Shi, J., Wasser, C., Alscher, M. D. & Kimmel, M. Urinary [TIMP-2] × [IGFBP7] for risk prediction of acute kidney injury in decompensated heart failure. *Clin Cardiol* **40**, 485–491 (2017).
414. Yang, J. *et al.* Urinary Tissue Inhibitor of Metalloproteinase and Insulin-like Growth Factor-7 as Early Biomarkers of Delayed Graft Function After Kidney Transplantation. *Transplant Proc* **49**, 2050–2054 (2017).
415. Pianta, T. J. *et al.* Evaluation of biomarkers of cell cycle arrest and inflammation in prediction of dialysis or recovery after kidney transplantation. *Transpl Int* **28**, 1392–1404 (2015).
416. Cuartero, M. *et al.* Cell-cycle arrest biomarkers in urine to predict acute kidney injury in septic and non-septic critically ill patients. *Ann Intensive Care* **7**, 92 (2017).

417. Godi, I. *et al.* Urinary [TIMP-2] × [IGFBP7] and serum procalcitonin to predict and assess the risk for short-term outcomes in septic and non-septic critically ill patients. *Ann Intensive Care* **10**, 46 (2020).
418. Kellum, J. A. *et al.* Use of Biomarkers to Identify Acute Kidney Injury to Help Detect Sepsis in Patients With Infection. *Crit Care Med* **49**, e360–e368 (2021).
419. Honore, P. M. *et al.* Urinary Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 and Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 7 for Risk Stratification of Acute Kidney Injury in Patients With Sepsis. *Crit Care Med* **44**, 1851–1860 (2016).
420. Fiorentino, M. *et al.* Serial Measurement of Cell-cycle Arrest Biomarkers [TIMP-2]•[IGFBP7] and Risk for Progression to Death, Dialysis or Severe Acute Kidney Injury in Patients with Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med* (2020) doi:10.1164/rccm.201906-1197OC.
421. Oezkur, M. *et al.* TIMP-2\*IGFBP7 (Nephrocheck®) Measurements at Intensive Care Unit Admission After Cardiac Surgery are Predictive for Acute Kidney Injury Within 48 Hours. *Kidney Blood Press Res* **42**, 456–467 (2017).
422. Wang, Y. *et al.* Urinary TIMP-2 and IGFBP7 for the prediction of acute kidney injury following cardiac surgery. *BMC Nephrol* **18**, 177 (2017).
423. Noto, A., Cortegiani, A. & David, A. NephroCheck: should we consider urine osmolality? *Crit Care* **23**, 48 (2019).
424. Liu, C. *et al.* The diagnostic accuracy of urinary [TIMP-2]•[IGFBP7] for acute kidney injury in adults: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **96**, e7484 (2017).
425. Zaouter, C. *et al.* A combined approach for the early recognition of acute kidney injury after adult cardiac surgery. *Anaesth Crit Care Pain Med* **37**, 335–341 (2018).
426. Grieshaber, P. *et al.* Predicting Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury Using a Combination of Clinical Risk Scores and Urinary Biomarkers. *Thorac Cardiovasc Surg* **68**, 389–400 (2020).

427. Wetz, A. J. *et al.* Quantification of urinary TIMP-2 and IGFBP-7: an adequate diagnostic test to predict acute kidney injury after cardiac surgery? *Crit Care* **19**, 3 (2015).
428. Waskowski, J. *et al.* (TIMP2) x (IGFBP7) as early renal biomarker for the prediction of acute kidney injury in aortic surgery (TIGER). A single center observational study. *PLoS One* **16**, e0244658 (2021).
429. Toprak, Z. *et al.* Cisplatin nephrotoxicity is not detected by urinary cell-cycle arrest biomarkers in lung cancer patients. *Int Urol Nephrol* **49**, 1041–1047 (2017).
430. Kimmel, M. *et al.* Association of Renal Stress/Damage and Filtration Biomarkers with Subsequent AKI during Hospitalization among Patients Presenting to the Emergency Department. *Clin J Am Soc Nephrol* **11**, 938–946 (2016).
431. Joannidis, M. *et al.* Use of Cell Cycle Arrest Biomarkers in Conjunction With Classical Markers of Acute Kidney Injury. *Crit Care Med* **47**, e820–e826 (2019).
432. Titeca-Beauport, D. *et al.* Urine cell cycle arrest biomarkers distinguish poorly between transient and persistent AKI in early septic shock: a prospective, multicenter study. *Crit Care* **24**, 280 (2020).
433. Maizel, J. *et al.* Urinary TIMP2 and IGFBP7 Identifies High Risk Patients of Short-Term Progression from Mild and Moderate to Severe Acute Kidney Injury during Septic Shock: A Prospective Cohort Study. *Dis Markers* **2019**, 3471215 (2019).
434. Meersch, M. *et al.* Prevention of cardiac surgery-associated AKI by implementing the KDIGO guidelines in high risk patients identified by biomarkers: the PrevAKI randomized controlled trial. *Intensive Care Med* **43**, 1551–1561 (2017).
435. Garnier, F. *et al.* Reversibility of Acute Kidney Injury in Medical ICU Patients: Predictability Performance of Urinary Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 x Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 7 and Renal Resistive Index. *Crit Care Med* **48**, e277–e284 (2020).

436. Succar, L., Pianta, T. J., Davidson, T., Pickering, J. W. & Endre, Z. H. Subclinical chronic kidney disease modifies the diagnosis of experimental acute kidney injury. *Kidney International* **92**, 680–692 (2017).
437. Friedl, A., Stoesz, S. P., Buckley, P. & Gould, M. N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem J* **31**, 433–441 (1999).
438. Cowland, J. B. & Borregaard, N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* **45**, 17–23 (1997).
439. Hvidberg, V. *et al.* The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett* **579**, 773–777 (2005).
440. Mishra, J. *et al.* Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* **14**, 2534–2543 (2003).
441. Mori, K. *et al.* Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* **115**, 610–621 (2005).
442. Mishra, J. *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* **365**, 1231–1238 (2005).
443. Matsui, K., Kamijo-Ikemori, A., Sugaya, T., Yasuda, T. & Kimura, K. Usefulness of urinary biomarkers in early detection of acute kidney injury after cardiac surgery in adults. *Circ J* **76**, 213–220 (2012).
444. Koyner, J. L. *et al.* Urinary cystatin C as an early biomarker of acute kidney injury following adult cardiothoracic surgery. *Kidney Int* **74**, 1059–1069 (2008).
445. Wagener, G. *et al.* Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute kidney injury after cardiac surgery. *Am J Kidney Dis* **52**, 425–433 (2008).

446. Han, W. K., Wagener, G., Zhu, Y., Wang, S. & Lee, H. T. Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol* **4**, 873–882 (2009).
447. Devarajan, P. Review: neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology (Carlton)* **15**, 419–428 (2010).
448. Ho, J. *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* **66**, 993–1005 (2015).
449. Shirakabe, A. *et al.* Clinical Usefulness of Urinary Liver Fatty Acid-Binding Protein Excretion for Predicting Acute Kidney Injury during the First 7 Days and the Short-Term Prognosis in Acute Heart Failure Patients with Non-Chronic Kidney Disease. *Cardiorenal Med* **7**, 301–315 (2017).
450. Liu, S. *et al.* Urinary L-FABP and its combination with urinary NGAL in early diagnosis of acute kidney injury after cardiac surgery in adult patients. *Biomarkers* **18**, 95–101 (2013).
451. Zeng, X.-F. *et al.* Performance of urinary NGAL and L-FABP in predicting acute kidney injury and subsequent renal recovery: a cohort study based on major surgeries. *Clin Chem Lab Med* **52**, 671–678 (2014).
452. Prowle, J. R. *et al.* Combination of biomarkers for diagnosis of acute kidney injury after cardiopulmonary bypass. *Ren Fail* **37**, 408–416 (2015).
453. van Timmeren, M. M. *et al.* Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *J Pathol* **212**, 209–217 (2007).
454. Ichimura, T., Hung, C. C., Yang, S. A., Stevens, J. L. & Bonventre, J. V. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F552–563 (2004).
455. Amin, R. P. *et al.* Identification of putative gene based markers of renal toxicity. *Environ Health Perspect* **112**, 465–479 (2004).



456. van Timmeren, M. M. *et al.* Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**, F456-464 (2006).
457. Prozialeck, W. C. *et al.* Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. *Kidney Int* **72**, 985–993 (2007).
458. Jost, G. *et al.* Retention of iodine and expression of biomarkers for renal damage in the kidney after application of iodinated contrast media in rats. *Invest Radiol* **44**, 114–123 (2009).
459. Chiusolo, A. *et al.* Kidney injury molecule-1 expression in rat proximal tubule after treatment with segment-specific nephrotoxics: a tool for early screening of potential kidney toxicity. *Toxicol Pathol* **38**, 338–345 (2010).
460. Han, W. K., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R. & Bonventre, J. V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* **62**, 237–244 (2002).
461. Zhang, P. L. *et al.* Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury. *Kidney Int* **73**, 608–614 (2008).
462. Moresco, R. N. *et al.* Urinary kidney injury molecule-1 in renal disease. *Clin Chim Acta* **487**, 15–21 (2018).
463. Bailly, V. *et al.* Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* **277**, 39739–39748 (2002).
464. Parikh, C. R. *et al.* Performance of kidney injury molecule-1 and liver fatty acid-binding protein and combined biomarkers of AKI after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol* **8**, 1079–1088 (2013).
465. Khreba, N. A. *et al.* Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1) as an Early Predictor for Acute Kidney Injury in Post-Cardiopulmonary Bypass (CPB) in Open Heart Surgery Patients. *Int J Nephrol* **2019**, 6265307 (2019).
466. Liangos, O. *et al.* Comparative analysis of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass. *Biomarkers* **14**, 423–431 (2009).

467. Vaidya, V. S. *et al.* Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotechnol* **28**, 478–485 (2010).
468. Tu, Y. *et al.* Urinary netrin-1 and KIM-1 as early biomarkers for septic acute kidney injury. *Ren Fail* **36**, 1559–1563 (2014).
469. Han, W. K. *et al.* Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int* **73**, 863–869 (2008).
470. Shao, X. *et al.* Diagnostic value of urinary kidney injury molecule 1 for acute kidney injury: a meta-analysis. *PLoS One* **9**, e84131 (2014).
471. Xu, Y., Xie, Y., Shao, X., Ni, Z. & Mou, S. L-FABP: A novel biomarker of kidney disease. *Clin Chim Acta* **445**, 85–90 (2015).
472. Smathers, R. L. & Petersen, D. R. The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics* **5**, 170–191 (2011).
473. Kamijo-Ikemori, A., Sugaya, T., Matsui, K., Yokoyama, T. & Kimura, K. Roles of human liver type fatty acid binding protein in kidney disease clarified using hL-FABP chromosomal transgenic mice. *Nephrology (Carlton)* **16**, 539–544 (2011).
474. Oyama, Y. *et al.* Evidence for megalin-mediated proximal tubular uptake of L-FABP, a carrier of potentially nephrotoxic molecules. *Lab Invest* **85**, 522–531 (2005).
475. Simon, T. C., Roth, K. A. & Gordon, J. I. Use of transgenic mice to map cis-acting elements in the liver fatty acid-binding protein gene (*Fabpl*) that regulate its cell lineage-specific, differentiation-dependent, and spatial patterns of expression in the gut epithelium and in the liver acinus. *J Biol Chem* **268**, 18345–18358 (1993).
476. Negishi, K. *et al.* A role of liver fatty acid-binding protein in cisplatin-induced acute renal failure. *Kidney Int* **72**, 348–358 (2007).
477. Yamamoto, T. *et al.* Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* **18**, 2894–2902 (2007).

478. Nakamura, T., Sugaya, T., Node, K., Ueda, Y. & Koide, H. Urinary excretion of liver-type fatty acid-binding protein in contrast medium-induced nephropathy. *Am J Kidney Dis* **47**, 439–444 (2006).
479. Doi, K. *et al.* Evaluation of new acute kidney injury biomarkers in a mixed intensive care unit. *Crit Care Med* **39**, 2464–2469 (2011).
480. Ivanišević, I. *et al.* L-FABP can be an early marker of acute kidney injury in children. *Pediatr Nephrol* **28**, 963–969 (2013).
481. Suzuki, G. *et al.* Clinical significance of urinary L-FABP in the emergency department. *Int J Emerg Med* **12**, 24 (2019).
482. Hishikari, K. *et al.* Urinary Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein Level as a Predictive Biomarker of Acute Kidney Injury in Patients with Acute Decompensated Heart Failure. *Cardiorenal Med* **7**, 267–275 (2017).
483. Susantitaphong, P. *et al.* Performance of urinary liver-type fatty acid-binding protein in acute kidney injury: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis* **61**, 430–439 (2013).
484. Kamiyo-Ikemori, A. *et al.* Liver-type fatty acid-binding protein attenuates renal injury induced by unilateral ureteral obstruction. *Am J Pathol* **169**, 1107–1117 (2006).
485. Doi, K., Noiri, E. & Sugaya, T. Urinary L-type fatty acid-binding protein as a new renal biomarker in critical care. *Curr Opin Crit Care* **16**, 545–549 (2010).
486. Manabe, K. *et al.* Urinary liver-type fatty acid-binding protein level as a predictive biomarker of contrast-induced acute kidney injury. *Eur J Clin Invest* **42**, 557–563 (2012).
487. Parr, S. K. *et al.* Urinary L-FABP predicts poor outcomes in critically ill patients with early acute kidney injury. *Kidney Int* **87**, 640–648 (2015).
488. Kawai, A. *et al.* Serum liver-type fatty acid-binding protein predicts recovery of graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. *Clin Transplant* **28**, 749–754 (2014).

489. Kaplanski, G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol Rev* **281**, 138–153 (2018).
490. Yasuda, K., Nakanishi, K. & Tsutsui, H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
491. Melnikov, V. Y. *et al.* Impaired IL-18 processing protects caspase-1-deficient mice from ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* **107**, 1145–1152 (2001).
492. Melnikov, V. Y. *et al.* Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. *J Clin Invest* **110**, 1083–1091 (2002).
493. Parikh, C. R., Jani, A., Melnikov, V. Y., Faubel, S. & Edelstein, C. L. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis* **43**, 405–414 (2004).
494. Parikh, C. R., Abraham, E., Ancukiewicz, M. & Edelstein, C. L. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J Am Soc Nephrol* **16**, 3046–3052 (2005).
495. Nisula, S. *et al.* Predictive value of urine interleukin-18 in the evolution and outcome of acute kidney injury in critically ill adult patients. *Br J Anaesth* **114**, 460–468 (2015).
496. Siew, E. D. *et al.* Elevated urinary IL-18 levels at the time of ICU admission predict adverse clinical outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 1497–1505 (2010).
497. Liu, Y. *et al.* Urinary interleukin 18 for detection of acute kidney injury: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis* **62**, 1058–1067 (2013).
498. Haase, M., Bellomo, R., Story, D., Davenport, P. & Haase-Fielitz, A. Urinary interleukin-18 does not predict acute kidney injury after adult cardiac surgery: a prospective observational cohort study. *Crit Care* **12**, R96 (2008).
499. Tsai, M.-H. *et al.* Acute renal failure in cirrhotic patients with severe sepsis: value of urinary interleukin-18. *J Gastroenterol Hepatol* **28**, 135–141 (2013).
500. Lin, X., Yuan, J., Zhao, Y. & Zha, Y. Urine interleukin-18 in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis. *J Nephrol* **28**, 7–16 (2015).

501. Weiss, R. H. & Kim, K. Metabolomics in the study of kidney diseases. *Nat Rev Nephrol* **8**, 22–33 (2011).
502. Marx, D. *et al.* Proteomics and Metabolomics for AKI Diagnosis. *Semin Nephrol* **38**, 63–87 (2018).
503. Pozzoli, S., Simonini, M. & Manunta, P. Predicting acute kidney injury: current status and future challenges. *J Nephrol* **31**, 209–223 (2018).
504. Klein, J., Bascands, J.-L., Mischak, H. & Schanstra, J. P. The role of urinary peptidomics in kidney disease research. *Kidney Int* **89**, 539–545 (2016).
505. Hampel, D. J. *et al.* Toward proteomics in uroscopy: urinary protein profiles after radiocontrast medium administration. *J Am Soc Nephrol* **12**, 1026–1035 (2001).
506. Izquierdo-Garcia, J. L. *et al.* Identification of novel metabolomic biomarkers in an experimental model of septic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **316**, F54–F62 (2019).
507. Boudonck, K. J. *et al.* Discovery of metabolomics biomarkers for early detection of nephrotoxicity. *Toxicol Pathol* **37**, 280–292 (2009).
508. Xu, E. Y. *et al.* Integrated pathway analysis of rat urine metabolic profiles and kidney transcriptomic profiles to elucidate the systems toxicology of model nephrotoxics. *Chem Res Toxicol* **21**, 1548–1561 (2008).
509. Jung, Y. H., Han, D., Shin, S. H., Kim, E.-K. & Kim, H.-S. Proteomic identification of early urinary-biomarkers of acute kidney injury in preterm infants. *Sci Rep* **10**, 4057 (2020).
510. Devarajan, P. *et al.* Proteomic identification of early biomarkers of acute kidney injury after cardiac surgery in children. *Am J Kidney Dis* **56**, 632–642 (2010).
511. Schaub, S. *et al.* Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. *Am J Transplant* **5**, 729–738 (2005).

512. Vanhoutte, K. J. A. *et al.* Biomarker discovery with SELDI-TOF MS in human urine associated with early renal injury: evaluation with computational analytical tools. *Nephrol Dial Transplant* **22**, 2932–2943 (2007).
513. Bennett, M. R. *et al.* Using proteomics to identify preprocedural risk factors for contrast induced nephropathy. *Proteomics Clin Appl* **2**, 1058–1064 (2008).
514. Muhle-Goll, C. *et al.* Urinary NMR Profiling in Pediatric Acute Kidney Injury-A Pilot Study. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
515. Poyan Mehr, A. *et al.* De novo NAD<sup>+</sup> biosynthetic impairment in acute kidney injury in humans. *Nat Med* **24**, 1351–1359 (2018).
516. Sun, J. *et al.* Serum Metabolomic Profiles from Patients with Acute Kidney Injury: A Pilot Study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **893–894**, 107–113 (2012).
517. Carrick, E. *et al.* Development of a MALDI MS-based platform for early detection of acute kidney injury. *Proteomics Clin Appl* **10**, 732–742 (2016).
518. Metzger, J. *et al.* Urinary excretion of twenty peptides forms an early and accurate diagnostic pattern of acute kidney injury. *Kidney Int* **78**, 1252–1262 (2010).
519. Metzger, J. *et al.* Acute kidney injury prediction in cardiac surgery patients by a urinary peptide pattern: a case-control validation study. *Crit Care* **20**, 157 (2016).
520. Schaub, S. *et al.* Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* **15**, 219–227 (2004).
521. Nguyen, M. T., Ross, G. F., Dent, C. L. & Devarajan, P. Early prediction of acute renal injury using urinary proteomics. *Am J Nephrol* **25**, 318–326 (2005).
522. Wen, X. & Kellum, J. A. N-Acetyl-beta-D-Glucosaminidase (NAG). in *Encyclopedia of Intensive Care Medicine* (eds. Vincent, J.-L. & Hall, J. B.) 1509–1510 (Springer, 2012). doi:10.1007/978-3-642-00418-6\_305.
523. Kim, K. S. *et al.* Identification of a sensitive urinary biomarker, selenium-binding protein 1, for early detection of acute kidney injury. *J Toxicol Environ Health A* **80**, 453–464 (2017).

524. Du, S. *et al.* Serum alpha 1-antitrypsin predicts severe acute kidney injury after cardiac surgery. *J Thorac Dis* **11**, 5053–5062 (2019).
525. Nikolakopoulou, Z. *et al.* Plasma S100A8/A9 heterodimer is an early prognostic marker of acute kidney injury associated with cardiac surgery. *Biomark Med* **13**, 205–218 (2019).
526. Westhuyzen, J. *et al.* Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant* **18**, 543–551 (2003).
527. Endre, Z. H. & Pickering, J. W. New Markers of Acute Kidney Injury: Giant Leaps and Baby Steps. *Clin Biochem Rev* **32**, 121–124 (2011).
528. Basu, R. K. *et al.* Combining functional and tubular damage biomarkers improves diagnostic precision for acute kidney injury after cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol* **64**, 2753–2762 (2014).
529. Kurth, M. J. *et al.* Acute kidney injury risk in orthopaedic trauma patients pre and post surgery using a biomarker algorithm and clinical risk score. *Sci Rep* **10**, 20005 (2020).
530. Goldstein, S. L. & Chawla, L. S. Renal angina. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 943–949 (2010).
531. Cruz, D. N. *et al.* Utilization of small changes in serum creatinine with clinical risk factors to assess the risk of AKI in critically ill adults. *Clin J Am Soc Nephrol* **9**, 663–672 (2014).
532. Basu, R. K. *et al.* Derivation and validation of the renal angina index to improve the prediction of acute kidney injury in critically ill children. *Kidney Int* **85**, 659–667 (2014).
533. Levante, C. *et al.* Routine adoption of TIMP2 and IGFBP7 biomarkers in cardiac surgery for early identification of acute kidney injury. *Int J Artif Organs* **40**, 714–718 (2017).
534. Bhatraju, P. K. *et al.* A Prediction Model for Severe AKI in Critically Ill Adults That Incorporates Clinical and Biomarker Data. *Clin J Am Soc Nephrol* **14**, 506–514 (2019).
535. Rank, N. *et al.* Deep-learning-based real-time prediction of acute kidney injury outperforms human predictive performance. *NPJ Digit Med* **3**, 139 (2020).
536. Cheungpasitporn, W. & Kashani, K. Electronic Data Systems and Acute Kidney Injury. *Contrib Nephrol* **187**, 73–83 (2016).

537. Sawhney, S. *et al.* Acute kidney injury-how does automated detection perform? *Nephrol Dial Transplant* **30**, 1853–1861 (2015).
538. Colpaert, K. *et al.* Implementation of a real-time electronic alert based on the RIFLE criteria for acute kidney injury in ICU patients. *Acta Clin Belg* **62 Suppl 2**, 322–325 (2007).
539. Ahmed, A. *et al.* Development and validation of electronic surveillance tool for acute kidney injury: A retrospective analysis. *J Crit Care* **30**, 988–993 (2015).
540. NHS England » Acute Kidney Injury (AKI) Algorithm.  
<https://www.england.nhs.uk/akiprogramme/aki-algorithm/>.
541. Colpaert, K. *et al.* Impact of real-time electronic alerting of acute kidney injury on therapeutic intervention and progression of RIFLE class. *Crit Care Med* **40**, 1164–1170 (2012).
542. Lachance, P. *et al.* Association between e-alert implementation for detection of acute kidney injury and outcomes: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant* **32**, 265–272 (2017).
543. Rind, D. M. *et al.* Effect of computer-based alerts on the treatment and outcomes of hospitalized patients. *Arch Intern Med* **154**, 1511–1517 (1994).
544. West Midlands Acute Medicine Collaborative. The impact of the NHS electronic-alert system on the recognition and management of acute kidney injury in acute medicine. *Clin Med (Lond)* **19**, 109–113 (2019).
545. Chandrasekar, T. *et al.* A whole system approach to improving mortality associated with acute kidney injury. *QJM* **110**, 657–666 (2017).
546. Prendecki, M. *et al.* Improving outcomes in patients with Acute Kidney Injury: the impact of hospital based automated AKI alerts. *Postgrad Med J* **92**, 9–13 (2016).
547. Kolhe, N. V. *et al.* Impact of Compliance with a Care Bundle on Acute Kidney Injury Outcomes: A Prospective Observational Study. *PLoS One* **10**, e0132279 (2015).
548. Kolhe, N. V. *et al.* A simple care bundle for use in acute kidney injury: a propensity score-matched cohort study. *Nephrol Dial Transplant* **31**, 1846–1854 (2016).



549. The ICE-AKI study: Impact analysis of a Clinical prediction rule and Electronic AKI alert in general medical patients - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/30089118/>.
550. Grams, M. E. *et al.* A Meta-analysis of the Association of Estimated GFR, Albuminuria, Age, Race, and Sex With Acute Kidney Injury. *Am J Kidney Dis* **66**, 591–601 (2015).
551. Hounkpatin, H. O. *et al.* The association of socioeconomic status with incidence and outcomes of acute kidney injury. *Clin Kidney J* **13**, 245–252 (2020).
552. Hsu, C. Y. *et al.* The risk of acute renal failure in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* **74**, 101–107 (2008).
553. Hodgson, L. E. *et al.* Systematic review of prognostic prediction models for acute kidney injury (AKI) in general hospital populations. *BMJ Open* **7**, e016591 (2017).
554. Ng, S. Y. *et al.* Prediction of acute kidney injury within 30 days of cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* **147**, 1875–1883, 1883.e1 (2014).
555. Jeon, J. *et al.* Risk Prediction for Contrast-Induced Nephropathy in Cancer Patients Undergoing Computed Tomography under Preventive Measures. *J Oncol* **2019**, 8736163 (2019).
556. Mehran, R. *et al.* A simple risk score for prediction of contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention: development and initial validation. *J Am Coll Cardiol* **44**, 1393–1399 (2004).
557. Fortescue, E. B., Bates, D. W. & Chertow, G. M. Predicting acute renal failure after coronary bypass surgery: cross-validation of two risk-stratification algorithms. *Kidney Int* **57**, 2594–2602 (2000).
558. Kheterpal, S. *et al.* Development and validation of an acute kidney injury risk index for patients undergoing general surgery: results from a national data set. *Anesthesiology* **110**, 505–515 (2009).

559. Inohara, T. *et al.* Development and validation of a pre-percutaneous coronary intervention risk model of contrast-induced acute kidney injury with an integer scoring system. *Am J Cardiol* **115**, 1636–1642 (2015).
560. Forni, L. G. *et al.* Identifying the patient at risk of acute kidney injury: a predictive scoring system for the development of acute kidney injury in acute medical patients. *Nephron Clin Pract* **123**, 143–150 (2013).
561. Martin-Cleary, C., Molinero-Casares, L. M., Ortiz, A. & Arce-Obieta, J. M. Development and internal validation of a prediction model for hospital-acquired acute kidney injury. *Clin Kidney J* **14**, 309–316 (2021).
562. Aronson, S. *et al.* Risk index for perioperative renal dysfunction/failure: critical dependence on pulse pressure hypertension. *Circulation* **115**, 733–742 (2007).
563. Malhotra, R. *et al.* A risk prediction score for acute kidney injury in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant* **32**, 814–822 (2017).
564. Mehta, R. H. *et al.* Bedside tool for predicting the risk of postoperative dialysis in patients undergoing cardiac surgery. *Circulation* **114**, 2208–2216; quiz 2208 (2006).
565. Kristovic, D. *et al.* Cardiac surgery-associated acute kidney injury: risk factors analysis and comparison of prediction models. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* **21**, 366–373 (2015).
566. Brown, J. R. *et al.* Multivariable prediction of renal insufficiency developing after cardiac surgery. *Circulation* **116**, I139–143 (2007).
567. Loutradis, C. *et al.* Acute kidney injury is more common in men than women after accounting for socioeconomic status, ethnicity, alcohol intake and smoking history. *Biol Sex Differ* **12**, 30 (2021).
568. Hsu, C.-Y. *et al.* Community-based incidence of acute renal failure. *Kidney Int* **72**, 208–212 (2007).
569. Thakar, C. V., Arrigain, S., Worley, S., Yared, J.-P. & Paganini, E. P. A clinical score to predict acute renal failure after cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol* **16**, 162–168 (2005).

570. Grams, M. E. *et al.* Explaining the racial difference in AKI incidence. *J Am Soc Nephrol* **25**, 1834–1841 (2014).
571. Ng, L. L. *et al.* Proenkephalin and prognosis after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **63**, 280–289 (2014).
572. Vilander, L. M., Kaunisto, M. A. & Pettilä, V. Genetic predisposition to acute kidney injury--a systematic review. *BMC Nephrol* **16**, 197 (2015).
573. Chang, C.-F. *et al.* Gene polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor- $\alpha$  are associated with contrast-induced nephropathy. *Am J Nephrol* **37**, 110–117 (2013).
574. Jouan, J. *et al.* Gene polymorphisms and cytokine plasma levels as predictive factors of complications after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* **144**, 467–473, 473.e1–2 (2012).
575. Saw, K. M. E. *et al.* Association of genetic polymorphisms with acute kidney injury after cardiac surgery in a Southeast Asian population. *PLoS One* **14**, e0213997 (2019).
576. du Cheyron, D. *et al.* Angiotensin converting enzyme insertion/deletion genetic polymorphism: its impact on renal function in critically ill patients. *Crit Care Med* **36**, 3178–3183 (2008).
577. Wu, B. *et al.* Proton pump inhibitors associated acute kidney injury and chronic kidney disease: data mining of US FDA adverse event reporting system. *Sci Rep* **11**, 3690 (2021).
578. Holmes, J. *et al.* Acute Kidney Injury, Age, and Socioeconomic Deprivation: Evaluation of a National Data Set. *Kidney Int Rep* **4**, 824–832 (2019).
579. Huen, S. C. & Parikh, C. R. Predicting acute kidney injury after cardiac surgery: a systematic review. *Ann Thorac Surg* **93**, 337–347 (2012).
580. Chertow, G. M. *et al.* Preoperative renal risk stratification. *Circulation* **95**, 878–884 (1997).
581. Wijeyesundera, D. N. *et al.* Derivation and validation of a simplified predictive index for renal replacement therapy after cardiac surgery. *JAMA* **297**, 1801–1809 (2007).

582. Jiang, W. *et al.* Dynamic Predictive Scores for Cardiac Surgery–Associated Acute Kidney Injury. *J Am Heart Assoc* **5**, (2016).
583. Birnie, K. *et al.* Predictive models for kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) defined acute kidney injury in UK cardiac surgery. *Crit Care* **18**, 606 (2014).
584. Nah, C. W. *et al.* A clinical score to predict acute kidney injury after cardiac surgery in a Southeast-Asian population. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* **23**, 757–761 (2016).
585. Che, M. *et al.* A Clinical Score to Predict Severe Acute Kidney Injury in Chinese Patients after Cardiac Surgery. *Nephron* **142**, 291–300 (2019).
586. Palomba, H., de Castro, I., Neto, A. L. C., Lage, S. & Yu, L. Acute kidney injury prediction following elective cardiac surgery: AKICS Score. *Kidney Int* **72**, 624–631 (2007).
587. Jiang, W. *et al.* Validation of Four Prediction Scores for Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury in Chinese Patients. *Braz J Cardiovasc Surg* **32**, 481–486 (2017).
588. Eriksen, B. O., Hoff, K. R. S. & Solberg, S. Prediction of acute renal failure after cardiac surgery: retrospective cross-validation of a clinical algorithm. *Nephrol Dial Transplant* **18**, 77–81 (2003).
589. Candela-Toha, A. *et al.* Predicting acute renal failure after cardiac surgery: external validation of two new clinical scores. *Clin J Am Soc Nephrol* **3**, 1260–1265 (2008).
590. Albert, C. *et al.* Urinary Biomarkers may Complement the Cleveland Score for Prediction of Adverse Kidney Events After Cardiac Surgery: A Pilot Study. *Ann Lab Med* **40**, 131–141 (2020).
591. Englberger, L. *et al.* Validation of clinical scores predicting severe acute kidney injury after cardiac surgery. *Am J Kidney Dis* **56**, 623–631 (2010).
592. Kalisvaart, M. *et al.* The AKI Prediction Score: a new prediction model for acute kidney injury after liver transplantation. *HPB (Oxford)* **21**, 1707–1717 (2019).
593. Rueggeberg, A. *et al.* Development of a risk stratification model for predicting acute renal failure in orthotopic liver transplantation recipients. *Anaesthesia* **63**, 1174–1180 (2008).

594. Grimm, J. C. *et al.* A risk score to predict acute renal failure in adult patients after lung transplantation. *Ann Thorac Surg* **99**, 251–257 (2015).
595. Wang, Y., Liu, K., Xie, X. & Song, B. Contrast-associated acute kidney injury: An update of risk factors, risk factor scores, and preventive measures. *Clin Imaging* **69**, 354–362 (2021).
596. Bartholomew, B. A. *et al.* Impact of nephropathy after percutaneous coronary intervention and a method for risk stratification. *Am J Cardiol* **93**, 1515–1519 (2004).
597. Gurm, H. S., Seth, M., Kooiman, J. & Share, D. A novel tool for reliable and accurate prediction of renal complications in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol* **61**, 2242–2248 (2013).
598. Zeng, J.-F. *et al.* A simple risk score model for predicting contrast-induced nephropathy after coronary angiography in patients with diabetes. *Clin Exp Nephrol* **23**, 969–981 (2019).
599. Huang, C. *et al.* Enhancing the prediction of acute kidney injury risk after percutaneous coronary intervention using machine learning techniques: A retrospective cohort study. *PLoS Med* **15**, e1002703 (2018).
600. Capodanno, D. *et al.* Risk prediction of contrast-induced nephropathy by ACEF score in patients undergoing coronary catheterization. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* **17**, 524–529 (2016).
601. Hodgson, L. E., Dimitrov, B. D., Roderick, P. J., Venn, R. & Forni, L. G. Predicting AKI in emergency admissions: an external validation study of the acute kidney injury prediction score (APS). *BMJ Open* **7**, e013511 (2017).
602. Koyner, J. L., Carey, K. A., Edelson, D. P. & Churpek, M. M. The Development of a Machine Learning Inpatient Acute Kidney Injury Prediction Model. *Crit Care Med* **46**, 1070–1077 (2018).
603. Churpek, M. M. *et al.* Internal and External Validation of a Machine Learning Risk Score for Acute Kidney Injury. *JAMA Netw Open* **3**, e2012892 (2020).

604. Chiofolo, C., Chbat, N., Ghosh, E., Eshelman, L. & Kashani, K. Automated Continuous Acute Kidney Injury Prediction and Surveillance: A Random Forest Model. *Mayo Clin Proc* **94**, 783–792 (2019).
605. Kim, K. *et al.* Real-Time Clinical Decision Support Based on Recurrent Neural Networks for In-Hospital Acute Kidney Injury: External Validation and Model Interpretation. *J Med Internet Res* **23**, e24120 (2021).
606. Tomašev, N. *et al.* A clinically applicable approach to continuous prediction of future acute kidney injury. *Nature* **572**, 116–119 (2019).
607. Koyner, J. L. *et al.* Urinary biomarkers in the clinical prognosis and early detection of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 2154–2165 (2010).
608. Ibrahim, N. E. *et al.* Blood kidney injury molecule-1 predicts short and longer term kidney outcomes in patients undergoing diagnostic coronary and/or peripheral angiography-Results from the Catheter Sampled Blood Archive in Cardiovascular Diseases (CASABLANCA) study. *Am Heart J* **209**, 36–46 (2019).
609. Schunk, S. J. *et al.* Association between urinary dickkopf-3, acute kidney injury, and subsequent loss of kidney function in patients undergoing cardiac surgery: an observational cohort study. *Lancet* **394**, 488–496 (2019).
610. Simonini, M. *et al.* A new clinical multivariable model that predicts postoperative acute kidney injury: impact of endogenous ouabain. *Nephrol Dial Transplant* **29**, 1696–1701 (2014).
611. Bignami, E. *et al.* Preoperative endogenous ouabain predicts acute kidney injury in cardiac surgery patients. *Crit Care Med* **41**, 744–755 (2013).
612. McBride, W. T. *et al.* Stratifying risk of acute kidney injury in pre and post cardiac surgery patients using a novel biomarker-based algorithm and clinical risk score. *Sci Rep* **9**, 16963 (2019).
613. Jing, Y. *et al.* Multi-omics prediction of immune-related adverse events during checkpoint immunotherapy. *Nat Commun* **11**, 4946 (2020).

614. Buffin-Meyer, B. *et al.* Combination of the fetal urinary metabolome and peptidome for the prediction of postnatal renal outcome in fetuses with PUV. *J Proteomics* **184**, 1–9 (2018).
615. Kistler, A. D. *et al.* Urinary proteomic biomarkers for diagnosis and risk stratification of autosomal dominant polycystic kidney disease: a multicentric study. *PLoS One* **8**, e53016 (2013).
616. Yin, L. *et al.* Early Second-Trimester Peptidomic Identification of Serum Peptides for Potential Prediction of Gestational Diabetes Mellitus. *Cell Physiol Biochem* **51**, 1264–1275 (2018).
617. Argilés, Á. *et al.* CKD273, a new proteomics classifier assessing CKD and its prognosis. *PLoS One* **8**, e62837 (2013).
618. Pontillo, C. *et al.* Prediction of Chronic Kidney Disease Stage 3 by CKD273, a Urinary Proteomic Biomarker. *Kidney Int Rep* **2**, 1066–1075 (2017).
619. Schanstra, J. P. *et al.* Diagnosis and Prediction of CKD Progression by Assessment of Urinary Peptides. *J Am Soc Nephrol* **26**, 1999–2010 (2015).
620. Nkuipou-Kenfack, E. *et al.* A novel urinary biomarker predicts 1-year mortality after discharge from intensive care. *Crit Care* **24**, 10 (2020).
621. Hodgson, L. E. *et al.* The ICE-AKI study: Impact analysis of a Clinical prediction rule and Electronic AKI alert in general medical patients. *PLoS One* **13**, e0200584 (2018).
622. Ribes, D., Belliere, J., Piedrafita, A. & Faguer, S. Glucocorticoid-free induction regimen in severe ANCA-associated vasculitis using a combination of rituximab and eculizumab. *Rheumatology (Oxford)* **58**, 2335–2337 (2019).
623. Marques, C. *et al.* Prognostic Factors in Anti-glomerular Basement Membrane Disease: A Multicenter Study of 119 Patients. *Front Immunol* **10**, 1665 (2019).
624. Piedrafita, A. *et al.* Plasma exchange and thrombotic microangiopathies: From pathophysiology to clinical practice. *Transfus Apher Sci* **59**, 102990 (2020).

625. Belliere, J. *et al.* Ibrutinib does not prevent kidney fibrosis following acute and chronic injury. *Sci Rep* **11**, 11985 (2021).
626. Yamaguchi, K. *et al.* Acquired Evolution of Mitochondrial Metabolism Regulated by HNF1B in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* **13**, 2413 (2021).
627. Wu, G., Aoyama, C., Young, S. G. & Vance, D. E. Early embryonic lethality caused by disruption of the gene for choline kinase alpha, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis. *J Biol Chem* **283**, 1456–1462 (2008).
628. Gallego-Ortega, D. *et al.* Differential Role of Human Choline Kinase  $\alpha$  and  $\beta$  Enzymes in Lipid Metabolism: Implications in Cancer Onset and Treatment. *PLOS ONE* **4**, e7819 (2009).
629. Hernando, E. *et al.* A critical role for Choline Kinase alpha in the aggressiveness of bladder carcinomas. *Oncogene* **28**, 2425–2435 (2009).
630. Ramírez de Molina, A. *et al.* Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 580–583 (2002).
631. Nakagami, K. *et al.* Increased choline kinase activity and elevated phosphocholine levels in human colon cancer. *Jpn J Cancer Res* **90**, 419–424 (1999).
632. Nakagami, K., Uchida, T., Ohwada, S., Koibuchi, Y. & Morishita, Y. Increased choline kinase activity in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *Jpn J Cancer Res* **90**, 1212–1217 (1999).
633. Ramírez de Molina, A. *et al.* Choline kinase is a novel oncogene that potentiates RhoA-induced carcinogenesis. *Cancer Res* **65**, 5647–5653 (2005).
634. Rodríguez-González, A., Ramírez De Molina, A., Bañez-Coronel, M., Megias, D. & Lacal, J. C. Inhibition of choline kinase renders a highly selective cytotoxic effect in tumour cells through a mitochondrial independent mechanism. *International Journal of Oncology* **26**, 999–1008 (2005).



635. Galván-Peña, S. & O'Neill, L. A. J. Metabolic Reprograming in Macrophage Polarization. *Front Immunol* **5**, 420 (2014).
636. Haverty, T. P. *et al.* Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol* **107**, 1359–1368 (1988).
637. Ryan, M. J. *et al.* HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int* **45**, 48–57 (1994).
638. Rauchman, M. I., Nigam, S. K., Delpire, E. & Gullans, S. R. An osmotically tolerant inner medullary collecting duct cell line from an SV40 transgenic mouse. *Am J Physiol* **265**, F416–424 (1993).
639. Ralto, K. M., Rhee, E. P. & Parikh, S. M. NAD<sup>+</sup> homeostasis in renal health and disease. *Nat Rev Nephrol* **16**, 99–111 (2020).
640. Tran, M. T. *et al.* PGC1 $\alpha$  drives NAD biosynthesis linking oxidative metabolism to renal protection. *Nature* **531**, 528–532 (2016).
641. Faivre, A. *et al.* Differential role of nicotinamide adenine dinucleotide deficiency in acute and chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* **36**, 60–68 (2021).
642. KEGG BRITE: KEGG Pathway Maps.  
[https://www.genome.jp/brite/query=00760&htext=br08901.keg&option=-a&node\\_proc=br08901\\_org&proc\\_enabled=map&panel=collapse](https://www.genome.jp/brite/query=00760&htext=br08901.keg&option=-a&node_proc=br08901_org&proc_enabled=map&panel=collapse).
643. Martin-Lorenzo, M. *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)* **95**, 1399–1409 (2017).
644. Martin-Lorenzo, M. *et al.* Urinary Spermidine Predicts and Associates with In-Hospital Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery. *Antioxidants (Basel)* **10**, 896 (2021).
645. Solati, Z., Edel, A. L., Shang, Y., O, K. & Ravandi, A. Oxidized phosphatidylcholines are produced in renal ischemia reperfusion injury. *PLoS One* **13**, (2018).

646. Kaddurah-Daouk, R. & Weinshilboum, R. Metabolomic Signatures for Drug Response Phenotypes-Pharmacometabolomics Enables Precision Medicine. *Clin Pharmacol Ther* **98**, 71–75 (2015).
647. Wagner, A. *et al.* Drugs that reverse disease transcriptomic signatures are more effective in a mouse model of dyslipidemia. *Mol Syst Biol* **11**, (2015).
648. Chen, B. *et al.* Reversal of cancer gene expression correlates with drug efficacy and reveals therapeutic targets. *Nat Commun* **8**, 16022 (2017).