



UNIVERSITE DE STRASBOURG

ECOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 7357

THESE PRESENTEE PAR :

François Faitot

Soutenu le 19 Septembre 2017

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline/Spécialité : Sciences Médicales

Intérêt de la métabolomique par HR-MAS-NMR en chirurgie hépato-biliaire et
transplantation hépatique

Directeur de thèse : NAMER Izzie-Jacques,	<i>PU-PH, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg</i>
Directeur de thèse : BACHELLIER Philippe,	<i>PU-PH, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg</i>
Rapporteur : CONTI Filomena	<i>PU-PH, Assistance Publique- Hôpitaux de Paris, Université Paris Pierre et Marie Curie</i>
Rapporteur : RICHERT Lysiane	<i>PU-PH, Université de Franche-Comté</i>
Examineur : HEYD Bruno	<i>PU-PH, Hôpitaux Universitaires de Besançon</i>
Examineur : ARMSPACH Jean-Paul	<i>IR, Université de Strasbourg</i>

Remerciements

Je remercie vivement le Professeur Izzie-Jacques Namer de m'avoir intégré à son équipe de recherche, pour son aide et son soutien tout au cours de cette thèse. J'espère pouvoir profiter longtemps au cours des futures années de son expérience pour poursuivre cette expérience très enrichissante.

Je remercie vivement le Professeur Philippe Bachellier de m'avoir intégré à son équipe, pour son soutien et son expertise chirurgicale et scientifique. J'espère pouvoir profiter longtemps de son enseignement pratique et théorique dans la prise en charge des patients bénéficiant d'une chirurgie hépato-bilio-pancréatique complexe.

Je remercie le Professeur Lysiane Richert d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. J'espère pouvoir entretenir des relations futures pour poursuivre ces recherches débutées au cours de la thèse.

Je remercie le Professeur Filomena Conti d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et de m'avoir initié à la médecine des transplantés hépatiques à Paris.

Je remercie le Professeur Bruno Heyd d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. J'espère pouvoir lier des coopérations afin de progresser encore dans le domaine de la chirurgie hépato-biliaire.

Je remercie le Professeur Jean-Paul Armspach de m'avoir accueilli dans l'unité IMIS du laboratoire et de faire partie de ce jury.

Je tiens également à remercier très vivement mes maîtres en chirurgie hépatique et transplantation à Paris et Strasbourg et tout particulièrement le Pr Eric Vibert qui m'a communiqué sa passion pour cette superbe spécialité et pour son soutien tout au long de mon apprentissage. Je remercie également chaleureusement les Pr Adam, Castaing, Sa Cunha, Cherqui, Samuel, Azoulay, Belghiti, Soubrane, Scatton, Laurent, Elias, Sauvanet. Mon intérêt pour la recherche en chirurgie hépatique vient pour beaucoup de leur enseignement et des discussions que j'ai pu avoir la chance d'avoir avec eux.

Je remercie tous mes collègues de l'équipe de chirurgie et de transplantation à Strasbourg, Camille, Pietro, Emanuele, Constantin, Vito, Gaël, Andrea, Marie-Lorraine et Bernard sans qui cette recherche n'est pas possible et ne fait que peu de sens.

Je remercie l'ensemble des collègues internes et chefs de clinique de Paris que j'ai croisé avec plaisir particulièrement Gabriella, Oriana, Riccardo, Rafaele, Michele et tous les autres.

Enfin je remercie ma famille, mes parents et mes sœurs, Julie et Marie, pour leur soutien et leur amour.

Merci à ma femme adorée, Valentina, dont j'espère qu'elle sera fière du travail accompli et du parcours et que je remercie de tout mon cœur d'être là toujours à mes côtés, malgré le temps passé à l'hôpital, de me soutenir pour surmonter les difficultés et les doutes. Merci à mes 2 filles chéries, Tania et Nora, pour leur amour qui me permet de sortir du tourbillon du monde d'un travail passionnant. J'espère leur transmettre le goût d'être curieux et d'aller au fond des choses.

Table des figures	7
Table des tableaux	9
Abréviations	10
Préambule	11
Introduction	14
1. Bref rappel des principales voies métaboliques	15
1.1 Maintien du niveau énergétique	15
1.1.1 Glycolyse aéro- et anaérobie	15
1.1.2 L'effet Warburg	16
1.1.3 Métabolisme du glycogène	16
1.1.4 Néoglucogenèse	16
1.1.5 Lipogenèse	17
1.1.6 La voie des pentoses phosphates	18
1.2 Mécanismes régulateurs	18
1.2.1 Système hormonal	18
1.2.3 Les cytokines	19
1.3 Sang portal	19
1.3.1 Flux porte	19
1.3.2 Composition du sang portal	19
2. Fonction de renouvellement et de régénération du métabolisme	20
3. Modifications métaboliques en hépatologie	21
3.1 Modifications métaboliques au cours de la cirrhose	21
3.2 Modifications métaboliques au cours de la maladie stéatosique non alcoolique du foie (NAFLD)	22
4. La régénération hépatique : principes généraux et modifications métaboliques	23
4.1 Principes généraux	23
4.2 Voies de signalisations moléculaires	24
4.3 Modifications cellulaires	25
4.3.1 Au niveau macrocellulaire	25
4.3.2 Au niveau des organelles	25
4.3.2.1 Mitochondrie	25
4.3.2.2 Réticulum endoplasmique	26
4.4 Modifications hémodynamiques locales et régionales	26
4.4.1 Hypertension portale	26
4.5 Rôle du système immunitaire dans la régénération hépatique	28
4.6 Interactions des populations cellulaires au cours de la régénération hépatique	28
4.7.1 Modifications hépatiques du métabolisme glucidique	29
4.7.2 Modifications du métabolisme azoté	30
4.7.3 Modification du métabolisme lipidique	30
5. Métabolomique	34
5.1 Principes généraux	34
5.2 Techniques disponibles de métabolomique	36
5.3 Principes de la métabolomique HR-MAS-NMR	38

Matériel et méthode	40
1. Prélèvement des échantillons	40
2. Préparation des échantillons	40
3. Analyse RMN HRMAS	41
3.1 Equipement	41
3.2 Expériences 1D	42
3.3 Expériences 2D	44
4. Pré-traitement des spectres	47
4.1 Quantification des métabolites	48
5. Analyses statistiques	49
5.1 Analyse de réseau ADEMA	50
5.2 Autres analyses statistiques	51
6. Conduite générale de l'analyse statistique	52
Partie 1 : Intérêt de la métabolomique HR-MAS-NMR au décours des hépatectomies	54
Prédiction de l'insuffisance hépatocellulaire (IHC) post-hépatectomie par métabolomique HR-MAS-NMR : applicabilité pratique et apport dans la compréhension de la physiopathologie de l'IHC	55
La théorie du « soil » revue par la métabolomique HR-MAS-NMR	70
Conclusion de la 1 ^{ère} partie	76
Partie 2 : intérêt de la métabolomique en transplantation hépatique	78
Intérêt de la métabolomique pour l'évaluation du greffon hépatique	86
Lactates au cours de la transplantation : du donneur au receveur	99
Conclusion de la 2 ^{nde} partie	112
Limites générales et perspectives	113
Bibliographie	118

Table des figures

Figure 1 : sensibilité comparée de la spectroscopie RMN et de la spectroscopie MS. Adapté de Sunner et al, 2013.....	37
Figure 2 : principe de la rotation à angle magique ; le rotor contient l'insert dans lequel est placé l'échantillon. Une rotation à un angle magique de $54,74^\circ$ lui est appliqué.	38
Figure 3 : Conséquences de l'application d'une rotation à angle magique sur la résolution du spectre (adapté de Cheng et al., 1997)	39
Figure 4 : dispositif pour l'analyse HR-MAS ; l'échantillon est placé dans l'insert jetable de 30m, lui-même placé dans le rotor fermé par un bouchon à ailettes.....	40
Figure 5 : spectromètre Bruker III Avance 500	41
Figure 6 : spectre ^1H en HR-MAS-NMR de foies cirrhotiques décompensé (en haut) et compensé (en bas). A chaque pic(s) le long de l'axe correspond un métabolite dont la quantité dépend de l'aire sous le pic.	43
Figure 7 : spectre 2D ^1H et ^{13}C d'un échantillon de foie après hépatectomie. Le recouvrement des « tâches » le long de l'axe des abscisses expliquent la limite de quantification de certains métabolites dans certains échantillons.....	44
Figure 8 : échantillonnage des spectres pour l'analyse statistique.....	48
Figure 9 : chevauchement des pics du groupement CH_3 du lactate et de la thréonine centré sur un déplacement chimique entre 1.32 et 1.33, présent sur 5 biopsies, pouvant rendre l'interprétation de la quantification du lactate aléatoire.	49
Figure 10 : réseau métabolique utilisé pour les analyses ADEMA (collaboration Dr N. Dali-Youcef)...	51
Figure 11 : analyse multivariée par PCA des profils métaboliques selon la survenue ou non d'un décès par insuffisance hépatocellulaire pour la population globale (n=45)	60
Figure 12 : analyse multivariée des profils métaboliques en fin d'hépatectomie selon A/ l'extension de l'hépatectomie B/ la réalisation d'une chimiothérapie préopératoire	60
Figure 13 : analyse de réseau ADEMA pour la prédiction d'une insuffisance hépatocellulaire chez les patients opérés d'une hépatectomie à risque.	62
Figure 14 : analyse de réseau ADEMA pour comparant les profils métaboliques de patients cirrhotiques en ACLF stade 2 ou 3 (n=) avec des patients hépatectomisés en insuffisance hépatique mortelle (n=5).....	63
Figure 15 : analyse de réseau ADEMA comparant les profils métaboliques de patients cirrhotiques selon la présence d'une ACLF stade 2 ou 3 versus une absence d'ACLF.....	64
Figure 16 : Analyse OPLS-DA pour le risque de récurrence à 1 an de métastases hépatiques opérées....	72
Figure 17 : analyse de réseau ADEMA pour le risque de récurrence de métastase hépatique après hépatectomie	73
Figure 18 : courbes ROC pour la valeur prédictive de l'ascorbate (à gauche) et de l'éthanolamine (à droite) pour la récurrence des métastases hépatiques en fin d'hépatectomie.....	73
Figure 19 : PLS-DA comparant les profils métaboliques selon le temps d'ischémie froide (> ou < 8h) (panneau du haut) ainsi que pour l'utilisation de donneurs à critères élargis définis selon l'EASL (panneau du bas).....	89
Figure 20 ; analyse de réseau identifiant les métabolites discriminants dans les biopsies de greffon lors de la préparation ex vivo en cas de survenu d'une EAD	90
Figure 21 : courbes ROC pour la valeur prédictive pour l'EAD du contenu en lactate (à gauche) et en phosphocholine (à droite) des greffons lors de la préparation ex vivo	91
Figure 22 : (a) association entre le taux d'interleukine 6 au déclampage et la quantité de lactate intra-hépatique mesurée lors de la préparation ex vivo. (b) association du taux d'interleukine 6 et des	

complications extra-hépatiques et de l'EAD dans une population de 289 patients transplantés entre 2009 et 2013 (c) association entre le taux d'interleukine 6 et la survenue de thrombose de l'artère hépatique post-greffe.	92
<i>Figure 23</i> : analyse de réseau ADEMA identifiant les métabolites discriminants les patients sarcopéniques et non sarcopéniques.....	94
Figure 24 : risque d'EAD selon le risque métabolique du donneur évalué par le taux de lactate et de phosphocholine dans la population globale et selon la présence d'une sarcopénie chez le receveur	95
Figure 25 : résumé de la démarche permettant un matching métabolomique en transplantation hépatique	97
Figure 26 : courbe ROC pour la prédiction de la dysfonction de greffon (courbe de gauche) et pour la perte de greffon à 1 an selon la lactatémie à la reperfusion.	102
Figure 27 : courbe ROC pour la prédiction de la dysfonction de greffon (à gauche) et pour la perte de greffon à 1 an (à droite) selon la lactatémie du donneur avant le prélèvement.	103
Figure 28 : courbe ROC pour la prédiction de la dysfonction de greffon selon le contenu de lactate intra-hépatique lors de la préparation du greffon.	104
Figure 29 : valeurs moyennes et variations du taux de lactate au niveau artériel, portal et sus-hépatique selon le moment de la greffe (début en haut, fin en bas).	105
Figure 30 : incidence de la dysfonction de greffon selon la production de lactate par le foie et par l'intestin au début et en fin de greffe	106
Figure 31 : courbe ROC pour la prédiction de la survenue d'une dysfonction de greffon selon la production de lactate par l'intestin grêle en fin de transplantation.....	107

Table des tableaux

Tableau 1 : liste des métabolites identifiés par HSQC avec déplacement chimique en ^1H et ^{13}C pour chaque groupement.....	45
Tableau 2 : caractéristiques des patients inclus et facteurs prédictifs d'insuffisance hépatocellulaire mortelle après hépatectomie.....	58
Tableau 3 : paramètres pré- et per-opératoires évalués en OPLS-DA pour identifier des facteurs associés à des profils métaboliques distincts.....	61
Tableau 4 : quantification des métabolites selon la survenue d'une insuffisance hépatocellulaire mortelle ou non.....	62
Tableau 5 : caractéristiques des patients inclus dans l'analyse du risque de récurrence à 1 an par la métabolomique.....	71
Tableau 6: facteurs liés au donneur ou au receveur prédictifs de dysfonction ou de perte de greffon identifiés dans la littérature par au moins 2 études.....	84
Tableau 7 : caractéristiques des receveurs et des donneurs inclus dans l'étude.....	87
Tableau 8 : quantification des métabolites selon la survenue ou non d'une EAD.....	89
Tableau 9 : Facteur prédictifs de dysfonction précoce de greffon identifiés par analyse univariée	93

Abréviations

HR-MAS-NMR : High Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance

ATP : Adenosine TriPhosphate

ACLF : Acte-on-Chronic Liver Failure

MHCCR : Métastase hépatique de cancer colo-rectal

CHC : Carcinome Hépato-Cellulaire

mTOR : mammalian Target of rapamycin

AMPK : Adenosine Monophosphate Kinase

NASH : Non Alcoholic Steato-Hepatitis

NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease

PEPCK : Phospho Enol Pyruvate C Kinase

OPLDS-DA : Orthogonal Partial Least Square-Discriminant Analysis

LDH : Lactate DesHydrogénase

PLS-DA : Partial Least Square-Discriminant Analysis

ADEMA : Algorithm to Determine Expected Metabolite Level Alterations Using Mutual Information

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

ECMO : Extracorporeal Membrane Oxygenation

MAT : Méthione-AdénosylTransférase

PK : Pyruvate Kinase

MELD : Model for End-stage Liver Disease

TIF : Temps d'Ischémie Froide

EAD : Early Allograft Dysfunction

TH : Transplantation Hépatique

IL6 : Interleukine 6

HGF : Hepatocyte Growth Factor

EGF : Epidermal Growth Factor

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

IHC : Insuffisance Hépato-Cellulaire

CPMG : Carr-Purcell-Meiboom-Gill

Préambule

Les pathologies tumorales et la cirrhose représentent une cause importante de mortalité dans les pays occidentaux. Alors que la mortalité par cancers diminue globalement, celle du cancer du foie reste identique à son incidence. Elle augmente même pour le cholangiocarcinome. L'« épidémie » de syndrome métabolique, l'extension des infections virales B et C dans le monde – malgré l'avènement des nouveaux traitements antiviraux – et la prévalence toujours élevée du cancer du côlon font de la chirurgie hépatique une spécialité en expansion comme en témoigne l'explosion de la production scientifique dans le domaine.

La complexité des mécanismes physiologiques impliquant la glande hépatique et son rôle central dans la régulation des métabolismes rendent les progrès lents et ne permettent pas de lever un paradoxe central de la chirurgie hépatique oncologique. Ce paradoxe repose sur le fait que la capacité du foie à régénérer est basée sur les mêmes mécanismes moléculaires que ceux de l'oncogenèse. Ainsi - de façon quelque peu simpliste - le traitement chirurgical du cancer du foie favorise le cancer du foie primitif ou métastatique ou peut provoquer le décès du patient par insuffisance hépatocellulaire. En effet, les voies de signalisation de la régénération hépatique après une agression et celle de l'oncogenèse sont communes en bien des points.

L'absence de système de suppléance du foie conduit à une attention particulière quant à l'appréciation du risque d'insuffisance hépatocellulaire chez les patients atteints de pathologie du foie, après résection ou après transplantation. De plus, l'absence de thérapeutique efficace de l'insuffisance hépatocellulaire conduit à limiter l'extension des interventions malgré des besoins croissants. Les voies de recherche dans le traitement et la prévention de l'insuffisance hépatocellulaire sont nombreuses et portent tant sur le système immunitaire, l'interaction hôte-bactérie, la circulation splanchnique et/ou systémique, mais se heurte souvent au paradoxe régénération/croissance tumorale de la chirurgie hépatique. Ces 2 systèmes prolifératifs semblent irrémédiablement liés rendant aléatoires de réels progrès dans le domaine.

Les modifications du métabolisme cellulaire dans les systèmes multicellulaires en prolifération ont principalement été étudiées dans le modèle du cancer. Ces recherches ont permis le développement d'outils diagnostics (imagerie nucléaire fonctionnelle et métabolique notamment) mais n'ont pas été appliquées à la prédiction ou à la recherche de cible de traitement de l'insuffisance hépatocellulaire. Au vu de la complexité des mécanismes métaboliques au niveau du foie, des méthodes intégratives permettant d'analyser un ensemble d'acteurs cellulaires, moléculaires ou génétiques sont nécessaires. Elles font l'objet d'un développement exponentiel actuellement sous la forme des *omics* (génomique, transcriptomique, protéomique...). Leurs limites reposent principalement sur leur

applicabilité clinique puisque la plupart de ces techniques nécessitent un temps incompatible avec le temps clinique.

La métabolomique fait partie de ces méthodes intégratives. Elle a pour but d'analyser des profils métaboliques complexes par l'identification des petites molécules issus du métabolisme cellulaires, les métabolites. Une méthode spécifique de métabolomique, la résonance magnétique à haute résolution avec rotation à angle magique (HR-MAS-NMR), pourrait permettre de pallier à l'inadéquation des temps clinique et diagnostique. En effet, cette technique permet d'obtenir, dans le temps d'une analyse extemporanée, un profil métabolique qui pourrait prédire le risque d'insuffisance hépatocellulaire après hépatectomie ou le retard à la reprise de fonction d'un greffon hépatique.

L'objectif de cette thèse est donc d'analyser l'intérêt de la métabolomique par HR-MAS-NMR en chirurgie hépatobiliaire et transplantation. Pour ce faire, le travail a été séparé en 2 parties, la première concernant l'évaluation de cette méthode pour identifier des mécanismes métaboliques prédictifs de dysfonction hépatique chez le patient cirrhotique ou après hépatectomie, la seconde l'évaluation des greffons hépatiques par métabolomique HR-MAS-NMR.

Afin d'atteindre ces 2 objectifs, il est nécessaire de rappeler quelques éléments de base du métabolisme cellulaire et plus spécifiquement du métabolisme cellulaire au niveau hépatique. Puis les mécanismes de la régénération hépatique qui constitue le grand principe sur lequel se base la chirurgie hépatobiliaire seront rappelés. Nous verrons quels sont les éléments qui permettent d'envisager l'existence d'une régulation métabolique de la régénération hépatique par 1/ une analyse des modifications cellulaires et moléculaires au cours de la régénération 2/ une analyse des modifications systémiques circulatoires (hypertension portale) et immunitaires (syndrome inflammatoire systémique et bactériémie) dans la cirrhose et après hépatectomie. Le modèle du métabolisme du cancer servira de référence et sera détaillé en identifiant et décrivant les principales voies métaboliques modifiées dans ce type de système prolifératif.

Introduction

La chirurgie hépatobiliaire oncologique et la transplantation s'adresse à des patients présentant pathologies tumorales ou des pathologies du parenchyme hépatiques impliquant l'engagement du pronostic vital à plus ou moins court terme. En effet, le foie est un organe vital de part ces rôles de régulation métabolique et dans l'immunité. A la jonction de la circulation splanchnique et de la circulation générale, entre les intestins, site d'absorption des nutriments et le système cardio-pulmonaire, il est soumis à un environnement complexe et changeant. L'agression représentée par la réduction de son volume – pour la résection – ou par l'ischémie froide imposée lors de la conservation du greffon peut conduire à une dysfonction hépatique. Or le foie est un organe vital pour lequel il n'existe actuellement aucun système de suppléance à l'inverse du cœur (« cœur artificiel », ECMO) ou du rein (dialyse et autre thérapies de substitution). La survie du patient présentant une insuffisance hépato-cellulaire dépend en fait de la capacité qu'a le foie de régénérer dans les suites d'une agression.

La régénération hépatique – bien qu'étant un terme inapproprié puisqu'il n'y a pas de restitution *ad integrum* de la structure hépatique initiale – correspond à la réponse de la glande hépatique à toute agression. Elle est reconnue depuis l'Antiquité comme en témoigne le mythe de Prométhée. Elle fait l'objet de très nombreuses recherches qui portent sur les différentes populations cellulaires du foie, sur les modifications hémodynamiques de cet organe doublement vascularisé par une artère et une veine porte, sur l'impact de l'activation de l'immunité innée ou acquise, sur le microenvironnement.

L'analyse du métabolisme au cours de la régénération hépatique pourrait permettre d'identifier des voies métaboliques distinctes de celle de l'oncogenèse qui permettrait de rompre le paradoxe sus-cité. Peu de données existent chez l'homme dans ce domaine. A l'inverse, il existe de nombreuses données de métabolisme des systèmes en prolifération telle que le cancer. Un certain nombre de données émergent également dans la cirrhose qui s'accompagne d'un stimulus particulier de régénération responsable de la fibrose.

Ainsi les modifications métaboliques connues au cours de la régénération hépatique seront analysées dans un 1^{er} temps en prenant appui sur les données de la littérature concernant les systèmes en prolifération. Les déterminants du métabolisme hépatique seront revus avant d'étudier l'intérêt potentiel d'une analyse métabolique globale dans la prédiction des suites après hépatectomie et transplantation.

1. Bref rappel des principales voies métaboliques

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions chimiques permettant à l'organisme de se maintenir en vie, de se reproduire et ou de régénérer. Il comprend donc l'ensemble des voies permettant le maintien d'un niveau énergétique suffisant à la machinerie cellulaire pour fonctionner mais également l'ensemble des voies permettant la (re)constitution de l'ensemble des organelles permettant la prolifération/régénération cellulaire. Ce dernier point est particulièrement important dans le foie, compte tenu de sa capacité à régénérer en réponse à une agression.

1.1 Maintien du niveau énergétique

L'énergie de la cellule est principalement déterminée par le niveau d'ATP, molécule énergétique principale qui participe à un grand nombre de réactions chimiques et au fonctionnement cellulaire. Un niveau d'ATP suffisant est nécessaire pour le maintien de l'intégrité mitochondriale ainsi que pour le maintien du fonctionnement de pompes membranaires comme la Na⁺/K⁺ ATPase. La formation de l'ATP est donc un enjeu important pour l'organisme car un défaut en ATP peut conduire à la nécrose ou l'apoptose cellulaire ainsi qu'à la formation de radicaux libres, eux-mêmes toxiques pour la cellule. Le foie joue un rôle central dans la mise à disposition des métabolites énergétiques et possède une large panoplie d'enzyme à cette fin. Le métabolisme hépatique est hautement versatile dans le sens où son état métabolique varie selon l'état anabolique ou catabolique. La glycolyse permet la production de pyruvate qui peut être soit oxydé (phosphorylation oxydative) soit être orienté vers la lipogenèse par l'intermédiaire de l'acétyl-CoA. En phase postprandial ou dans la plupart des cas d'excès, le foie stocke les sucres sous forme de glycogène (glycogénogénèse) ou fabrique des lipides (lipogenèse) qui seront stockés dans les tissus adipeux. En phase de jeûne ou d'agression, le foie devient producteur de glucose soit par mise à disposition du glycogène qui est dégradé (glycogénolyse) soit par synthèse de novo à partir du lactate, des acides aminés glucoformateurs, du glycérol et du pyruvate).

Nous allons brièvement explorer ces différentes voies métaboliques

1.1.1 Glycolyse aéro- et anaérobie

La glycolyse consiste en l'ensemble des réactions chimiques qui conduisent à la dégradation du glucose en pyruvate. La présence ou non d'oxygène ainsi que les réserves en ATP détermineront la destinée de ce pyruvate. La 1^{ère} étape est représentée par une augmentation du transport en glucose par l'augmentation de l'expression des transporteurs membranaires (GLUT). Parmi les principales enzymes de cette voie métabolique sont : la *phosphofructokinase* (PFK) dont l'activité est régulée par l'AMPK et la *pyruvate kinase* (PK) qui transforme le phospho-énol-pyruvate (PEP) en pyruvate. Les

différentes isoformes de la *pk* sont déterminantes dans la prolifération cellulaire comme montré par une agressivité plus importante de cancers exprimant l'isoforme M2 qui est associée à un effet Warburg.¹ La voie de signalisation de mTOR joue un rôle dans le switch de l'isoforme M1 vers M2 et son inhibition par l'acide oléanique inhibe la glycolyse aérobie.²

Le pyruvate peut alors suivre 3 voies métaboliques : il peut être transformé soit en lactate par la *lactate déshydrogénase* (LDH) – classiquement décrite en situation d'hypoxie (glycolyse anaérobie) - soit entrer dans le cycle de Krebs ou participer à la lipogenèse sous l'action de la *pyruvate déshydrogénase* (PDH).

1.1.2 L'effet Warburg

Décrit dans les années 1930 par Otto Heinrich Warburg, la glycolyse aérobie consiste en la dégradation du glucose en pyruvate puis la transformation du pyruvate en lactate par les LDH en l'absence d'hypoxie. En effet, en cas d'hypoxie, des facteurs de transcription et notamment l'HIF-1 α et l'absence d'O₂ pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale provoque la formation de lactate. Dans le cas de l'effet Warburg, cette réaction se fait en l'absence d'hypoxie. Le lactate et le pyruvate jouent un rôle dans la régulation de l'expression de HIF1 α entraînant l'activation de la glycolyse indépendamment des besoins cellulaires en ATP et des conditions d'oxygénation. Un dysfonctionnement mitochondriale pourrait également être à l'origine de ce phénomène qui est, en fait, rencontré dans d'autres systèmes cellulaires en prolifération comme nous verrons plus loin.

1.1.3 Métabolisme du glycogène

Le foie constitue la principale réserve de glycogène. La glycogénogénèse est la voie métabolique du glucose privilégiée par le foie au décours des repas ou en cas d'augmentation du glucose portal sous l'action de l'insuline. La glycogénolyse survient lors des phases cataboliques.

1.1.4 Néogluco-genèse

La néogluco-genèse peut se faire à partir de différents métabolites dont les acides aminés glucoformateurs (AAgf). Parmi ceux-ci les principaux AAgf utilisés par le foie, on trouve l'alanine, la glutamine et le glutamate.

La glutaminolyse constitue une des principales alternatives au métabolisme du glucose en apportant des métabolites du cycle de Krebs notamment l' α -cétoglutarate. Là encore, la 1^{ère} étape est représentée par le transport dans la cellule de la glutamine provenant du tube digestif. Cette production de glutamine est dépendante de l'état de la muqueuse digestive et du microbiote

intestinale, d'où un rôle majeur du tube digestif dans les mécanismes métaboliques hépatiques. L'entrée de glutamine se fait au dépend d'une molécule de sodium de façon associée à l'eau afin de réduire l'hyperosmolarité ce qui peut expliquer l'œdème cellulaire concomitant. La glutamine est ensuite dégradée en glutamate par la glutaminase puis en α -cétoglutarate ou en GABA, neurotransmetteur dans le système nerveux mais métabolite dans le foie. Il est connu depuis longtemps qu'il n'existe pas, en situation physiologique, de différence de concentration en glutamine entre la veine porte et les veines sus-hépatiques. Ceci serait lié au fait que les hépatocytes péri-veineux sont équipés de glutamine synthétase qui reforme de la glutamine.

La néoglucogenèse à partir de l'alanine, la sérine et la cystéine passe par le pyruvate qui est également l'intermédiaire pour la néoglucogenèse à partir du lactate.

La néoglucogenèse à partir des acides aminés fait intervenir des enzymes bien connus en hépatologie que sont les transaminases. Certains auteurs interprètent d'ailleurs l'élévation des transaminases dans certaines situations comme la NASH ou l'hépatite comme une adaptation métabolique.³ Un co-enzyme, le phosphate de pyridoxal, est nécessaire à ces réactions. L'*alanine aminotransférase* (ALAT) permet la formation de pyruvate et d' α -cétoglutarate à partir de l'alanine et du glutamate respectivement. Cette réaction a lieu principalement dans les organes périphériques et notamment dans le muscle. Dans le foie, elle est catabolisée par la réaction inverse régénérant le pyruvate pour le cycle de Krebs ou la néoglucogenèse. Ce cycle est appelé cycle glucose-alanine ou cycle de Cori. Lors de la dernière réaction, un résidu azoté est produit, qui entrera dans le cycle de l'urée. L'*aspartate aminotransférase* et la *glutamate déshydrogénase* permet la formation d' α -cétoglutarate à partir du glutamate. La LDH permet la formation de pyruvate à partir du lactate.

1.1.5 Lipogenèse

La lipogenèse est activée concomitamment à la glycolyse en phase postprandiale ou anabolique.

Brièvement la lipogenèse nécessite la dégradation du glucose en pyruvate et le passage de la mitochondrie du citrate dans le cytosol. C'est à partir du citrate que sera formé l'acétyl-CoA puis l'acyl-CoA pour la formation des triglycérides.

Au niveau du foie, la synthèse du cholestérol à partir des triglycérides participe à la formation de la bile. La formation des phospholipides est également très importante au niveau du foie particulièrement la formation des phosphocholines et phosphoéthanolamines. En phase postprandiale, seuls 25% des macromolécules lipidiques arrivent au foie par la veine porte, le reste étant transporté sous forme de chylomicrons vers le tissu adipeux. La part de glycérides arrivées au foie sert à la formation d'énergie par la β -oxydation, à la formation de VLDL, forme de régulation fine

des acides gras dans l'organisme, et peut participer à la formation de phospholipides nécessaires à la formation des membranes cellulaires.

La phosphatidyl-choline (Pdt-choline) puis la glycérophosphocholine (GP-choline) sont synthétisés soit à partir de la choline par la voie de CDP-choline soit à partir de la phosphatidyl-éthanolamine (Pdt-éthanolamine) par l'action de la PEMT ou LCAT. A noter que la S-adenosylméthionine (SAME) est nécessaire à la conversion de la phosphatidyléthanolamine en phosphatidylcholine. La SAME est un produit du métabolisme azoté formé par l'action de la méthionine-adénosyltransférase (MAT) dont nous verrons qu'elle distingue des sous-types de maladies stéatosiques du foie.

La bétaine est un dérivé de la choline qui participe au métabolisme des dérivés méthylés, particulièrement dans la détoxification de l'homocystéine dont l'excès est associé à l'inflammation vasculaire et à l'athérosclérose.

Il est par ailleurs important de noter que la formation des lipides nécessite du NADPH, produit à partir de la réduction du NADP⁺. Ceci a lieu par différentes voies métaboliques dont la voie (ou shunt) des pentoses-phosphates et par le biais des enzymes maliques.

1.1.6 La voie des pentoses phosphates

Sans entrer dans les détails de cette voie métabolique, il convient d'en souligner l'importance tant métabolique pour la synthèse lipidique que pour la formation du ribose-5-phosphate, précurseur des acides nucléiques.

1.2 Mécanismes régulateurs

1.2.1 Système hormonal

Le ratio insuline/glucagon est un déterminant majeur du métabolisme hépatique. Sécrétées par le pancréas, ces hormones régulent et coordonnent les différentes voies métaboliques sus-citées. Elle jouent notamment un rôle dans l'activité de l'AMPK.

L'AMPK est une molécule fondamentale, senseur énergétique cellulaire, notamment senseur du niveau d'ATP. Elle va donc réguler un ensemble de voies métaboliques pour inhiber ou stimuler la génération d'ATP. Au niveau moléculaire, l'activation de l'AMPK entraîne une upregulation du gène SHP et une inhibition transcriptionnelle de PECK et G6 phosphatase. La production d'ATP est stimulée dans toutes les circonstances de stress cellulaire en activant la glycolyse et l'oxydation lipidique via l'AMPK. Le ratio AMP/ATP est un des déterminants majeurs de l'activité de l'AMPK mais pas seulement. L'activité de l'AMPK est stimulée par le glucagon et inhibé par l'insuline. L'AMPK est

également stimulée par les glucocorticoïdes, la bétaine, la metformine mais inhibée par la ghreline, les endocannabinoïdes.

1.2.2 Les catécholamines

L'adrénaline et la noradrénaline sont 2 hormones surrénaliennes dites du stress qui régulent le métabolisme hépatique. D'une part, une action directe modifie l'activité enzymatique pour réguler la glycolyse et la lipogenèse, d'autre part une action indirecte en modifiant le flux splanchnique et notamment portal modifie l'activité métabolique du foie.

1.2.3 Les cytokines

Les cytokines pro-inflammatoires, outre leur effet d'activation des cellules immunitaires qui vont modifier le milieu notamment par la fabrication de radicaux libres et l'acidification consécutive de leur environnement, ont un effet sur les voies métaboliques par une action sur certains facteurs de transcription. Il est décrit une stimulation de la glycolyse en lien avec l'activation par l'interleukine 6 de son récepteur.

1.3 Sang portal

1.3.1 Flux porte

Le flux portal est un facteur déterminant de la fonction hépatique notamment de sa fonction de synthèse et de détoxification. Ceci est bien montré par le test au vert d'indocyanine qui consiste à injecter par voie systémique un produit vert (dont la quantité est ainsi mesurable par densité optique - DO) et à en mesurer la vitesse d'élimination. Le vert d'indocyanine étant exclusivement éliminé par voie biliaire, son élimination du secteur plasmatique permet d'évaluer la fonction excrétrice du foie. L'un des paramètres majeurs déterminant la clairance du vert d'indocyanine est le débit portal rendant ce test inutile chez le cirrhotique avec thrombose portale, par exemple.

1.3.2 Composition du sang portal

La composition du sang portal est déterminante. Non seulement il apporte les sécrétions hormonales du pancréas (insuline/glucagon) dont l'équilibre détermine le métabolisme hépatique des glucides et des lipides, il contient également l'ensemble des nutriments absorbés par le tube digestif. La concentration en acides aminés, glucose etc ... est en lui-même un déterminant de ces métabolismes. Aussi les fonctions métaboliques du foie sont modifiées selon les capacités d'absorption du tube digestif. Aussi les modifications d'apport nutritionnel que les lésions histologiques du tube digestif peuvent altérer le fonctionnement du foie.

Un élément fondamental de plus en plus étudié actuellement est la flore intestinale dont une part non négligeable circule dans la circulation portale et est éliminé par le foie et ses cellules immunitaires résidentes. Cette flore intestinale possède une activité métabolique propre. Il est récemment rapporté que les bactéries du tube digestif produisent du lactate qui est utilisé par les mitochondries du tube digestif au contact. La composition de cette flore intestinale fait l'objet de nombreuses études car elle aurait un rôle majeur dans certaines pathologies hépatiques. Les patients cirrhotiques ou les patients atteints de NASH présentent des flores digestives altérées qui pourraient stimuler l'inflammation. Le microbiote pourrait également directement agir sur le métabolisme du tube digestif qui entraîne à son tour une modification du métabolisme hépatique. La supplémentation en glutamine a ainsi montré qu'elle modifiait de façon significative le métabolisme hépatique et diminue l'inflammation. Celle-ci pourrait être en partie associée aux altérations métaboliques, l'inhibition de la phosphorylation oxydative étant associée à une diminution de l'inflammation dans un modèle de NASH. Il est également montré que le métabolisme hépatique est modifié par le type de flore intestinale, le microbiote étant un des déterminants de l'insulino-résistance du diabétique par exemple.

2. Fonction de renouvellement et de régénération du métabolisme

L'organisme en prolifération présente la caractéristique de devoir assurer 2 fonctions apparemment contradictoire : prolifération cellulaire (avec la nécessité de constituants cellulaires « nouveaux ») et métabolisme énergétique (un niveau énergétique suffisant étant la condition sine qua non pour assurer la possibilité d'une division cellulaire). Dans les 2 cas, le glucose constitue le carburant pour ces 2 fonctions : génération de biomasse et production d'ATP. Une molécule de glucose permet la génération de 36 ATPs via l'oxydation complète, de 30 ATPs et 2 NADPHs via la voie des pentoses-phosphate ou 6 carbones pour la synthèse de macromolécules. La synthèse du palmitate, constituant indispensable de la membrane cellulaire nécessite par exemple 7 molécules d'ATP, 16 carbones provenant de 8 acétyl-CoA et 28 électrons provenant de 14 molécules de NADPH (NADH⁺ réduit). Ainsi une molécule de glucose produit 5 fois la quantité nécessaire d'ATP mais 7 molécules de glucose sont nécessaires pour générer le NADPH nécessaire. Ainsi la phosphorylation oxydative est nettement moins rentable que la glycolyse aérobie dans le cadre d'un système en prolifération.⁴

Le renouvellement cellulaire nécessite une quantité importante de lipides, notamment de phospholipides pour la synthèse des membranes cellulaires. Le foie est un organe central dans la régulation de la biosynthèse des lipides. En phase postprandiale, seuls 25% des macromolécules lipidiques arrivent au foie par la veine porte, le reste étant transporté sous forme de chylomicrons

vers le tissu adipeux. La part de glycérides arrivées au foie sert à la formation d'énergie par la β -oxydation, à la formation de VLDL, forme de régulation fine des acides gras dans l'organisme, et peut participer à la formation de phospholipides nécessaires à la formation des membranes cellulaires.

Les atteintes ou agressions des organes sont associées à la nécessité d'un renouvellement cellulaire qui est particulièrement marqué dans le foie. La régénération hépatique est ainsi un modèle régénératif très largement étudié. La connaissance des mécanismes de la régénération hépatique permettrait donc d'envisager les modifications métaboliques attendues. Toutefois il convient de distinguer la régénération hépatique après perte de volume comme celle qui survient après une hépatectomie, de la régénération hépatique qui survient après une atteinte toxique aiguë ou chronique. Nous nous attarderons dans un 1^{er} temps sur les modifications métaboliques observées dans les atteintes chroniques du parenchyme hépatique qui sont relativement bien décrites. Deux modèles peuvent être particulièrement intéressants dans le cadre de cette thèse puisqu'il s'agit d'atteinte parenchymateuse fréquemment observée chez les patients nécessitant une chirurgie hépatique : la cirrhose et la stéatose hépatique non alcoolique (NASH)

3. Modifications métaboliques en hépatologie

La qualité du parenchyme hépatique est également un déterminant majeur du métabolisme hépatique. Bien qu'il s'agisse de données récentes, un grand nombre d'articles ont montré une modification significative du niveau d'activité des voies différentes voies métaboliques, notamment en fonction du stade de l'atteinte hépatique. Ceci semble particulièrement marquant dans la cirrhose.

3.1 Modifications métaboliques au cours de la cirrhose

Il est clairement établi qu'il existe des modifications du métabolisme hépatique au cours de la cirrhose et que ces modifications sont évolutives. Ainsi des études métabolomiques ont montré que le profil métabolique était significativement différent en fonction du degré d'atteinte hépatique (fibrose versus cirrhose). Il est noté principalement une diminution du taux de glucose, d'alanine et de leucine.⁵ Une étude particulièrement précise⁶ a montré que le foie cirrhotique adapte la fabrication d'ATP en augmentant le flux glycolytique au dépend d'une baisse de la phosphorylation oxydative notamment par une augmentation de l'absorption des acides aminés. A la phase initiale compensée de la cirrhose, cette adaptation métabolique suffit mais dans le cadre de la cirrhose décompensée, le foie perd la capacité d'assurer un niveau d'ATP suffisant en voyant l'absorption des acides aminés diminuer. L'expression des enzymes de la glycolyse s'effondre notamment de la G6PD, de la pyruvate déshydrogénase et de la phosphoglucomutase. La baisse de production d'ATP

consécutives entraîne la souffrance hépatique et la dysfonction aiguë sur atteinte chronique connue sous le sigle d'ACLF.⁷

3.2 Modifications métaboliques au cours de la maladie stéatosique non alcoolique du foie (NAFLD)

Les atteintes métaboliques de la NAFLD touchent tout autant le métabolisme glucidique que le métabolisme lipidique. Ainsi il est maintenant clairement établi le rôle central de l'insulino-résistance dans la pathogénie de la NASH. Cette insulino-résistance se traduit par une accumulation hépatique de lipides, principalement sous la forme de triglycérides alors même que la glycémie est normale voire haute.⁸

La plupart des études du métabolisme de foie de NAFLD porte sur le métabolisme lipidique. Il est notamment montré que la quantité de phosphocholine est réduite au dépend de la phospho-éthanolamine. L'accumulation de triglycérides et leur utilisation pour l'entretien du niveau énergétique de la cellule par la β -oxydation est associée à une inflammation locale responsable de la stéatohépatite non alcoolique (NASH). Le modèle de NASH représente un excellent modèle pour étudier dans le cadre des hépatectomies du fait de l'accumulation de triglycérides en post-hépatectomie immédiate. Des études récentes ont montré l'impact majeur de l'activation de la glycolyse – qui est associée à la lipogenèse – dans l'inflammation locale.⁹ Ainsi, dans un modèle de souris NASH, il est mis en évidence une association entre métabolisme oxydatif et inflammation. Le stress oxydatif et l'inflammation était inhibée par l'administration de metformine et chez les souris knock-out pour la PEPCK (*Pck1*) soulignant le lien entre glycolyse accélérée et inflammation.

Une étude métabolomique récente a montré qu'il existe des profils métaboliques différents au sein des patients atteints de NAFLD. Ces différents profils correspondent à des profils distincts de souris KO ou non pour la méthionine-adényltransférase. Ainsi il est possible de distinguer des populations de patients dont la composition de la stéatose diffère en termes de SAMES et de triglycérides, céramides, diacylglycérides.¹⁰

4. La régénération hépatique : principes généraux et modifications métaboliques

4.1 Principes généraux

Le terme de régénération hépatique n'est pas tout à fait adéquat puisqu'il n'y a pas restitution *ad integrum* de la structure du foie mais plutôt hyperplasie puis hypertrophie du parenchyme restant. La régénération hépatique est un mécanisme hautement complexe qui implique l'ensemble des cellules du foie depuis l'hépatocyte à la cellule endothéliale sinusoidale en passant par les cellules de l'immunité innée. Les modèles d'études de la régénération hépatique comprennent 1/ l'hépatectomie des 2/3 dans un modèle murin et 2/ l'injection de produits toxiques pour le foie (CCl₄ par exemple). Il est important de noter que les mécanismes à l'origine de ces 2 types de régénérations ne sont pas identiques. Elles impliqueraient des voies de signalisation initialement différentes et les cellules à l'origine de l'hypertrophie ne seraient pas les mêmes. En effet, il est primordial de distinguer les modèles de régénération par stimulation chronique (exposition prolongée à une inflammation, principale mode de régénération au cours de la cirrhose) et une stimulation aiguë (hépatectomie ou toxicité aiguë). Au sein de ce dernier groupe, la régénération hépatique après réduction de volume représente le modèle auquel nous nous référerons le plus. Toutefois, comme nous le verrons plus tard, les données de métabolisme au cours de la régénération sont plus fréquentes dans le cadre de la cirrhose qu'après hépatectomie. Surtout elles correspondent plus à la situation clinique qui s'adresse principalement à des patients dont le parenchyme hépatique n'est pas sain, ce qui favorise le développement de cancers.

Comme écrit plus haut, l'analyse de la régénération a, à tort, porté longtemps uniquement sur la capacité des hépatocytes à proliférer. Les études sur la division cellulaire des hépatocytes ont montré que la synthèse d'ADN débutait très précocement (12h) avec un pic à la 24^{ème} heure. L'entrée en phase S des hépatocytes quiescents a longtemps été considérée comme un déterminant majeur de la survie après hépatectomie. Toutefois il est important de considérer que seule une petite fraction des hépatocytes entre en mitose (phase M) et que ce nombre est bien inférieur au nombre de cellules entrées en phase S ce qui conduit à une augmentation de la ploïdie hépatocytaire dans les suites d'un stimulus de régénération. La polyploïdie semble inhibée secondairement les vagues successives de synthèse d'ADN.¹¹

4.2 Voies de signalisations moléculaires

Les principaux facteurs de croissance, facteurs de transcription et voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la régénération hépatique sont largement étudiés.¹² Le but de cette revue n'est pas de revoir l'ensemble des voies de signalisation de la régénération hépatique mais de connaître les voies de signalisation activées et d'identifier les voies métaboliques modulées par ces voies de signalisation.

On distingue 2 grandes voies de signalisation impliquée précocement dans la régénération hépatique.

La 1^{ère} est l'activation des NF- κ B et STAT3 par l'interleukine 6 (IL6) via son récepteur gp130. La sécrétion de l'IL6 a longtemps semblé uniquement paracrine par l'activation des cellules de Küpffer, macrophages résidents du foie. Elle provient en fait de nombreuses cellules notamment des cellules endothéliales sinusoidales. Il s'agit d'une cytokine pléiotrope qui agit non seulement au niveau du foie mais également au niveau des organes à distance. La réponse inflammatoire systémique, en réponse à toute agression, passe en grande partie par l'IL6, qui entraîne au niveau du foie la traduction des gènes très précoces. Il faut toutefois noter que l'absence de récepteurs n'entraîne qu'un délai dans la régénération ce qui témoigne de nombreux mécanismes redondants régulant ce phénomène complexe.

En dehors de la voie cytokinique, de nombreux facteurs de croissance ont été identifiés dans le sérum d'animaux hépatectomisés. Parmi les plus importants dans la régénération hépatique, HGF, EGF et VEGF sont les plus étudiés. Ces différentes molécules activent des voies de signalisation différentes comme présenté dans le tableau. Parmi les facteurs de transcription activés, mTOR a un effet métabolique notamment sur l'expression de HIF1a mais également sur la régulation des isoformes de la pyruvate kinase.

Ces facteurs circulants semblent particulièrement importants dans la capacité du foie à régénérer. Des expériences de parabiose hétérochronique (injection de sang de souris jeune chez des souris âgées) ont montré la capacité du sang de jeune souris à stimuler les capacités régénératrices des cellules progénitrices du foie.¹³

4.3 Modifications cellulaires

4.3.1 Au niveau macrocellulaire

L'hypertrophie cellulaire est la 1^{ère} étape avant toute division hépatocytaire. En effet, la division cellulaire n'advient pas nécessairement et de nombreux hépatocytes polyplôïdes sont visualisés après hépatectomie mineure et majeure. Ainsi, la synthèse d'ADN, mesurée par BrDU ou par Ki67, pourrait ne pas être un marqueur optimal de l'état cellulaire. Parmi les facteurs déterminants de la croissance hépatocellulaire, la ploïdie et la dégradation protéique par autophagie semblent primordiales.¹⁴ L'autophagie est un mécanisme régulateur par lequel les constituants de la cellule sont recyclés permettant notamment la reconstitution de stock d'acides aminés issus de la dégradation lysosomale des protéines. Les souris présentant une déficience de l'autophagie présentent une régénération altérée par augmentation de la mort cellulaire. Les foies de ces souris présentent une hypertrophie cellulaire en rapport avec la nécessité du maintien du stock énergétique.¹⁵ Dans ce cas, un apport énergétique alternatif à la glycolyse permettrait de fournir les métabolites nécessaires au cycle de Krebs. Les acides aminés néoglucogéniques et les acides gras pourraient représenter des métabolites efficaces dans ce cas.

La taille des cellules est liée à l'adaptation métabolique. Il a été suggéré qu'un apport en acide aminé – particulièrement l'alanine, la glutamine et la glycine – entraîne un œdème cellulaire.¹⁶ Celui-ci est lié au co-transport avec le sodium (système A de transport des acides aminés dont l'expression est augmentée très précocement au cours de la régénération¹⁷ La glycolyse et la glutaminolyse (entraînant une augmentation du glutamate) ont été décrits dans de nombreux modèles d'hypertrophie cellulaire.

4.3.2 Au niveau des organelles

4.3.2.1 *Mitochondrie*

La mitochondrie joue un rôle majeur dans la régulation de la taille et du métabolisme cellulaire, particulièrement dans la régulation de la phosphorylation oxydative et de la biosynthèse des lipides.¹⁸ On observe des modifications significatives des mitochondries pendant la régénération, notamment une augmentation de leur taille dans un 1^{er} temps. On observe également une diminution des cristae et une raréfaction de la matrice qui se vacuolise. Ceci est particulièrement vrai dans les hépatocytes péri-portaux, qui sont les 1^{er} à entrer en prolifération.¹⁹ La transition de perméabilité mitochondriale (MPT pour mitochondrial permeability transition) est décrite après

hépatectomie majeure et son inhibition réduirait les lésions hépatocellulaires et la mortalité.²⁰ L'ensemble de ces modifications pourraient être considérées comme des causes ou des conséquences de ce qui est rapportée comme la dysfonction mitochondriale. Celle-ci s'associe à des modifications du métabolisme parmi lesquelles une inhibition de la phosphorylation oxydative, une stimulation de la lipogenèse et une activation compensatrice de la néoglucogenèse.

Il faut noter que les caractéristiques des mitochondries au cours de la reprogrammation nucléaire des cellules iPS sont modifiées au même titre que celle décrit dans la régénération. Un shift métabolique significatif, comparable à celui observé dans les organismes en prolifération, est décrit avec notamment inhibition de la phosphorylation oxydative, augmentation de la glycolyse et upregulation de la voie des pentoses-phosphate.²¹

4.3.2.2 Réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique joue un rôle majeur dans les modifications post-transcriptionnelles des métabolites cellulaires. Il est décrit des modifications précoces du réticulum endoplasmique (RE) avec notamment une augmentation de volume du RE granuleux périnucléaire ainsi qu'une perte progressive de la double membrane du RE lisse. Ces modifications sont à associer au stress du réticulum endoplasmique, bien décrit au décours d'une hépatectomie.²² Nous nous attacherons particulièrement au rôle du réticulum endoplasmique dans les modifications associées au métabolisme de la choline. En effet, le réticulum endoplasmique est le site de la transformation de nombre de métabolites. L'exemple de la choline est particulièrement marquant puisque la choline, qui entre dans la cellule par un système de transport spécifique est transformée en phosphorylcholine puis en glycérophosphocholine dans le réticulum endoplasmique.

4.4 Modifications hémodynamiques locales et régionales

4.4.1 Hypertension portale

L'hypertension portale est définie par une pression portale supérieure à 8mmHg. Du fait du caractère invasif de cette mesure, elle est généralement définie comme un gradient porto-cave supérieur à 10mmHg, mesuré par ponction transjugulaire. Les mécanismes de l'hypertension portale au décours de l'hépatectomie et de la cirrhose sont différents.

Au décours de l'hépatectomie, la diminution des surfaces d'échanges est un phénomène aigu qui conduit à une augmentation instantanée de la pression portale lors du clampage d'une des branches portales. Elle est responsable d'une augmentation des forces de cisaillement (shear-stress) sur les

cellules endothéliales sinusoidales (CES) qui vont s'activer. Il a été démontré, chez le donneur vivant, que ces forces hémodynamiques déterminaient la prolifération segmentaire. A partir de ce point, de nombreux mécanismes d'adaptation hémodynamiques entrent en jeu rendant beaucoup plus complexe l'interprétation des données. En effet, l'activation des CES va entraîner d'une part une modulation des débits loco-régionaux notamment hépatique et splanchnique. Ceci a pour conséquence une congestion splanchnique avec élévation du volume sanguin inefficace et activation du système rénine-angiotensine-aldostérone, ainsi que des lésions microscopiques de l'épithélium intestinale. La translocation bactérienne qui s'ensuit va jouer un rôle dans l'activation du système immunitaire.

Par ailleurs, l'activation des CES entraîne une sécrétion de VEGF qui va modifier la microstructure des sinusoides hépatiques.²³ Une défenestration sinusoidale, probablement sous l'effet du VEGF comme dans la cirrhose, s'ajoute à la diminution du volume hépatique, diminuant ainsi les surfaces d'échanges. L'activation des CES joue également un rôle majeur dans l'activation des cellules immunitaires hépatiques, notamment des cellules de Küpffer dont on a vu le rôle majeur dans la régénération hépatique. Il a ainsi été démontré que l'activation des récepteurs au VEGF, sécrété de façon paracrine par les CES, provoquait la prolifération hépatocytaire et inversement.^{24,25}

Chez le patient cirrhotique, l'hypertension portale prolongée conduit à une adaptation du système cardio-vasculaire et serait en partie responsable de la rétention hydro-sodée secondaire à l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone, de l'insuffisance rénale du syndrome hépato-rénal et du syndrome hyperkinétique avec hyperdébit cardiaque.

Par ailleurs, l'hypertension portale est associée à une néoangiogenèse qui conduit à la formation de voies de dérivation porto-systémiques.²⁶ Ces « shunts » conduiraient à une décompression portale bien qu'il n'en ait jamais été fait la preuve. La présence de ces shunts a des conséquences cliniques importantes. Le court-circuit ainsi créé entre la circulation splanchnique et la circulation systémique empêche le foie d'éliminer un certain nombre de produits toxiques. Ainsi, l'hyper-ammoniémie de certains cirrhotiques à fonction hépatique normale serait dû au passage de l'ammonium produit par l'intestin et provenant du métabolisme de la glutamine. Par ailleurs, le passage de DAMPs issus des bactéries du tube digestif entraînerait une exposition systémique aux endotoxines et pourrait expliquer l'hypergammaglobulinémie.²⁷ Avec cet afflux de DAMPs, il pourrait exister une rupture de tolérance à des germes commensaux qui serait à l'origine d'une modification de la flore intestinale.

Or, cette flore intestinale est de plus en plus reconnue comme un facteur déclenchant ou aggravant d'un certain nombre de pathologie hépatique. Appliquée à la période post-hépatectomie, cette

rupture de tolérance pourrait expliquer la mortalité tardive par infection observée dans nombre de cas d'insuffisance hépato-cellulaire.

4.5 Rôle du système immunitaire dans la régénération hépatique

Les cellules de Küpffer jouent un rôle majeur dans la régénération hépatique.²⁸ Leur métabolisme est modifié au décours de l'hépatectomie avec une réduction du catabolisme lipidique et de la glycolyse avec augmentation de la synthèse des acides gras.²⁹ Leur activation détermine d'une part le niveau de prolifération hépatocytaire mais également le degré de la réponse inflammatoire systémique. Cette réponse inflammatoire passe notamment par le TNF α qui présente un effet ambivalent. A un niveau faible, il est nécessaire au priming des hépatocytes. A un niveau élevé, il favorise l'apoptose par activation de la voie des Fas-ligands. Nombre d'étude ont montré un impact significatif sur la survie de l'élimination de ces cellules de l'immunité innée. Ceci souligne l'importance de la coordination des différentes cellules non parenchymateuses avec les hépatocytes dans la fonction hépatique après hépatectomie.

4.6 Interactions des populations cellulaires au cours de la régénération hépatique

Bien que la majorité des études portant sur la régénération ont concentré leur effort sur la prolifération hépatocytaire, il est maintenant clair que les modifications architecturales hépatiques lors de la régénération ont un impact majeur sur les suites. L'un des points majeurs mis au jour il y a quelques années est l'asynchronisme de prolifération entre les différentes populations cellulaires. En effet, alors que la prolifération hépatocytaire semble très précoce, la prolifération des cellules endothéliales est plus tardive. Une action paracrine de l'angiotensine-2 sécrétée par les CES sur les hépatocytes a été récemment démontrée. Elle passe par le TGF- β 1 et semble donc relié la fin de la régénération hépatocytaire et le début de la phase angiogénique.³⁰ Ainsi, dans la phase précoce de la régénération, se forme de clusters d'hépatocytes dont la fonction d'excrétion est inefficace et dont l'oxygénation est aléatoire.

L'hypoxie est un stimulant majeur de la régénération hépatocytaire. L'hyperperfusion portale relative post-hépatectomie majeure est associée, par la réponse artériolaire du buffer artériel (HABR pour hepatic arterial buffer response), à une hypo-oxygénation qui s'ajoute au défaut de microvaisseaux. Ceci entraîne une augmentation du NADH qui traduit un statut redox altéré au niveau de la mitochondrie.³¹ L'hypoperfusion artérielle dans le cadre de l'embolisation portale du côté du foie non embolisé pourrait stimuler la prolifération hépatocytaire.³² HIF2 α , induite lors de l'hypoxie

pendant l'initiation de la mitose hépatocytaire, semble couplée à la prolifération des CES via le VEGF.³³

4.7 Modifications métaboliques au décours des hépatectomies

4.7.1 Modifications hépatiques du métabolisme glucidique

Le stress chirurgical et le sepsis entraîne une augmentation de l'excrétion de glucose proportionnelle à l'augmentation de consommation en O₂ particulièrement dans le sepsis. Cette excrétion est principalement liée à une néoglucogénèse splanchnique plutôt qu'à la glycolyse.³⁴

Les revues de la littérature concernant la régénération hépatique ne s'intéressent que peu au métabolisme cellulaire dans son ensemble et se concentre sur les cytokines et facteurs de croissance induisant la prolifération cellulaire. En effet, le métabolisme cellulaire semble s'adapter secondairement à la réponse cytokinique et en même temps que la réponse aux facteurs de croissance. La translation protéinique est un point clé de la régénération comme démontré par l'activation de p70 S6 kinase, effecteur de la voie de mTOR.³⁵ Toutefois le métabolisme glucidique fait l'objet d'un intérêt particulier. Il est démontré dans les modèles animaux de régénération, que ce soit l'hépatectomie ou l'administration de toxiques est associée à une hypoglycémie qui va entraîner une diminution de la sécrétion pancréatique d'insuline. Le rôle proprement pro-prolifératif de l'insuline est discutée bien que l'administration intra-hépatique d'insuline après une dérivation porto-cave totale réverse l'atrophie induite par l'intervention.³⁶

La régénération hépatique est conduite par de nombreux facteurs redondants. Cela est bien démontré par l'absence d'impact clinique dans des modèles murins d'hépatectomie après knock-down des principaux facteurs reconnus tel que l'IL6, l'HGF ou l'EGFR. Seule l'inhibition combinée de MET et du récepteur de l'EGF entraîne une abolition des signaux de régénération associée à une diminution de l'expression d'enzymes du cycle de l'urée, du métabolisme des acides gras et de la fonction mitochondriale.³⁷ Il existe une augmentation de l'expression d'enzyme de la néoglucogénèse (PEPCK) et une diminution des enzymes spécifiques de la glycolyse (glucokinase, PK).³⁸

Il est connu depuis longtemps que la PEPCK et la glucose-6-phosphatase voient leur transcription augmentée au décours de l'hépatectomie.³⁹ Toutefois le déficit en G6PD n'affecte pas les suites cliniques de l'hépatectomie comme montré dans une série de donneur vivant atteint de cette pathologie.⁴⁰ Dans le foie de cirrhose, il existe une augmentation de la néoglucogénèse à partir du lactate et de l'alanine ce qui n'est plus le cas après hépatectomie pour l'alanine. La quantité de

glycogène et de fructose-2,6diphosphate est diminuée après hépatectomie, ce encore plus en cas de cirrhose.⁴¹

Au décours d'une hépatectomie, la voie des pentose phosphate est inhibée au moins en partie par la réaction inflammatoire médiée par l'IL1 en réponse à l'endotoxémie.⁴² L'expression de la glucose-6-phosphatase augmente très rapidement après hépatectomie de la même façon que chez le rat diabétique. Cette augmentation est donc relativement très faible après hépatectomie chez le rat diabétique. Après hépatectomie le taux d'insuline s'effondre avec une augmentation parallèle du taux de glucagon.⁴⁰

4.7.2 Modifications du métabolisme azoté

La prolifération hépatocytaire peut être induite par un priming des hépatocytes due à un régime protéine-free suivi de l'administration d'acides aminés. La privation protéinique induit une expression de c-myc (et non de Ras et c-fos).⁴³

Il existe une augmentation significative de l'uptake de glutamine et d'alanine du tube digestif au décours d'une hépatectomie. Les transporteurs de glucose sont également surexprimés. D'autre part, l'entrée accrue d'acides aminés glucoformateurs participent à la néoglucogenèse. La sécrétion d'urée après hépatectomie majeure augmente proportionnellement à l'extension de l'hépatectomie pour maintenir une production constante d'urée. Cette production a tendance à diminuer après une intervention mais ne dépend pas de l'extension de l'hépatectomie. Parallèlement on observe une augmentation des acides aminés plasmatiques tels que la glutamine, l'alanine mais une diminution du glutamate.⁴⁴ L'uréogénèse à partir de la glutamine semble conservée malgré une réduction de l'activité de la glutaminase. L'uréogénèse à partir de l'alanine tend, elle, à diminuer via une réduction de la glutamate déshydrogénase.⁴⁵

Une récente étude a montré l'impact de l'octréotide sur la fonction hépatique après hépatectomie. L'octréotide semble réduire les lésions hépatiques microscopiques et freiner la régénération hépatique sans modifier la pression portale. Ceci est associé à une modification métabolique, étudiée par GC-MS, dans le métabolisme de la méthionine avec une augmentation de la MTA, facteur protecteur contre l'inflammation, par dégradation de la SAMe (s-adénosylméthionine).⁴⁶

4.7.3 Modification du métabolisme lipidique

Les modifications métaboliques impliquant les lipides sont majeures au cours des hépatectomies. En effet, l'ensemble des modèles animaux d'hépatectomie mettent en évidence une accumulation de lipides dans le cytoplasme hépatocytaire. Cette stéatose post-hépatectomie est liée d'une part à l'activation de la lipogenèse hépatique, d'autre part à un degré variable d'insulino-résistance. Elle se

présente sous la forme de gouttelettes lipidiques volumineuses, correspondant à une stéatose macrovacuolaire. Une analyse lipidomique a montré l'accumulation de gouttelettes lipidiques qui sont en fait de composition différente. Dans le foie après hépatectomie, ces gouttelettes accumulent une quantité importante de triacylglycérol au dépend des esters de cholestérol. La phosphatidylcholine augmente massivement dans la composition de la membrane des gouttelettes associé à une augmentation de la sphingomyéline.⁴⁷

Le profil métabolomique après hépatectomie a été étudié par spectroscopie NMR chez le rat. A H48, il est noté une augmentation significative des triglycérides, cholestérol, glucose et glycogène ainsi que de l'alanine et bétaine, et une diminution de la choline et de ses dérivés. La bétaine et la créatine plasmatique sont augmentés.⁴⁸

Au cours de la régénération hépatique, il existe une diminution du NAD dans les hépatocytes. Le déficit en NAD promeut la stéatose en réduisant l'oxydation des acides gras. La suppléance en NAD ou l'over expression de NAMPT (enzyme limitante de la synthèse du NAD) augmente la prolifération cellulaire tout en réduisant la stéatose post-régénération (synthèse d'ATP à partir des triglycérides) au prix d'une légère hyperglycémie.⁴⁹

L'hypertrophie cellulaire induite par la perte de cdk1 est accompagnée d'une altération de la fonction mitochondriale et de la synthèse lipidique. L'activation de la glycolyse est associée à une augmentation de taille cellulaire, témoignant de l'effet hypertrophiant de l'effet Warburg. L'inhibition de la synthèse lipidique serait liée à l'accumulation des triglycérides en l'absence de prolifération cellulaire afin d'adapter les besoins métaboliques.⁵⁰ La régulation du métabolisme lipidique fait partie intégrante du processus de régénération hépatique. L'expression de la C/EBP est augmentée au décours de la régénération. La suppression de l'accumulation de graisses dans le foie, soit par administration de leptine ou de glucocorticoïdes, est associée à une réduction de la prolifération cellulaire.⁵¹ Sur un modèle murin de NAFLD induit par déficit en Pemt (enzyme clef de synthèse de la phosphatidyl-choline), la survie après hépatectomie était significativement altérée en lien avec une inflammation significative ainsi que des hypoglycémies plus sévères que chez la souris sauvage. Il était démontré qu'il existait une réduction de PEPCK et une réduction de la glycogénogénèse qui était toute corrigées par une supplémentation en choline.⁵² A noter que l'IL6 inhibe la synthèse de glycogène induite par l'insuline chez le rat.

Le métabolisme des cholines est modifié au décours des hépatectomies. Il a été démontré chez le rat qu'un rapport de Pdt-éthanolamine / Pdt-choline augmenté était associé à une augmentation de l'inflammation et une diminution de la survie après hépatectomie. L'inhibition de la PEMT pourrait expliquer ce phénomène. La mise en évidence sur les spectres des foies décompensés d'un rapport

Pdt-choline /choline augmenté associé à une augmentation de l'éthanolamine peut faire évoquer un dysfonctionnement de cette voie métabolique. Ces résultats sont confirmés par des travaux chez le rat qui démontraient une réduction de l'activité et de la transcription de PEMT lors de la régénération hépatique. Dans les cultures cellulaires, le glucagon inhibe la synthèse de Pdt-éthanolamine. Il est intéressant de retrouver que l'expression de la PEMT est sous contrôle des oestrogènes ce qui pourrait en partie expliquer la moindre sensibilité des femmes à l'insuffisance hépatocellulaire.

Le foie stéatosique présente une capacité régénérative diminuée ainsi qu'une réaction inflammatoire plus importante. Le métabolisme après hépatectomie semble favoriser la voie des pentoses phosphate ainsi que la phosphorylation oxydative. Une étude récente a montré qu'un analogue du glucagon pouvait inverser ces métabolismes au profit de la néoglucogénèse.⁵³

4.7.4 *Modifications de la zonation métabolique*

Après hépatectomie de 70%, il est noté une réduction de l'activité glycolytique de la PK et une augmentation de l'activité néoglucogénique de la PEPCCK. La zonation des différentes enzymes était modifiée avec une activité glucogénique dans la partie intermédiaire ou péri-veineuse au cours de la phase proliférative (principalement dans la zone périportale).⁵⁴ Au cours de la régénération, il existe une souffrance mitochondriale plus marquée des hépatocytes péri-portaux – qui présentent eux-même les caractéristiques de cellules en cours de prolifération. Cette souffrance est associée à une augmentation du ratio GSSG/GSH et une augmentation du Ca cytosolique inhibé par la cyclosporine.²⁰ L'inhibition par la cyclosporine de la transition de perméabilité mitochondriale (MPT) a été utilisée dans un modèle d'hépatectomie majeure. En effet, la MPT entraînant une dépolarisation de la membrane mitochondriale et un arrêt de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'utilisation de NIM a démontré un effet sur la survie et sur les lésions après hépatectomie de 90% (diminution de la nécrose, augmentation de la prolifération cellulaire) avec disparition de la baisse de l'ATP.²¹

L'expression des enzymes le long des sinusoides ne serait pas lié au type d'apport vasculaire (artère, veine porte, veine sus-hépatique) car l'expression de la PEPCCK (périportale) ou de la glutamine synthase ou de la glutamate déshydrogénase (péricentrale) n'est pas modifié par des ligatures vasculaires. Les changements d'expression observés chez des animaux qui n'ont pas repris de poids seraient principalement lié à l'apport calorique.⁵⁵ Toutefois cette observation n'est vraie que pour un flux portal physiologique, une réduction du flux modifiant cette expression et responsable d'une réduction de l'élimination de l'ammonium et du galactose.⁵⁶

Les modifications d'activité enzymatique au décours des hépatectomies font également l'objet d'un contrôle hormonal comme l'a bien montré une étude mettant en évidence l'effet de la noradrénaline sur l'activité de la transglutaminase 2 (TG2) couplée au récepteur de l'EGF via les récepteurs α -adrénergiques. Ainsi, la noradrénaline diminue l'expression de la TG2 dans la zone péri-portale amplifiant la réponse proliférative des hépatocytes à l'EGF.⁵⁷

5. Métabolomique

5.1 Principes généraux

La métabolomique est une science récente dont le 1^{er} rapport remonte aux années 70 avec la publication de Pauling sur les métabolites de fluides corporels.⁵⁸ La notion de profil métabolique est rapporté par Horning la même année (1971).⁵⁹ La métabolomique consiste en l'obtention d'un profil métabolique sur un échantillon obtenu et analysé à un temps donné et dans des conditions spécifiques. Avec la génomique, la transcriptomique et la protéomique, elle correspond à une approche globale de l'état d'un système biologique qu'il soit liquide ou solide –selon la technique utilisée. Alors que la génomique ou la transcriptomique s'intéresse à l'expression des gènes ou des ARM messenger respectivement, la métabolomique analyse les métabolites présents dans un échantillon. L'obtention d'un profil métabolique présente l'avantage d'intégrer un ensemble de phénomènes biologiques autrement difficile à appréhender compte tenu des nombreuses interactions entre différentes voies métaboliques.

Les métabolites peuvent être définis comme de petites molécules (<1.5kDa) permettant ou issus du métabolisme cellulaire. Produits à partir de réactions enzymatiques, les métabolites primaires permettent le fonctionnement cellulaire de base. Ils participent ainsi aux processus biologiques tels que la croissance, la multiplication cellulaire, la respiration et sont communs à de nombreux organismes : il s'agit des sucres (carbohydrate), des acides aminés, des nucléotides, des lipides, des vitamines, de certains alcools. Les métabolites secondaires sont eux issus de processus non biologiques, pouvant également provenir de certaines réactions biologiques issus de réactions à une agression. Ce sont les xénobiotiques, les toxines mais aussi les phénols ou les alcaloïdes, principalement appliquée aux plantes. La base de données des métabolites, HMDB (<http://www.hmdb.ca/>), comprend quelques 2500 métabolites endogènes, 1200 médicaments et 3500 composants alimentaires qui peuvent être retrouvés dans le corps humain.

Ce n'est qu'il y a une vingtaine d'année qu'apparaissent les termes de « métabolomique » et « métabolome ». La métabolomique est ainsi définie par Oliver et al.⁶⁰ comme « la mesure de la concentration du maximum de métabolites permettant d'obtenir un « instantané » métabolique ». D'autres auteurs (Tweedale et al.) utilisent le concept de mesure du « nombre total de métabolites dans une cellule ».⁶¹

L'intérêt de l'analyse globale des métabolites présents dans un échantillon est le fait qu'il traduit un état biologique, un phénotype biologique, qui dépend à la fois de l'expression génique et protéique au moment du prélèvement mais également à l'exposition à d'autres facteurs extérieurs tel que

l'environnement, l'état nutritionnel, les toxiques etc... On peut parler de métabotype comme étant le phénotype métabolique d'un échantillon. Les métabotypes sont corrélés au phénotype d'un organe ou d'un organisme déterminant ainsi l'état de santé ou une pathologie donnée.

Les champs d'application de la métabolomique sont larges compte tenu de l'importance que revêtent les mécanismes métaboliques dans l'état de santé d'une personne tant dans un état physiologique que dans un état pathologique. Ainsi la métabolomique peut tout aussi bien être utilisée comme outil de prédiction du développement d'une pathologie avant l'apparition des symptômes que pour la caractérisation d'un état pathologique et sa stadification ou pour l'évaluation pharmacologique d'un produit.

Dans le champ de l'hépatologie, la métabolomique est une science très récente puisqu'une recherche bibliographique associant les termes « metabolomics » et « liver » retrouve une 1^{ère} publication en 2002 et le nombre total de publications référencées n'atteignant que n=1404. Toutefois l'engouement pour cette science est certain comme le démontre l'augmentation croissante et exponentielle des publications (Figure 1).

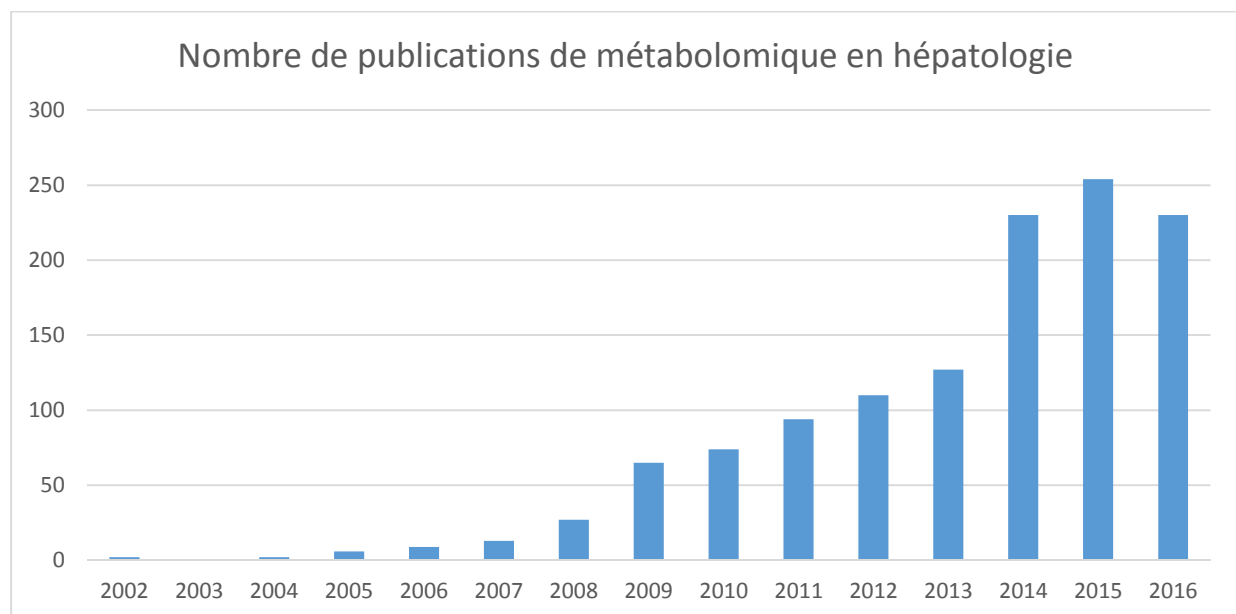


Figure 1 : nombre de publications référencées dans Pubmed avec les mots-clé "liver" AND "metabolomics"

L'analyse métabolomique peut être différenciée selon plusieurs niveaux. Tout d'abord l'analyse peut être qualitative ayant pour objet de détecter et d'identifier l'ensemble des métabolites présents dans un échantillon. La particularité de cette approche provient de la nécessité d'associer des techniques différentes du fait de la variation de structures physico-chimiques entre les groupes de métabolites. L'analyse peut être quantitative visant à quantifier des métabolites identifiés préalablement, métabolites dont le nombre sera plus ou moins limité selon la technique utilisée.

Ainsi chaque situation de recherche nécessitera une technique ou une association de techniques différentes selon l'objectif du travail.

5.2 Techniques disponibles de métabolomique

Les méthodes les plus représentatives de spectroscopie utilisée pour la métabolomique sont : la spectroscopie de masse (MS), la résonance magnétique (RMN) et la spectroscopie Raman. Chaque méthode présente des intérêts et des inconvénients mais il est souvent licite de pouvoir associer ces techniques. Au sein d'une même technique, la préparation et le type d'analyse permettent d'identifier et de quantifier des métabolites avec une sensibilité et une spécificité variable, l'important étant donc d'identifier la technique idéal pour répondre à la question posée ou, au mieux d'associer les techniques entre elles afin d'obtenir une image la plus fidèle possible de l'état métabolique de l'échantillon. En effet, MS et RMN sont souvent complémentaires et combiner les techniques augmentent l'interprétabilité des résultats.

La spectroscopie de masse est probablement la technique la plus rapporté en science du vivant. Couplée à la GC (GC-MS), la MS est une technique sensible permettant de voir un grand nombre de métabolites dont les quantités sont faibles. Certaines techniques permettent de visualiser plusieurs milliers de métabolites. L'utilisation de la MS dans les analyses ciblées pour la quantification de métabolites notamment en pharmacologie est largement répandue et utilise cette sensibilité de la MS. L'une des limites majeures de la MS est son caractère destructif puisqu'elle nécessite une ionisation préalable de l'échantillon. Cette préparation de l'échantillon qui peut être spécifique d'un groupe de métabolite donné conduit à la nécessité de préparations multiples, parfois complexes, privant par ailleurs la possibilité d'obtenir une image globale et interprétable du métabolisme dans son ensemble sur un échantillon donné.

Le principe de la spectroscopie RMN repose sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. La plupart des études sont basés sur le noyau d'hydrogène ^1H . Certaines études notamment concernant les dérivés de l'ATP sont basées sur le noyau phosphore ^{31}P . L'application d'un champ magnétique extérieur conduit à une orientation du noyau dans différentes directions qui correspondent à des niveaux d'énergie différents. Les changements de niveaux d'énergie peuvent être détectés. Les spectres RMN sont obtenus du fait d'une sensibilité variable des noyaux selon l'environnement en électrons. En effet, l'application d'un champ magnétique extérieur conduit à la formation d'un champ magnétique interne lié à la circulation des électrons dans un plan perpendiculaire au champ appliqué. Ce champ magnétique dit interne entraîne un déplacement du spectre détecté vers la droite. C'est la variation de l'environnement électronique du noyau étudié qui

fait varier ce champ magnétique interne entraînant ainsi un déplacement vers la droite variable selon la molécule. Ce déplacement est appelé déplacement chimique et permet d'identifier les molécules. On parle de blindage et de déblindage selon le degré d'électronégativité des atomes voisins du proton étudié. Lorsque l'environnement du proton est fortement électronégatif, le champ magnétique interne est faible, on parle de déblindage et le pic se situe à gauche du spectre. A l'inverse, un environnement faiblement électrinégatif entraîne un déplacement chimique vers la droite (« blindage »).

La spectroscopie RMN présente les avantages et inconvénients inverses. Sa faible sensibilité empêche une identification et une quantification de métabolites présents en petite quantité (Figure 2). Ceci est particulièrement important pour certains métabolites du cycle de Krebs dont la présence dans les tissus est extrêmement fugace du fait de la vitesse des réactions chimiques. A l'opposé, la spectroscopie RMN présente comme avantage la possibilité de quantifications très précises des métabolites. En effet, en RMN, la concentration étant directement liée à la concentration d'un noyau donné (^1H , ^{13}C , ^{31}P ...), l'aire sous la courbe des spectres RMN autorise une confiance certaine dans la quantification. Par ailleurs, la spectroscopie RMN est une technique non destructrice particulièrement adaptée à l'analyse en phase solide.

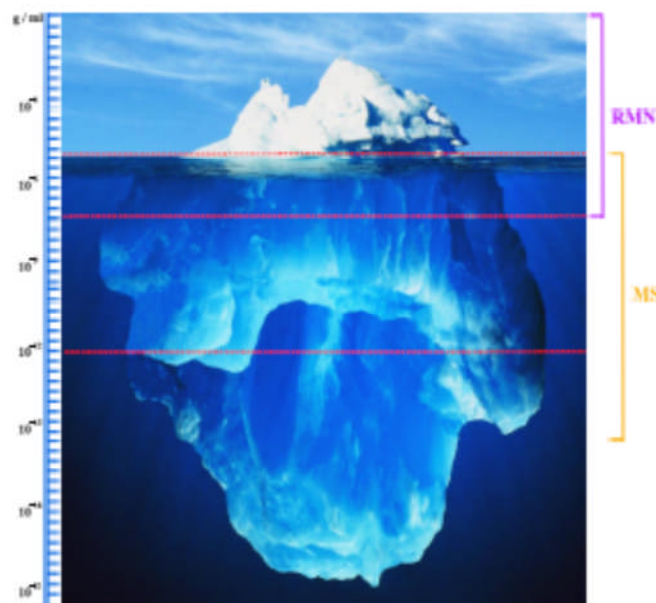


Figure 2 : sensibilité comparée de la spectroscopie RMN et de la spectroscopie MS. Adapté de Sunner et al, 2013

5.3 Principes de la métabolomique HR-MAS-NMR

La métabolomique par résonance magnétique de haute résolution à rotation à angle magique (HR-MAS-NMR) est une technique récente qui a permis le développement de la spectroscopie RMN de tissu solide. Elle est décrite par Cheng en 1997 comme permettant de pallier à l'inhomogénéité des prélèvements solides. En effet, alors que l'analyse en phase liquide homogène est possible car la moyenne des couplages dipolaires est nulle (orientation aléatoire variant constamment avec le temps), l'analyse en phase semi-solide (comme la biopsie de tissus) se heurte à un gradient de susceptibilité au champ magnétique. Les couplages dipolaires créent des interactions majeures qui entraînent un élargissement du spectre pouvant rendre l'interprétation difficile. L'analyse directe par RMN est impossible.

Pour pallier à cette limite, l'application d'une rotation de l'échantillon à une fréquence donnée et à un angle donnée par rapport au champ magnétique principal B_0 réduit l'élargissement des spectres et permet d'approcher de la résolution de la RMN en phase liquide. Il est toutefois notable qu'en fonction des organes cette capacité d'augmenter la résolution est variable selon les zones du spectre ce que nous verrons plus tard.

Comme montré dans la figure 3, l'application d'une rotation à 3500Hz autour d'un axe incliné d'un angle $\theta = 54,74^\circ$ par rapport à l'axe vertical correspondant au champ B_0 , angle appelé « angle magique », permet une diminution significative de la largeur des spectres et donc une augmentation de la résolution du spectre (Figure 4).

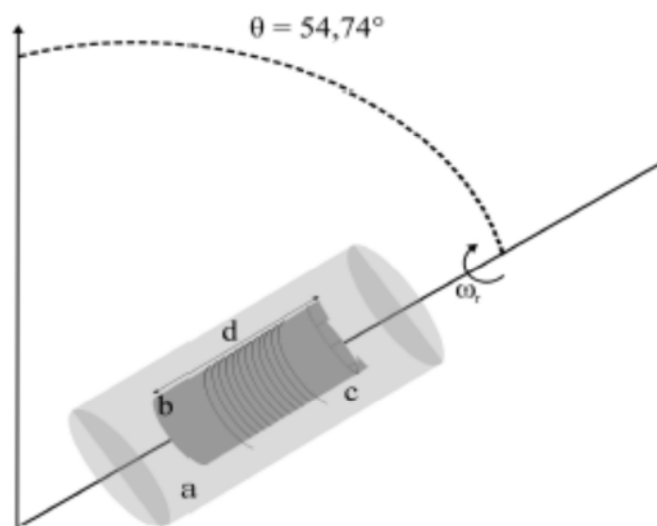


Figure 3 : principe de la rotation à angle magique ; le rotor contient l'insert dans lequel est placé l'échantillon. Une rotation à un angle magique de $54,74^\circ$ lui est appliqué.

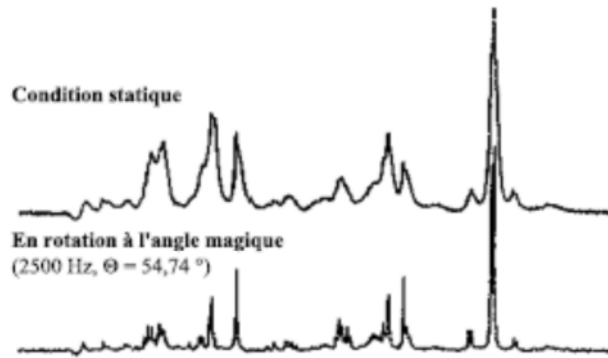


Figure 4 : Conséquences de l'application d'une rotation à angle magique sur la résolution du spectre (adapté de Cheng et al., 1997)

L'intérêt de cette technique est la possibilité d'analyser des tissus intacts, sans dégradation (ou avec une dégradation limitée de lors de l'acquisition si celle-ci est courte). La préparation est rapide et simple et l'obtention du spectre en 1D peut se faire rapidement (moyenne 10-15 minutes). Cette rapidité d'analyse permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons, avec une dégradation métabolique limitée pendant l'acquisition (analyse en condition de 4°C). Du fait de l'absence de préparation complexe, cette technique est applicable en clinique permettant une analyse compatible avec le temps clinique.

Les limites de cette technique sont l'absence d'automatisation qui nécessite donc la présence d'un technicien entraîné, une sensibilité limitée ($\mu\text{M}/\text{mg}$) et une résolution qui ne permet pas toujours d'empêcher le recouvrement des spectres. Cette dernière limite conduit à la nécessité d'analyse 2D qui nécessite un temps beaucoup plus long. Il est indispensable, afin d'éviter la poursuite des réactions métaboliques, de limiter le délai d'ischémie nécessitant une organisation permettant la congélation la plus rapide possible des échantillons sous peine d'obtenir des spectres altérés.

Matériel et méthode

1. Prélèvement des échantillons

Des échantillons de foies étaient prélevés au CHU de Strasbourg, Hôpital Hautepierre, et immédiatement congelés dans un réservoir d'azote liquide afin de limiter la durée d'ischémie. Afin de s'assurer de la qualité des prélèvements, le temps entre le prélèvement et la congélation était noté. Tous les échantillons dont le délai de congélation était supérieur à 2 minutes ont été analysés en spectroscopie mais non inclus dans les analyses statistiques. Un consentement informé et signé était obtenu pour tous les patients autorisant le prélèvement, la conservation et l'analyse des données dans le cadre d'un protocole validé par les institutions du CHU de Strasbourg.

Les échantillons étaient prélevés et immédiatement insérés en cryotube préalablement identifié par un numéro d'échantillon et une date de prélèvement.

Une base de données prospective anonymisée était construite contenant l'ensemble des données démographiques, liées à la pathologie et des suites opératoires.

2. Préparation des échantillons

Une fois congelé dans l'azote à -196°C , les échantillons étaient transférés dans la salle de spectroscopie (département de Médecine Nucléaire, Hôpital de Hautepierre) pour préparation et éventuel stockage avant analyse. Les échantillons étaient stockés à -80°C pour une durée maximale de 3 mois avant analyse, le délai ayant principalement varié du fait de la disponibilité du spectromètre.

La préparation des échantillons est très rapide (environ 2 minutes par échantillon). Elle se fait à -20°C . L'échantillon est carotté à l'aide d'un emporte-pièce appelé « punch ».

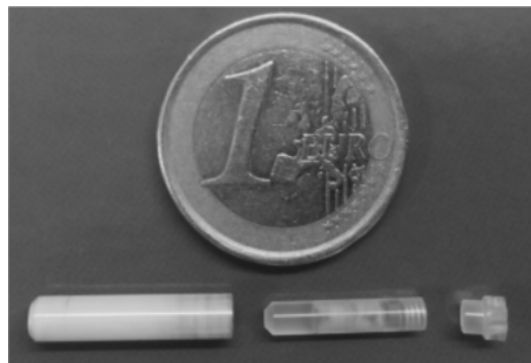


Figure 5 : dispositif pour l'analyse HR-MAS ; l'échantillon est placé dans l'insert jetable de 30m, lui-même placé dans le rotor fermé par un bouchon à ailettes

L'insert est pesé afin de tarer la balance et de mesurer une masse de matériel biologique de 15-20mg. (Figure 5) La masse est un élément clé de la quantification, chaque spectre étant normalisé pour la masse analysée. L'analyse étant une analyse sur le noyau d'hydrogène, un signal d'asservissement utilisant le D₂O est obtenu par adjonction de 8μl de D₂O.

3. Analyse RMN HRMAS

3.1 Equipement

L'ensemble des échantillons ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance III 500 (Figure 6) dont la fréquence d'opération est de 500,13Hz pour le noyau d'hydrogène. Il est équipé d'une sonde de 4mm à triple résonance (¹H, ¹³C, ³¹P) avec un canal deutérium (²H). Le spectromètre est équipé d'un système de refroidissement (Bruker Cooling Unit, BCU) permettant de maintenir une température constante basse. L'enregistrement du signal RMN se fait à une fréquence de 3500Hz.

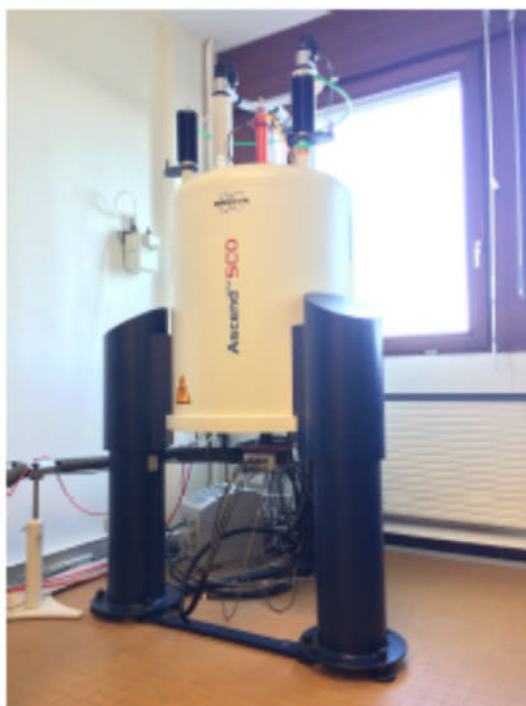


Figure 6 : spectromètre Bruker III Avance 500

L'enregistrement est réalisé après introduction de l'insert dans un rotor de 4mm, ce dernier étant fermé par un bouchon à ailettes.

3.2 Expériences 1D

La séquence utilisée dans le cadre de cette thèse est la séquence appelée CPMG (d'après Carr-Purcell-Meiboom-Gill) dite méthode d'écho de spin. Cette séquence permet de prendre en compte au maximum l'inhomogénéité de sensibilité au champ magnétique en appliquant une série longue d'impulsions permettant ainsi d'obtenir une série phasée de spectres. Elle permet par ailleurs d'éliminer du spectre les bandes larges correspondant aux macromolécules améliorant ainsi la résolution.

Les expériences CPMG utilisées pour les échantillons tissulaires de foie dans le cadre de cette thèse ont été enregistrées avec les paramètres suivants :

- Echantillonnage : 32768
- Fenêtre spectrale (ppm) : 14,0019
- Temps d'acquisition (s) : 2,33
- Gain du receveur : 128
- Délai de relaxation (s) : 2
- Temps d'écho (ms) : 93
- Nombre de boucles CPMG : 328
- Nombre de scans fictifs : 4
- Nombre de scans : 128
- Durée d'impulsion ^1H 90° (μs) : 7,95
- Vitesse de rotation (Hz) : 3500
- Champ RF présaturation (Hz) : 20

d'où une durée d'acquisition par spectre de 10 minutes.

Les déplacements chimiques de spectre sont référencés par rapport au pic de gauche du doublet de lactate (groupement CH, doublet) situé à 1,33ppm.

Sur un spectre 1D acquis en CPMG, chaque pic correspond à un certain nombre de protons. Pour chaque pic, il faut identifier : son déplacement chimique, la multiplicité des pics et l'aire sous la courbe. Un exemple de spectre 1D d'échantillons de foie cirrhotique décompensée et compensée est présenté ci-après.

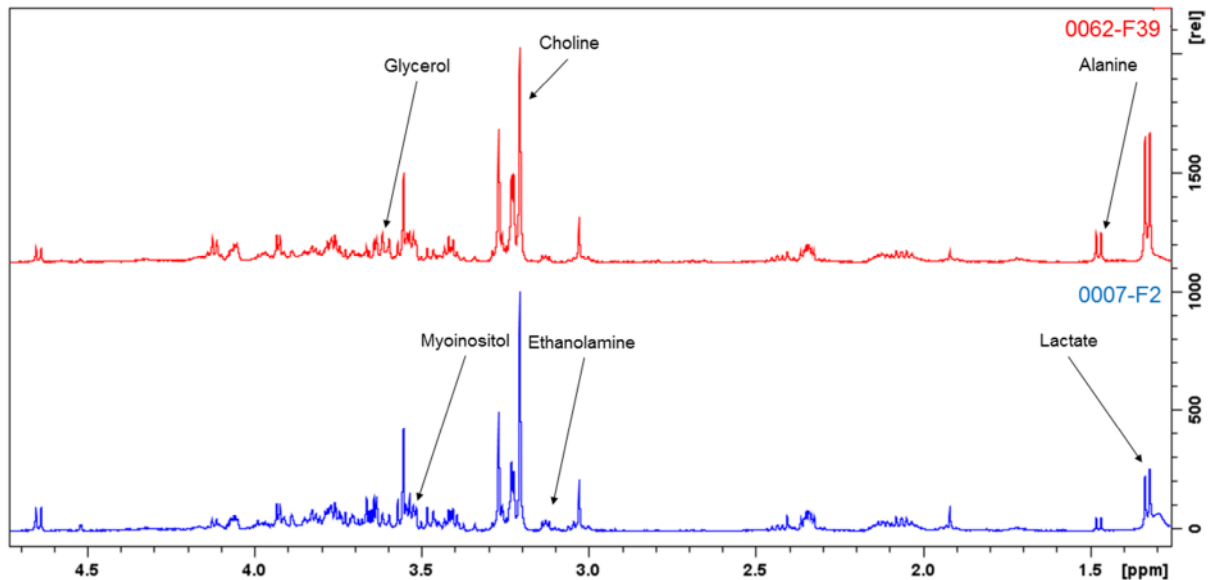


Figure 7 : spectre 1H en HR-MAS-NMR de foies cirrhotiques décompensé (en haut) et compensé (en bas). A chaque pic(s) le long de l'axe correspond un métabolite dont la quantité dépend de l'aire sous le pic.

Le déplacement chimique est exprimé en ppm sur l'axe des abscisses. Comme nous l'avons vu plus haut, le déplacement chimique est déterminé par l'environnement du proton considéré selon qu'il est blindé (déplacement vers la droite) ou déblindé (pic à gauche).

La multiplicité des pics est l'autre paramètre permettant d'identifier un métabolite. Les protons peuvent être couplés lorsqu'ils se situent dans un environnement « proche ». Avec la multiplication des protons couplés se multiplient les pics. On parle de doublet, triplet voire quadruplet selon qu'un proton donné est couplé à un, deux ou trois hydrogène(s).

L'intégrale du pic correspond en spectroscopie RMN à la quantité de protons résonants avec le même déplacement chimique. Ainsi la mesure de l'aire sous la courbe d'un pic permet une quantification du métabolite en calculant le ratio aire du pic/ nombre de protons. Afin de réaliser les mesures de quantification, une référence a systématiquement été utilisée pour calibrer les mesures. Il a été utilisé le lactate de sodium dont la concentration dans l'insert de référence était de 125mM correspondant à 3µM.

L'une des limites déjà mentionnée de la spectroscopie RMN des tissus solides est sa résolution avec le risque de recouvrement de spectres. Ceci est particulièrement vrai pour les biopsies de foie qui sont riches en graisses. La résolution des expériences CPMG pour les graisses est médiocre conduisant à l'obtention de spectres peu interprétables dans certains cas (Figure 8).

Sur cette figure, le recouvrement des spectres se traduit par une « bosse » au sein de laquelle il est impossible de distinguer les métabolites. Dans ce cas, il est nécessaire d'enregistrer un spectre 2D.

3.3 Expériences 2D

L'identification précise des métabolites passent par la réalisation de spectres 2D qui permet de corrélérer les déplacements chimiques de l'hydrogène et du carbone (^{13}C).

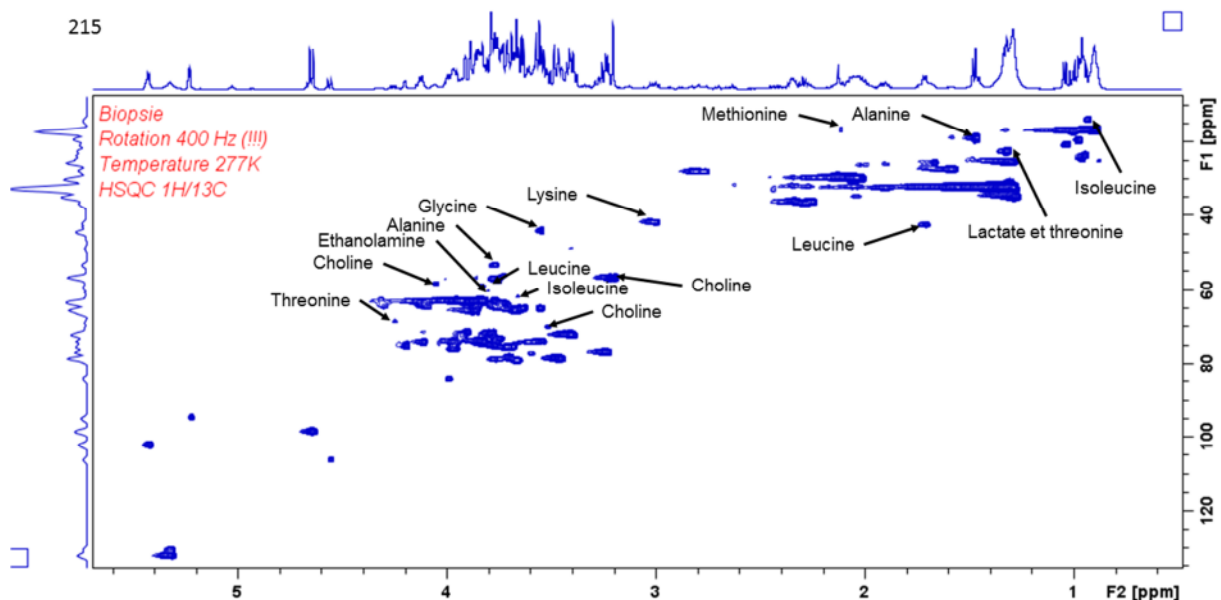


Figure 8 : spectre 2D 1H et 13C d'un échantillon de foie après hépatectomie. Le recouvrement des « tâches » le long de l'axe des abscisses explique la limite de quantification de certains métabolites dans certains échantillons.

Dans le cadre de cette thèse, les expériences 2D ont été enregistrées en hétéronucléaire dite Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC).

Les signaux RMN sont combinés pour obtenir le signal du proton en dimension horizontale (F2) et le signal du carbone en dimension verticale (F1). Cette double identification permet une analyse qualitative. Ceci permet d'identifier précisément l'ensemble des métabolites présents dans une biopsie. La durée de cette expérience étant d'environ 15 heures, seules quelques biopsies considérées comme significatives en terme de spectre 1D ont été analysées en 2D afin d'identifier

l'ensemble des métabolites identifiables dans les biopsies hépatiques. Au total, 2 biopsies de greffons et 3 biopsies de foies hépatectomisés ont été analysés de la sorte.

Les paramètres d'acquisition utilisés pour l'enregistrement des spectres 2D HSQC 1H-13C sont les suivants :

- Mode d'acquisition en F1 : Echo-Anti Echo
- Echantillonnage : F2 : 1024
- Nombres d'incrément : 256
- Temps de l'incrément (μ s): 48
- Fenêtre spectrale ^1H (ppm) : 14,0019
- Fenêtre spectrale ^{13}C (ppm) : 165,6500
- Temps d'acquisition F2 (s): 0,07
- Gain du receveur : 128
- Délai de relaxation (s) : 1,50
- Temps de l'incrément (μ s) : 24
- Nombres de scans fictifs : 16
- Nombre de scans : 136
- Durée de l'impulsion 1H 90° (μ s) : 7,95
- Découplage : GARP – 4
- Constante J (CH) (Hz) : 145

D'où une acquisition de chaque spectre d'environ 16 heures

Les métabolites ainsi identifiés sont rapportés dans le tableau ci-après mentionnant les groupements identifiés et les déplacements chimiques en ^1H et ^{13}C (exprimés en ppm) :

Tableau 1 : liste des métabolites identifiés par HSQC avec déplacement chimique en ^1H et ^{13}C pour chaque groupement

Métabolites	Groupement	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
Acetate	CH ₃	1.917	25.946
Alanine	CH	3.783	53.047
	CH ₃	1.481	18.702
α -Glucose	méta-CH	3.394	72.101
	méta-CH	3.522	73.894
	para-CH	3.71	75.179
	CH ₂	3.828	63.062
	ortho-CH	3.849	74.043
	ortho-CH-OH	5.234	94.535
Ascorbate	CH ₂	3.721	65.119
	CH-OH	3.997	72.133

β-Glucose	méta-CH	3.244	76.742
	ortho-CH	3.465	78.433
	para-CH	3.49	78.417
	CH ₂ (u)	3.712	63.186
	CH ₂ (d)	3.903	63.198
	ortho-CH-OH	4.661	98.561
Choline	N ⁺ -(CH ₃) ₃	3.22	56.42
	N ⁺ -CH ₂	3.547	69.909
	CH ₂ -OH	4.078	58.192
Ethanolamine	CH ₂ -OH	3.815	60.175
GABA	β-CH ₂	1.903	26.26
	α-CH ₂	2.997	41.818
Glutamate	CH ₂ -CO	2.346	35.991
	CH ₂	2.07	29.582
Glycerol	(CH ₂ (u)) ₂	3.551	64.994
	(CH ₂ (d)) ₂	3.652	64.986
	CH	3.777	74.611
Glycerophosphocholine	CH ₂ -O partie choline	4.32	62.069
	CH ₂ -O et CH-OH de glycerol	3.946	69.231
	N ⁺ -CH ₂	3.67	68.58
	N ⁺ -(CH ₃) ₃	3.218	56.643
	CH ₂ -O et CH-OH de glycerol	3.903	73.311
Glycine	CH ₂	3.557	43.991
Histidine	CH-C cycle à 5	7.136	119.994
	CH-NH ₂	4.004	57.285
	CH ₂ (d)	3.294	30.204
Isoleucine	CH ₃ -(CH ₂)	0.95	13.759
	CH-NH ₂	3.685	62.118
Lactate	CH	4.119	71.055
	CH ₃	1.33	71,17
Leucine	(CH ₃) ₂	0.98	23.215
	(CH ₃) ₂	0.991	24.437
	CH ₂ et CH(-CH ₃) ₁	1.729	26.527
	CH ₂ et CH(-CH ₃) ₂	1.745	42.161
	CH-NH ₂	3.758	55.736
Mannitol	CH ₂ (d)	3.863	65.991
	CH-OH	3.798	71.957
	CH-OH	3.76	73.49
Methionine	CH ₂ (u) et CH ₃	2.128	16.479
	CH ₂ (d)	2.194	32.184
	CH ₂ -S	2.636	31.355
	CH-NH	3.881	56.331
Phenylalanine	meta-CH*2	7.425	131.71
	ortho-CH*2	7.32	131.922

Phosphocreatine	CH ₂	3.956	56.375
Proline	gamma-CH ₂ et beta-CH ₂ (u)	2.018	26.301
	beta-CH ₂ (d)	2.373	31.585
	delta-CH ₂ (d)	3.439	48.695
	alpha-CH	4.142	63.705
Serine	CH-NH ₂	3.853	58.959
	CH ₂ -OH	3.976	62.841
Threonine	CH ₃	1.327	22.122
	CH-OH	4.258	68.563
Valine	CH ₃	0.991	19.259
	CH ₃	1.042	20.65
	CH	2.274	31.782

4. Pré-traitement des spectres

Afin d'obtenir une quantification la plus précise possible, le pré-traitement des spectres est indispensable.

La 1^{ère} étape consiste à phaser l'ensemble des pics. La correction de la phase permet à tous les pics d'être en adéquation parfaite.

La 2^{nde} étape consiste à corriger la ligne de base des spectres. La moyenne du bruit des spectres est utilisée pour faire correspondre la base des pics de l'ensemble des métabolites. En effet, l'absence de correction conduirait à une mauvaise estimation de l'aire sous courbe et donc des quantifications. Il a souvent été noté une distorsion de la ligne de base dans les échantillons testés qui peut être attribués à l'hétérogénéité des prélèvements et du parenchyme hépatique lui-même notamment parce qu'il s'agit de biopsies sous-capsulaires.

La dernière étape préparatrice au traitement consiste à recalcr les spectres en utilisant un pic de référence choisi. Le pic utilisé lors de ce travail était le pic du lactate à 1,33725ppm. Il existe une variation naturel de la position des pics liés au pH de l'échantillon.

Calibration

Les spectres étaient systématiquement calibrés par rapport à une référence. La référence utilisée pour ce travail était un insert de lactate de sodium de concentration 125mM correspondant à 3μM. L'insert était analysé dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'analyse des échantillons. L'ensemble des spectres étaient calibrés en utilisant cette référence, permettant une quantification en mmol/g.

Echantillonnage

L'échantillonnage ou « bucketing » est réalisé afin de pouvoir réaliser les analyses statistiques par la construction de matrices. (Figure 9) Il consiste à « découper » l'ensemble d'un spectre en petites régions appelés « buckets » de 0,01ppm. Dans ce travail, les régions du spectre analysées allaient de ppm à ppm. L'intégrale sous la courbe de chaque intervalle est mesurée et une matrice est construite. L'échantillonnage était réalisé par le logiciel AMIX 3.9.14 (Brucker, GmbH, Allemagne).

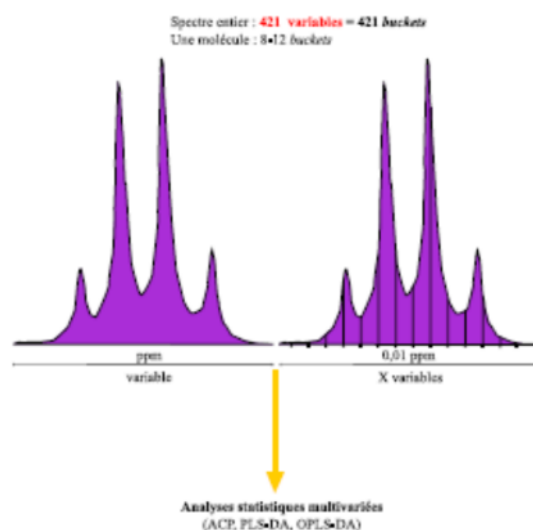


Figure 9 : échantillonnage des spectres pour l'analyse statistique

4.1 Quantification des métabolites

La quantification précise est permise par la spécificité de la technique HR-MAS-RMN et par un pré-traitement scrupuleux des spectres. La sensibilité est de l'ordre de 0,1nmol/mg. Elle est réalisée grâce à un algorithme développé en interne (K Elbayed) utilisant le logiciel MATLAB R2012b (Mathworks®, France). L'aire sous la courbe du signal d'un métabolite est comparé à l'aire sous la courbe du signal de la référence utilisée pour la calibration (cf plus haut). La quantification est faite par normalisation par rapport au poids de l'échantillon et au nombre de proton par groupement considéré.

Toutes les quantifications étaient réalisées après contrôle d'une adéquation parfaite entre les spectres en terme de ligne de base et calage le long de l'abscisse.

IL est à noter que la quantification des métabolites doit prendre en compte le chevauchement potentiel de certains métabolites, notamment des métabolites dont le déplacement chimique en ^1H est proche et où les pics peuvent se recouvrir. L'expérience 2D montrait dans la figure ci-après

montre le chevauchement sur certains spectres des pics du lactate et de la thréonine, qui peuvent rendre l'interprétation des quantifications difficiles.

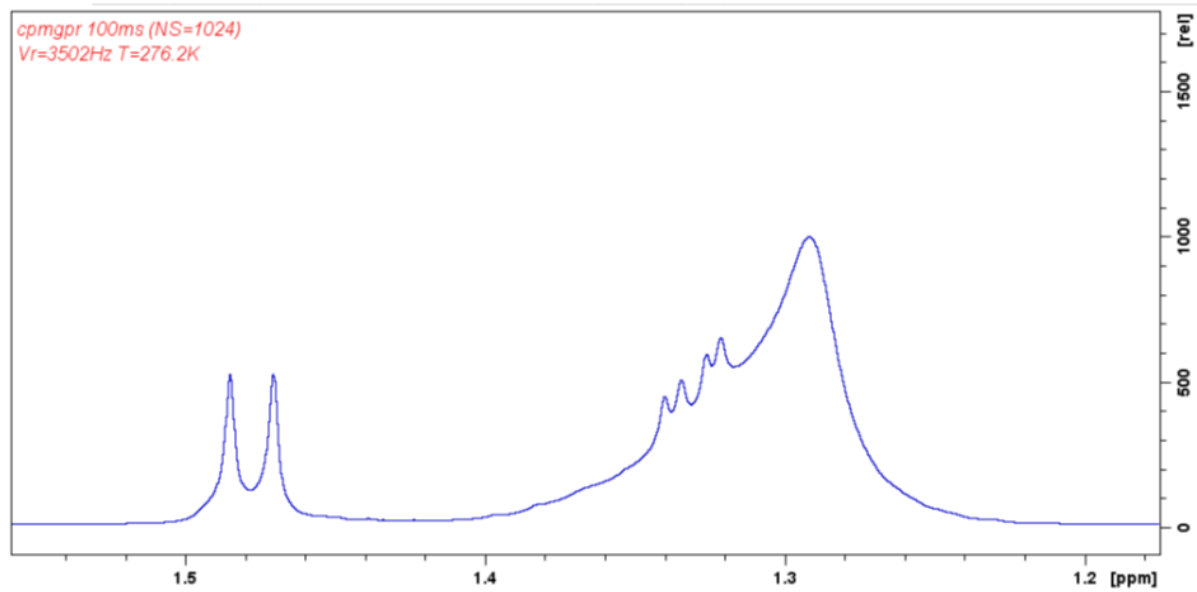


Figure 10 : chevauchement des pics du groupement CH₃ du lactate et de la thréonine centré sur un déplacement chimique entre 1.32 et 1.33, présent sur 5 biopsies, pouvant rendre l'interprétation de la quantification du lactate aléatoire.

5. Analyses statistiques

L'analyse statistique des données de métabolomique peut se faire sous 2 angles :

- A partir de l'échantillonnage, par comparaison des intégrales de chaque bucket et identification des métabolites pour lesquels les spectres diffèrent ; pour ce faire, des analyses multivariées complexes sont réalisées à type de PCA, PLS-DA ou OPLS-DA
- A partir de la quantification des métabolites, par comparaison des quantités de métabolites en fonction de groupes préalablement identifiés. Les analyses peuvent être uni- (test T de Student, test U de Mann-Whitney selon la population étudiée) ou multivariées. Une analyse de réseau (ADEMA) peut être particulièrement intéressante pour étudier des différences de quantités de métabolites même dans des populations très faibles.

Au cours de cette thèse, les 2 approches ont été utilisées de façon complémentaire. En pratique, les spectres étaient comparés dans leur intégralité par méthode multivariée sans a priori (non targeted metabolomics). La méthode utilisée était l'Analyse en Composantes Principales (PCA). Dans un 2^{ème} temps, une méthode permettant d'accentuer une différence identifiée par PCA était utilisée de type Analyse Discriminante par régression aux Moindres Carrés Partiels par projection orthogonale (OPLS-DA). En effet, dans le cadre de la PCA, l'analyse est dite non supervisée, c'est-à-dire qu'elle est

réaliser sans présager du groupe de l'échantillon. Il s'agit donc d'une technique très puissante qui, à partir de la matrice entrée dans le logiciel, regroupe les observations présentant des similitudes et éloigne les observations présentant des différences. Les modèles ainsi identifiés sont très puissants. L'analyse en PLS-DA spécifie le groupe d'appartenance des variables permettant de forcer le modèle.

Les données issues de ces analyses se présente sous la forme d'une cible avec des points correspondant chacun à un échantillon. La dispersion des points est visuellement exprimée par un centre et un ovale, mathématiquement par $R^2\gamma$. On considère un $R^2\gamma > 0.75$ comme étant correct. Le degré de similitudes / différences entre les groupes est visualisé par le regroupement de points de même couleur (blanc ou noir) et leur séparation le long de l'axe X. Il est mathématiquement exprimé par la valeur Q^2 qui est arbitrairement considérée comme significative si $Q^2 > 0,5$.

5.1 Analyse de réseau ADEMA

Il s'agit d'un algorithme pour déterminer les changements de métabolites prévu en utilisant l'information mutuelle. Il s'agit d'une technique d'analyse multivariée qui permet d'analyser les changements d'un groupe de variables, reliées selon un réseau métabolique, entre le groupe cas et le groupe contrôle, au lieu d'analyser les variables une par une. En incluant la topologie du réseau métabolique, ADEMA permet ainsi de savoir si un groupe de métabolites - liés par une voie métabolique donnée – peut être utilisé comme biomarqueur et permet d'identifier la direction du changement de niveau de chaque métabolite. Il est à noter que l'algorithme ADEMA fonctionne grâce à des variables discrètes et non continues ce qui conduit nécessairement à une 1^{ère} étape de discrétisation (« segmentation » de variables continues en variables discrètes). L'un des intérêts majeurs de cette technique est qu'elle requiert un petit nombre d'observations en détectant des variations de groupes de métabolites.

Ainsi, en dehors des étapes purement mathématiques de l'algorithme, il est nécessaire, outre l'identification des cas et des contrôles, d'identifier les sous-ensembles de métabolites ou groupes de métabolites qui sont reliés entre eux. Pour ce faire, le réseau métabolique utilisé pour déterminer ces groupes est le réseau décrit à la figure 11.

Ce réseau est adapté à chaque situation. Afin d'affiner certaines voies, notamment indirecte, nous avons utilisé le site des Kegg Pathways (www.genome.jp/kegg-bin/get_htext). Pour ce travail, étant donné que certains métabolites n'étaient pas quantifiables ou identifiables sur les spectres, nous avons utilisé les groupes de métabolites suivants :

- Glucose / lactate

- Glucose / ascorbate / glutathione / glutamate
- Glucose / alanine / valine / isoleucine
- Choline / glycerophosphocholine / phosphocholine / choline totale

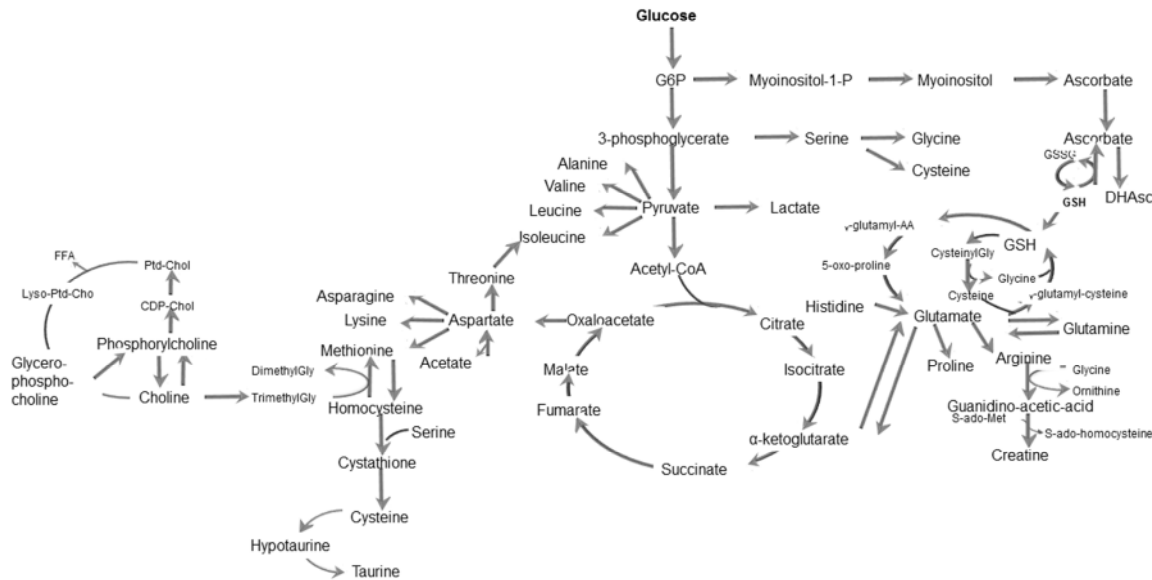


Figure 11 : réseau métabolique utilisé pour les analyses ADEMA (collaboration Dr N. Dali-Youcef)

L’algorithme ADEMA a été codé sous le logiciel R, grâce à Stéphanie Battini en collaboration avec Çiçek, l’un des créateurs de l’algorithme. Sans entrer dans les détails (voir thèse de Science soutenue par le Dr S Battini), il existe 5 étapes mathématiques consistant à 1/ discrétiser les observations en utilisant des courbes B-splines ; 2/ identifier les sous-ensembles de métabolites en générant un mode élémentaire de flux (EFM) ; 3/ trouver les combinaisons de métabolites informatifs par rapport à une condition ; 4/ calculer les niveaux de métabolites attendus pour chaque groupe en se basant sur l’information mutuelle fournie ; 5/ comparer les niveau attendus entre eux.

Cette analyse de réseau était mené sur les logiciels R et Tinn-R.

5.2 Autres analyses statistiques

Les variables continues étaient exprimées en moyenne \pm écart-type ou en médiane (extrêmes) selon leur distribution. Les variables nominales étaient exprimées en valeur absolu et pourcentage de la population pour laquelle les données étaient disponibles (lorsqu’il existait des données manquantes,

le nombre était précisé). La répartition des variables nominales était comparée par test de Chi-2. Les variables continues étaient comparées par test t de Student ou test U de Mann-Whitney selon leur répartition et la taille de l'échantillon. Les corrélations entre 2 variables continues étaient analysées par test Z. Ces analyses étaient conduites grâce au logiciel Statview (logiciel R pour les tests de corrélation). Dans tous les cas une valeur de $p < 0,05$ était considérée pour identifier une différence significative.

Afin d'identifier des seuils significatifs d'un biomarqueur, une courbe ROC était réalisée. Le seuil était déterminé afin d'obtenir le meilleur compromis de sensibilité et spécificité. La spécificité était privilégiée lorsque le compromis n'était pas évident. Ces analyses étaient conduites avec le logiciel SPSS.

6. Conduite générale de l'analyse statistique

Une analyse multivariée des spectres métaboliques dans leur globalité selon la technique de PCA était réalisée en 1^{er} lieu pour toutes les hypothèses. Lorsqu'il existait une différence de signification ($Q^2 > 0,5$) ou proche de la significativité sans dispersion des variables ($0,5 < Q^2 < 0,6$ et $R^2\gamma > 0,75$), une analyse en PLS-DA était réalisée permettant de souligner la différence visuellement ou de l'affirmer si la différence était considérée comme limite par la PCA.

Lorsque ces analyses globales de spectres mettaient en évidence une différence significative, une identification des métabolites différenciellement exprimés était conduite. Une analyse de réseau permettait d'affiner cette analyse ou de réaliser une analyse sur des populations de faible effectif. Cette analyse ADEMA était systématiquement réalisée. Une comparaison des quantités par méthodes statistiques classiques étaient également conduites en utilisant les test t de Student ou le test U de Mann-Whitney selon la répartition de la variable. Les métabolites identifiés comme étant de potentiels biomarqueurs par les méthodes ADEMA et/ou les méthodes statistiques classiques étaient ensuite entrées dans une analyse de courbe ROC afin d'établir la sensibilité et la spécificité ainsi que pour identifier les seuils significatifs des métabolites.

7. Analyse histologique

Tous les échantillons analysés par HR-MAS-NMR ont été également analysés par histologie classique avec coloration HES. En effet, la technique étant non destructive, il est possible de corréler le profil métabolique et l'histologie sur l'échantillon analysé.

Les données histologiques recueillies de façon systématiques étaient : le degré de fibrose et l'activité classé selon le score METAVIR, le degré de stéatose avec distinction de la stéatose micro- et macrovacolaire. L'ensemble des analyses histologiques était réalisé par une anatomopathologiste spécialisée en hépatologie, Dr A Onea.

Partie 1 : Intérêt de la métabolomique HR-MAS-NMR au décours des hépatectomies

Objectifs

Etant donné le rôle central du foie dans le métabolisme et les modifications métaboliques de l'environnement tumorales telles que décrites plus haut, l'intérêt de la métabolomique par HR-MAS-NMR a été étudiée dans une 1^{ère} partie de cette thèse. Son caractère prédictif est discuté ainsi que son applicabilité pratique, notamment du fait de l'obtention extemporanée du profil et la possibilité de quantification rapide de métabolites.

Dans une 1^{ère} section, l'intérêt de la métabolomique par HR-MAS-NMR est discutée pour prédire l'insuffisance hépatocellulaire et d'en identifier de potentiels biomarqueurs.

Dans une 2^{nde} section, l'intérêt de la métabolomique par HR-MAS-NMR est discutée pour prédire la survenue d'une récurrence après hépatectomie pour métastase de cancer colo-rectal selon l'hypothèse du « soil ».

Prédiction de l'insuffisance hépatocellulaire (IHC) post-hépatectomie par métabolomique HR-MAS-NMR : applicabilité pratique et apport dans la compréhension de la physiopathologie de l'IHC

L'insuffisance hépatocellulaire (IHC) est la principale cause de mortalité après hépatectomie.⁶² Le risque de survenue de l'IHC représente la principale limite à l'extension des indications de chirurgie de résection pour les tumeurs primitives et secondaires du foie.

Identifier les mécanismes métaboliques associés à l'IHC permettrait d'identifier des cibles thérapeutiques⁶³. Le volume de foie fonctionnel restant est aujourd'hui considéré comme le principal critère pour évaluer la résécabilité d'une tumeur du foie. Elle est basée sur l'hypothèse selon laquelle un volume de foie insuffisant ne peut répondre aux besoins métaboliques après une chirurgie.^{64,65} Ainsi des seuils de sécurité ont été établis correspondant, d'abord à des pourcentages de volume de foie restant par rapport au volume de foie total puis, plus récemment, à l'instar des critères utilisés pour éviter le syndrome dit de small-for-size en transplantation à donneur vivant, le volume de foie restant estimé par rapport au poids du patient. Des seuils variables ont été définis en fonction de la qualité du parenchyme restant.⁶⁶ En effet, il est clair que le foie de cirrhose ne tolère pas de la même façon une résection élargie, mais d'autres anomalies du parenchyme hépatique, telle que la stéatose, la dilatation sinusoidale induite par la chimiothérapie ou la congestion d'un segment restant sont associées, pour un même volume restant à une fonction inférieure.

Il est également bien connu des modèles animaux que le volume de foie n'est pas un critère suffisant puisque des hépatectomies hyper-élargies (>90%) sont possibles chez le rat ce qui ne semble pas envisageable chez l'homme. Il est d'ailleurs particulièrement intéressant de noter que la simple adjonction de glucose dans l'alimentation des rats augmente leur survie après hépatectomie élargie. L'autre élément particulièrement marquant en rapport avec ces hépatectomies hyper-élargies chez le rongeur tient au fait que l'ablation complète, sans laisser de moignon de parenchyme nécrotique, permet aux animaux de tolérer ces interventions.

Aussi l'hypothèse simpliste selon laquelle l'IHC provient d'un volume de foie insuffisant pour assurer une fonction suffisante ne peut être retenue seule. Des travaux récents se sont donc penchés sur l'aspect fonctionnel et métabolique. L'usage de la scintigraphie à la mébrofénine marquée au technétium en est une preuve et la conjonction d'une évaluation fonctionnelle au volume semble prometteur.⁶⁷

L'impact des modifications circulatoires au niveau de la veine porte et au niveau des sinusoides a beaucoup attiré l'attention sur la part liée à l'inflammation au décours de l'hépatectomie. La réaction

inflammatoire joue un rôle majeur dans l'initiation de la régénération hépatique après hépatectomie comme discuté dans l'introduction. La question qui anime les équipes de recherche en régénération hépatique est celle de l'origine de l'IHC post-hépatectomie. En effet, 2 théories s'opposent selon que l'IHC provient d'un défaut ou d'un excès de prolifération hépatocytaire.

Nombre d'études animales ont montré qu'une diminution du marquage au BrdU des hépatocytes était associée à une mortalité plus importante après hépatectomie de 70%. Par ailleurs, de nombreuses études volumétriques chez l'animal et chez l'homme ont montré qu'un défaut d'augmentation de taille était associé à un risque accru d'insuffisance hépatique.⁶⁸⁶⁹ Ce critère d'augmentation de volume est d'ailleurs un critère de jugement de l'efficacité de l'embolisation portale. Certains auteurs ont été jusqu'à corrélérer le risque d'insuffisance hépatocellulaire et la vitesse de « régénération » après embolisation. A l'inverse, ce sont principalement des travaux chez l'animal portant sur l'asynchronisme de prolifération des hépatocytes et des cellules endothéliales qui ont souligné le risque d'une trop importante prolifération.⁷⁰ D'une part, les hépatocytes en prolifération perdent une grande part de leur capacité métabolique, la machinerie cellulaire étant tout entière orientée vers un métabolisme favorisant la prolifération, tel qu'observé dans le cancer. D'autre part, la prolifération des hépatocytes entraîne une désorganisation de la microarchitecture hépatique avec formation de clusters d'hépatocytes non organisés favorisant cholestase et ischémie. En effet, le retard de prolifération des cellules endothéliales entraînent la formation de zones non vascularisées, la défenestration des cellules endothéliales sinusoidales qui altèrent donc la fonction métabolique des hépatocytes, même si ceux-ci sont rapidement en nombre suffisant. Une étude a montré que l'utilisation d'un produit qui empêche la prolifération hépatocytaire diminuait la mortalité après hépatectomie.⁷¹

Le rôle des cellules non parenchymateuses est donc majeur au décours de l'hépatectomie. Ceci est bien démontré par les modifications métaboliques positives apportées par l'injection de cellules mésenchymateuses.⁷²

Les études métabolomiques sur la régénération hépatique sont rares et ont principalement portées sur des voies métaboliques spécifiques et il n'existe pas d'étude ayant porté sur le caractère prédictif du profil métabolique pour l'IHC post-hépatectomie chez l'homme.

Notre hypothèse était que la métabolomique HR-MAS-NMR permet de distinguer les parenchymes hépatiques en fin d'hépatectomie à risque d'insuffisance hépatique mortelle. L'intérêt principal était de rechercher des similitudes ou des différences des profils métaboliques par rapport à d'autres systèmes en prolifération dont les profils métabolomiques sont mieux connus. Ainsi les profils observés pour les cellules cancéreuses⁷³ et leur environnement⁷⁴, les cellules immunitaires activées⁷⁵

ou les cellules progénitrices reprogrammées⁷⁶ montrent une diminution de la phosphorylation oxydative une activation de la néoglucogenèse avec augmentation des acides aminés glucoformateurs, glutaminolyse associée à une augmentation du transport de glutamine et une accumulation de lipides.

La mise en évidence de telles modifications permettrait d'une part l'identification de biomarqueurs prédictifs d'IHC et d'autre permettrait d'associer le profil métabolique du foie à risque d'IHC à un excès ou un défaut de prolifération.

Matériel and méthode

Sur une période de 2 ans, les patients ayant bénéficié d'une hépatectomie pour tumeur bénigne ou maligne ont été inclus à condition de respecter les critères suivants : consentement éclairé signé pour analyses biologiques et génétiques dans le cadre d'un banque de tissus autorisées, biopsie en fin d'hépatectomie immédiatement congelé en azote liquide (temps d'ischémie < 5 minutes), 1^{ère} hépatectomie. Afin d'identifier des marqueurs prédictifs d'IHC mortelle, seule les hépatectomies majeures et/ou sur foie pathologique (toxicité significative de la chimiothérapie ou fibrose stade $\geq 3/4$) était inclus.

L'analyse a également porté sur des prélèvements de foies embolisés ainsi que sur des foies de cirrhose explantés pour transplantation hépatique. Une analyse rétrospective d'une base de données tenue prospectivement était réalisée pour identifier les paramètres cliniques et biologiques prédictifs et pour contrôler et tenir compte de certains facteurs confondants pouvant modifier le profil métabolique et jouer un rôle dans l'IHC

Sélection des patients et préparation à l'hépatectomie

Les patients étaient sélectionnés selon les données cliniques, biologiques et scannographiques. Une volumétrie 3D était systématiquement réalisée. L'ascite et l'hypertension portale était évaluée cliniquement ou par endoscopie pour les patients suspect de cirrhose. L'hypertension portale n'était pas une contre-indication absolue à la chirurgie. Le test au vert d'indocyanine était systématiquement réalisé et pouvait contre-indiquer une hépatectomie majeure d'emblée (taux normal de rétention à 15 minutes < 10%). Lorsque le volume était jugé insuffisant (30% de foie restant pour un foie sain, 40% pour un foie pathologique OU un rapport volume de foie restant / poids du corps < 0.5%), qu'il existait une cirrhose ou une cholestase majeure ou qu'une résection abdominale majeure associée était envisagée (DPC, colectomie gauche), une embolisation portale

était indiquée. Un drainage biliaire était réalisée dans tous les cas d'ictère obstructif et avant l'embolisation portale.

Définition des critères de jugement

L'insuffisance hépatique post-hépatectomie mortelle (IHC fatale) était définie par le décès survenant du fait d'une IHC dans les 90 jours après l'hépatectomie.⁷⁷ L'IHC était définie soit par le critère du 50-50 (bilirubine > 50µmol/L ou TP< 50% à J5) soit par une bilirubine > 119mmol/L dans les 5^{1er} jours.

Acute-on-chronic liver failure (ACLF) était définie selon la definition de l'étude CANONIC pour le groupe contrôle de patients cirrhotiques.

Résultats

Un total de 100 biopsies était disponible pour analyse : 45 après hépatectomie respectant les critères d'inclusion dans l'étude principale, 8 biopsies de foies embolisés, 36 de foies natifs chez des patients transplantés et 11 après hépatectomies mineures sur foie sain.

Dans la population étudiée de 45 foies réséqués, les indications étaient : métastases hépatiques de cancer colo-rectal (n=22), carcinome hépatocellulaire (n=5), métastases de tumeur neuroendocrine (n=5), cholangiocarcinome hilair. La majorité des patients ont bénéficié d'une hépatectomie majeure (66%), l'autre partie ayant un foie pathologique à l'examen anatomopathologique. Chez les patients avec métastases hépatiques, 95% avaient une chimiothérapie pré-opératoire (n=21). Les patients présentant un CHC avaient une fibrose avancé chez 60% (n=3) ou une cirrhose Child A (n=2). Les caractéristiques démographiques et cliniques des patients sont rapportées dans le tableau 2.

Le taux global d'insuffisance hépatocellulaire était de 16% dont 6 sont décédés dans les 90 jours post-opératoires.

Tableau 2 : caractéristiques des patients inclus et facteurs prédictifs d'insuffisance hépatocellulaire mortelle après hépatectomie

	Population globale	PHLF mortelle	PHLF Non mortelle	p value
Age	63 ±12	69 ±6	62 ±12	0.243
Sexe masculin	20	4	16	0.239
Indication				
MHCCR	22	2	20	0.413
CHC / CKIH	7	3	4	0.012
Cholangiocarcinome hilair	5	1	4	0.642
Tumeur bénigne	5	0	5	0.352

Autre	6	0	6	0.302
IMC (kg/m ²)	25 ±4	26 ±4	25 ±4	0.624
Obésité	6	1	5	
Diabète	8	3	5	0.027
Traitement par insuline	1	0	1	
Traitement par metformine	6	3	3	0.043
HTA	18	3	15	0.591
Statines	5	1	4	0.642
Syndrome métabolique	9	1	8	0.826
Hépatectomie majeure	30	6	24	0.063
Embolisation portale	10	3	7	0.079
Clampage pédiculaire	7	3	4	0,608
Atteinte parenchymateuse				
Stéatose	22	1	21	0.09
Fibrose > F3	4	2	2	0.024
Dilatation sinusoidale	12	1	11	0.552
Bilirubine pré-opératoire	20 ±7	82 ±46	10 ±8	0.02
INR pré-opératoire	1.04 ±0.1	1.17 ±0.2	1.06 ±0.2	0.349
Créatinine pré-opératoire	67.2 ±18	64 ±14	68 ±19	0.657
ASAT pré-opératoire	52.7 ±11	173 ±165	24 ±23	0.001
Platequettes pré-opératoire	259 ±93	285 ±84	255 ±95	0.423
NLR pré-opératoire	3.19 ±2	4.65 ±2	2.97 ±2	0.105
Clairance du vert d'indocyanine	10.1 ±7	15 ±10	9 ±6	0.312
MELD score pré-opératoire	7 ±5	9 ±4	7 ±3	0.463
APRI score pré-opératoire	0.41 ±0.1	0.42 ±0.2	0.41 ±0.5	0.245

Tableau : caractéristiques des 45 patients inclus dans l'étude et comparaison des patients ayant présenté une IHC mortelle ou non mortelle.

Le profil métabolique du foie en fin d'hépatectomie prédit l'IHC mortelle

L'analyse PCA montrait une distinction claire des profils métaboliques selon la survenue ou non d'une IHC mortelle ($Q^2=0,587$; $R^2\gamma=0,784$). (Figure 12) Il n'y avait pas de différence significative de profil en fonction du grade de l'IHC en dehors de l'IHC mortelle.

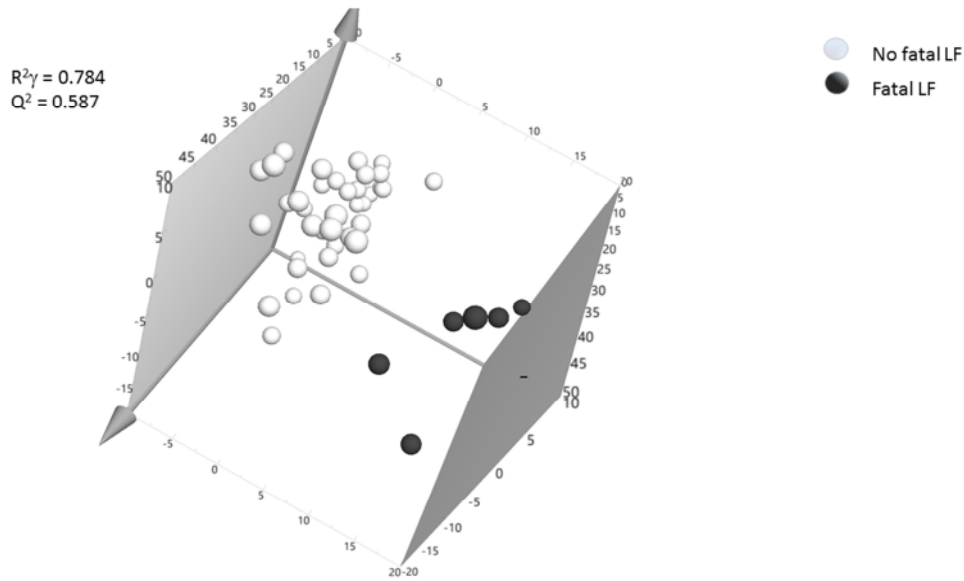


Figure 12 : analyse multivariée par PCA des profils métaboliques selon la survenue ou non d'un décès par insuffisance hépatocellulaire pour la population globale (n=45)

Une analyse complémentaire était réalisée en incluant l'ensemble des 56 biopsies disponibles après hépatectomie soit 11 patients supplémentaires.

Parmi ces 11 patients, 1 est décédé d'une insuffisance hépatique après thrombectomie pour CHC sur foie cirrhotique. L'incorporation un à un dans le modèle prédictif décrit plus haut de ces 11 biopsies montrait une excellente capacité du test puisque la mortalité par IHC était prédite avec une spécificité et une valeur prédictive positive de 100%. La valeur prédictive négative était de 70%.

Le profil métabolique n'était pas différent selon l'extension de l'hépatectomie ($Q^2=0.0021$), la qualité du parenchyme ($Q^2=-0.21$) ou l'indication ($Q^2=0.013$). (Figure 13) L'administration d'une chimiothérapie n'était pas non plus associée à un profil métabolique différent ($Q^2=-0.21$). Le tableau 3 récapitule l'ensemble des hypothèses testées.

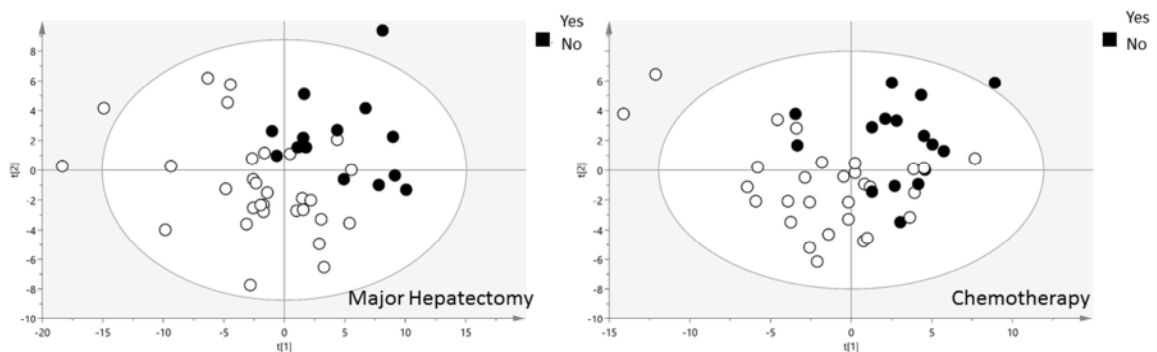


Figure 13 : analyse multivariée des profils métaboliques en fin d'hépatectomie selon A/ l'extension de l'hépatectomie B/ la réalisation d'une chimiothérapie préopératoire

Le tableau montre l'ensemble des hypothèses testées et le résultat de l'analyse en OPLS-DA (afin de sensibiliser un maximum l'analyse) afin d'identifier de potentiels facteurs pré- et per-opérateurs confondants.

Tableau 3 : paramètres pré- et per-opérateurs évalués en OPLS-DA pour identifier des facteurs associés à des profils métaboliques distincts

	Q ²	Significativité
Age > 75 ans	-0,301	NS
Diabète	-0,821	NS
Traitement par metformine versus insuline	0,573	
Traitement par statines	-0,059	NS
Chimiothérapie pré-opératoire	-0,02	NS
N cures > 6 cycles	-0,36	NS
Cirrhose	-0,21	NS
Embolisation portale	-0,609	NS
Hépatectomie majeure	0,0021	NS
Clampage pédiculaire	-0,579	NS

Identification des voies métaboliques impliquées dans l'insuffisance hépatocellulaire mortelle

La quantification des métabolites montrait un niveau significativement plus élevé d'alanine, de valine, d'isoleucine et de glutamine et un niveau plus bas de glycérophosphocholine dans la population à risque d'IHC mortelle. (Tableau 4)

L'analyse de réseau ADEMA montrait une vision plus précise avec une richesse augmentée en glucose, lactate, isoleucine, glutamine and glutamate. La quantité d'antioxydants (ascorbate et glutathion) était significativement plus faible. Le métabolisme de la choline était également altéré avec un niveau supérieur de choline et inférieur de glycérophosphocholine (Figure 14).

La quantité d'acides aminés néoglucogéniques et des métabolites dérivés de la choline prédisait l'IHC mortelle avec la meilleure acuité. L'aire sous la courbe ROC de la valine et de l'alanine était de 0,806 et 0,802 respectivement. Le métabolite permettant une prédiction la plus adéquate était un taux faible de glycérophosphocholine. La courbe ROC permettait d'identifier un taux < 1,16mmol/g permettant de prédire l'IHC mortelle avec une sensibilité de 73% et une spécificité de 100% (AUROC=0,856; IC95% 0.738-0.974).

N=45

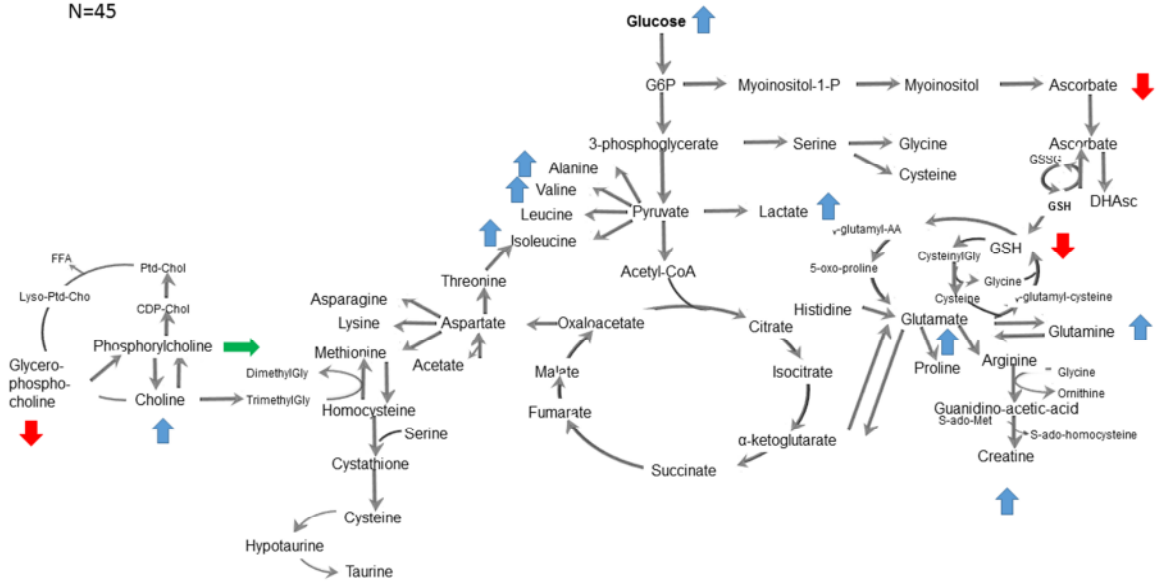


Figure 14 : analyse de réseau ADEMA pour la prédiction d'une insuffisance hépatocellulaire chez les patients opérés d'une hépatectomie à risque.

L'analyse plus fine du métabolisme de la choline montrait une augmentation significative des ratios choline/glycerophosphocholine et phosphocholine/glycerophosphocholine.

Tableau 4 : quantification des métabolites selon la survenue d'une insuffisance hépatocellulaire mortelle ou non (exprimée en nmol/mg).

	Pas de décès par PHLF	Décès par PHLF	p value
Glucose	5.357 ±4	6.38 ±4	0.564
Lactate	6.064 ±3	8.723 ±5	0.053
Alanine	1.06 ±0.5	3.14 ±2	<0.0001
Valine	0.125 ±0.1	0.475 ±0.4	<0.0001
Isoleucine	0.084 ±0.05	0.358 ±0.3	<0.0001
Glutamine	0.861 ±0.3	1.13 ±0.4	0.049
Glutamate	2.031 ±0.7	2.724 ±1	0.063
GABA	0.415 ±0.3	0.643 ±0.5	0.157
Ascorbate	0.23 ±0.1	0.15 ±0.1	0.120
GSH	0.728 ±0.4	0.425 ±0.3	0.092
Choline	0.825 ±0.5	1.101 ±0.7	0.255
Phosphocholine	0.631 ±0.4	0.397 ±0.2	0.06
Glycerophosphocholine	1.628 ±0.7	0.705 ±0.4	0.005
PC / GPC	0.486 ±0.3	4.42 ±4	0.011
Choline /GPC	0.775 ±0.2	4.84 ±3	0.006
Ethanolamine	0.377 ±0.3	0.672 ±0.5	0.072
Taurine	4.775 ±2	5.062 ±4	0.757

Les modifications métaboliques de l'IHC mortelle ne sont pas identiques à celles de la cirrhose décompensée

L'analyse des profils métaboliques des foies en IHC et des foies de cirrhose décompensés (définis par une ACLF) ne montrait pas de différence globale des métabolismes. Il en était de même pour les profils des foies fonctionnels après hépatectomie et des foies cirrhotiques non décompensés. Toutefois l'analyse de réseau montrait des différences significatives de voies métaboliques activées entre les 2 populations en insuffisance hépatique sévère. Les foies en IHC après hépatectomie présentait un taux plus élevé d'alanine, de glutathion, de choline et de glycérophosphocholine mais un niveau inférieur de glutamine, créatine et taurine. Il n'y avait pas de différence de contenu en lactate, glucose ou acides aminés néoglucoquiniques en dehors de l'alanine. (Figure 15)

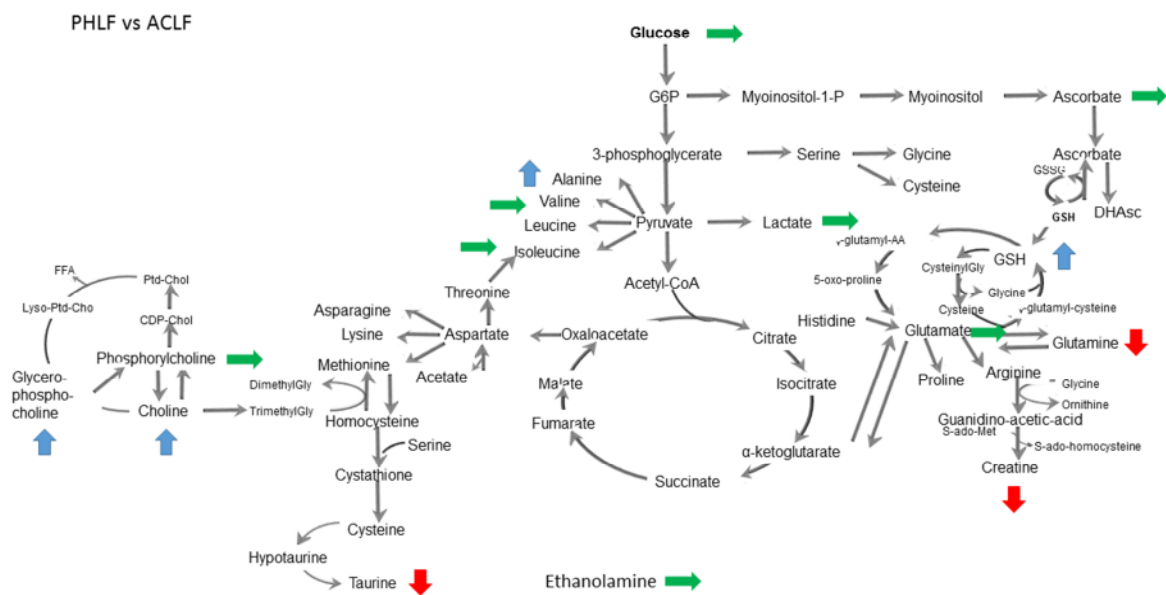


Figure 15 : analyse de réseau ADEMA pour comparant les profils métaboliques de patients cirrhotiques en ACLF stade 2 ou 3 (n=) avec des patients hépatectomisés en insuffisance hépatique mortelle (n=5)

Les profils métaboliques des foies cirrhotiques en ACLF ou non ACLF ne présentaient pas les mêmes métabolites discriminants à savoir que les foies en ACLF présentait des taux inférieurs de glucose et ascorbate.(Figure 16)

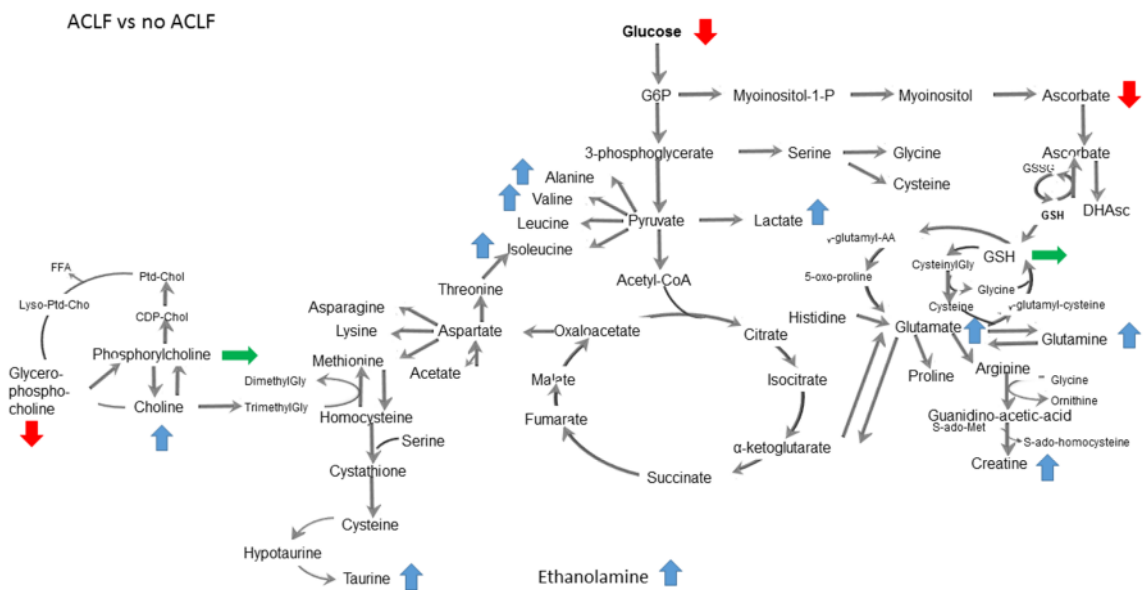


Figure 16 : analyse de réseau ADEMA comparant les profils métaboliques de patients cirrhotiques selon la présence d'une ACLF stade 2 ou 3 versus une absence d'ACLF.

Discussion

Il s'agit de la 1ère étude démontrant l'intérêt de la métabolomique HR-MAS-NMR en post-hépatectomie chez l'homme. Elle montre une altération significative du métabolisme cellulaire au décours d'une hépatectomie à risque élevé de mortalité qui n'est pas comparable à celle observée dans le cadre de la cirrhose décompensée. Elle montre une similitude de profil métabolique avec les profils déjà publiés de système pluricellulaire en prolifération tel que le cancer ou les cellules immunitaires activées. La précocité de ces altérations métaboliques présente une signification particulière tant sur le plan pratique que fondamental.

Sur le plan fondamental, la précocité de ces phénomènes métaboliques pourrait précéder les modifications histologiques observées au décours des hépatectomies majeures. L'altération des voies énergétiques démontrée par les différences significatives dans les métabolites de la glycolyse et de la néoglucogénèse ainsi que dans le métabolisme des cholines permettrait d'approfondir les modifications métaboliques précoces au décours de l'agression chirurgicale et de la réduction du volume hépatique.

Sur le plan pratique, l'identification de profils métaboliques à risque au décours immédiat d'une hépatectomie permettrait d'intensifier la surveillance et de mettre en place des stratégies ciblées de modulation des paramètres cliniques déjà connus. En effet, en l'absence de traitement efficace de

l'insuffisance hépatocellulaire à l'heure actuelle, la prévention du 2nd hit (infection, hypovolémie relative ou absolue, poussée d'hypertension portale) joue un rôle décisif dans l'issue de ces hépatectomies.

Les modifications métaboliques observées font écho aux modifications cellulaires ultrastructurales décrites dans l'introduction à cette 2^{nde} partie. Nous ne reviendrons pas en détail sur celles-ci simplement pour rappeler que les modifications de taille et de ploïdie des hépatocytes après hépatectomie peuvent être corrélées aux modifications métaboliques observées. En effet, l'augmentation de la glutamine et de l'alanine est associée à un flux de sodium et d'eau responsable d'une hypertrophie cellulaire par l'œdème, ces 2 acides aminés étant de puissants osmolytes.^{78,79} Les modifications métaboliques observées dans des modèles de déficit en autophagie. Les nombreuses études récentes sur l'autophagie et la régénération hépatique ont montré que le switch métabolique vers la glycolyse et la néoglucogenèse, à partir des acides aminés principalement, sont contemporains de l'hypertrophie cellulaire. Cette hypertrophie cellulaire est principalement rencontrée dans les modèles de déficit autophagique qui sont liés à une altération de la régénération hépatique.^{80,16}

L'élévation du contenu en acides aminés néoglucogéniques pourrait donc être un marqueur central d'une adaptation métabolique défavorable au décours de l'hépatectomie, comme marqueur d'un déficit dans les mécanismes régulateurs centraux de la survie cellulaire.

En association avec l'activation de la glycolyse et de la néoglucogenèse, l'inhibition de la phosphorylation oxydative et la répression de la biosynthèse lipidique orientent également vers une dysfonction mitochondriale. Or, en plus de son rôle métabolique, la mitochondrie joue également un rôle dans la régulation de la taille de la cellule.⁵²

Les mécanismes à l'origine de cette dysfonction mitochondriale sont multiples et ne peuvent faire l'objet que d'hypothèse dans le cadre de cette thèse. Il est possible d'envisager un rôle central de l'hypoxie et de l'ischémie. En effet, au cours de l'hépatectomie, il survient, notamment en cas de clampage pédiculaire des phénomènes d'ischémie-reperfusion qui sont classiquement rapportés à une dysfonction mitochondriale. Il ne faut pas oublier également que le processus même de régénération hépatique va entraîner la formation de zones dépourvus d'oxygénation efficace dans les heures suivant le geste chirurgical. L'asynchronisme de prolifération des cellules endothéliales et des hépatocytes expliquent ces déficits d'oxygénation dans les jours suivant une hépatectomie mais ne semblerait pas pouvoir expliquer les modifications métaboliques rencontrées si tôt au décours de l'hépatectomie. De nombreux travaux portant sur la régénération ont maintenant prouvé que l'ischémie était un stimulant de la régénération puisque HIF1 α est activé au décours d'une

hépatectomie. La modulation de mTOR via HIF1a pourrait expliquer certaines modifications métaboliques telles que l'activation de la glycolyse. Mais la phase initiale ischémique pourrait conduire à des atteintes significatives de certaines populations cellulaires notamment les cellules à l'origine de la régénération des cellules biliaires.

Les lactates sont un marqueur intéressant de l'ischémie induite au décours d'une hépatectomie. Certains auteurs ont montré le caractère prédictif d'un taux élevé de lactates immédiatement après hépatectomie.⁸¹ Toutefois, bien qu'identifié parmi les métabolites en quantité supérieure en cas d'IHC, la valeur prédictive des lactates intra-hépatiques restent faibles. Il faut toutefois souligner la différence entre lactates systémiques et lactates intra-hépatiques. L'origine des lactates systémiques n'est pas forcément hépatique au décours d'une hépatectomie et le rein, les muscles peuvent être d'importants contributeurs à l'hyperlactatémie. Il faut également noter que le lactate peut être utilisé par la cellule comme précurseur du glucose notamment dans les cas d'hypoglycémie comme cela peut être le cas au décours immédiat d'une hépatectomie. Dans le cas de la cirrhose décompensée, l'utilisation des lactates par le cerveau améliore l'encéphalopathie par un mécanisme non encore totalement élucidé.

La souffrance cellulaire immédiatement post-hépatectomie peut également entraîner une dysfonction d'autres organelles notamment le réticulum endoplasmique. Des études récentes ont montré la place centrale du stress du réticulum endoplasmique (SRE) en hépatologie. Dans les modèles animaux, le SRE est favorisé par le régime riche en graisse et l'état inflammatoire qui en découle.⁸² Il entre donc dans la physiopathologie de la NASH. Après hépatectomie élargie, le SRE favorise l'apoptose particulièrement en cas de clampage pédiculaire. La chimiothérapie préopératoire induit également un SRE et l'induction de protéines chaperonnes permettrait de réduire ce stress et de diminuer la toxicité de la chimiothérapie au niveau du foie.⁸³ L'augmentation des ratio choline/glycérophosphocholine et phosphocholine/glycérophosphocholine pourrait être un marqueur de SRE au décours de l'hépatectomie. Ainsi la baisse du taux de glycérophosphocholine dans les foies d'IHC mortelle pourrait être un biomarqueur de la souffrance et du stress cellulaire. La valeur prédictive très intéressante de ce marqueur dans cette étude doit être soulignée car il pourrait être validé prospectivement comme biomarqueur. Il est à noter l'élévation du ratio éthanolamine/phospho-éthanolamine comme marqueur de risque de mortalité après hépatectomies sur foie de NASH pourrait être rapproché de cette observation.

Cette étude présente des limites inhérentes à son caractère rétrospectif. Une 1^{ère} observation est le taux élevé d'IHC et de mortalité post-hépatectomie dans la série analysée. Il faut rappeler toutefois que l'objectif ayant été d'identifier des facteurs de risque de mortalité, nous nous sommes

concentrés sur les patients à risque de mortalité ce qui exclut, de fait, une proportion non négligeable de patients n'ayant pas fait d'IHC. Deuxièmement, la congélation rapide des échantillons n'a pas été toujours possible. Afin de limiter les biais liés à une ischémie post-prélèvement des échantillons ont été exclus de l'analyse métabolique. Une attention particulière à la congélation rapide des échantillons des patients les plus à risque d'IHC a été portée ce qui explique que le nombre de patients en IHC soit élevé. Au total, un biais de sélection ayant augmenté le nombre de patients à très haut risque d'IHC combiné à une sélection diminuant le dénominateur explique ce taux élevé d'IHC.

Une autre limite porte sur le fait que seules des biopsies de fin d'hépatectomie ont été réalisées et qu'il n'existe pas de prélèvement de foies sains non hépatectomisés. Ceci provient d'une part de l'absence de consentement pour le prélèvement de foie chez des patients non opérés d'hépatectomie ce qui représente la limite principale.

La précocité des altérations métaboliques mises en évidence font poser la question de l'origine de ces altérations. En effet, il est possible de poser l'hypothèse que ces modifications reflètent plus la qualité du parenchyme sous-jacent ainsi que les éventuelles modifications métaboliques induites par une maladie plus extensive plutôt que l'impact de l'hépatectomie en elle-même. Il est à noter que les patients décédés d'IHC présentaient un taux supérieur de bilirubine et étaient plus souvent cirrhotiques ce qui correspond à des paramètres classiquement associés à l'IHC post-hépatectomie.

Les différences des profils métaboliques, notamment en termes de phospholipides ou de métabolites impliqués dans la néoglucogenèse sont en effet rencontrées dans la stéatose et la cirrhose, comme vu dans l'introduction de cette thèse. Toutefois, comme souligné dans l'article récent de Alonso et al., il existe des profils lipidiques différents de NAFLD ce qui pourrait également être applicable aux modifications des profils lipidiques après hépatectomie. Il est intéressant de rappeler une étude de Starzl et al. sur la tolérance du foie à l'ischémie selon l'expression de la LCAT, enzyme impliquée dans le métabolisme des phospholipides.⁸⁴ De plus, les données semblent montrer à l'inverse que la qualité du parenchyme et l'indication opératoire ne sont pas prédictives du profil métabolique - même si la population ne permet pas de conclure définitivement quant à l'absence d'une différence. Par ailleurs les analyses de réseau semblent montrer que les modifications métaboliques du foie de cirrhose décompensée et du foie non fonctionnel après hépatectomie ont peu de choses en commun. Ainsi les données permettent de supposer une autre hypothèse.

Le profil métabolique de fin d'hépatectomie est un marqueur de la tolérance d'un parenchyme hépatique donné à une intervention donnée. Ainsi un prélèvement en début d'hépatectomie n'identifierait qu'une proportion de patients à risque car il ne prendrait pas en compte la phase

peropératoire. Le degré variable de la réponse inflammatoire ainsi que la réponse métabolique variable de chaque foie font du prélèvement de fin d'hépatectomie un moment plus adéquat. D'autre part, poser l'hypothèse que seule la qualité du parenchyme impacterait le profil métabolique supposerait que le risque d'IHC ne dépend pas du volume de foie réséqué ou des événements peropératoires ce qui va à l'encontre de la littérature actuelle. Un prélèvement plus tardif qui prendrait en compte d'éventuels événements postopératoires significatifs est difficile à envisager compte tenu des troubles de la coagulation après hépatectomie. Ainsi la biopsie de fin d'hépatectomie nous semble la plus à même d'identifier les patients à risque.

Le problème majeur de l'IHC actuellement est l'absence de traitement efficace. Ainsi l'intérêt immédiat d'identifier les patients à risque une fois le geste effectué peut paraître limité. Toutefois, il permet d'envisager ce que l'on pourrait appeler une "intervention métabolique" qui serait une approche élégante de la prévention de l'IHC.

L'intervention métabolique est actuellement à l'étude dans de nombreux domaines de la médecine. En hépatologie, la place de la metformine est intensément étudiée. Des essais randomisés de phase II et III sont en cours pour évaluer la place de la metformine dans le traitement du CHC. La metformine a également démontré son intérêt en tant qu'inhibiteur de l'AMP kinase. Dans un modèle murin, la metformine permet une forme d'immunomodulation en inhibant le métabolisme des lymphocytes T permettant ainsi d'obtenir un effet immunosuppresseur préventif du rejet cellulaire.⁸⁵ De la même façon, son utilisation en tant qu'« anti-inflammatoire » semble bénéfique chez les grands brûlés avec un effet anti-lipolytique.⁸⁶ La mise en évidence dans notre série d'une différence significative de profil métabolique entre les diabétiques traités par metformine ou non pourra faire l'objet d'une étude ultérieure plus large.

Une autre intervention métabolique serait en rapport avec le stress du réticulum endoplasmique. Comme vu plus haut, le stress endoplasmique joue un rôle majeur dans la survie après hépatectomie majeure particulièrement sur foie pathologique. Le clamping intermittent a démontré un effet bénéfique sur le SRE.⁸⁷ Un certain nombre de médicaments modifiant la circulation portale et artérielle hépatique semble également réguler ce stress du réticulum endoplasmique. La co-administration de prostaglandine E1 et de somatostatine diminue la réponse inflammatoire et le SRE. Dans un modèle porcin, la modulation du flux portal était obtenue par administration continue de somatostatine.⁸⁸ Or l'octréotide a démontré son effet en terme métabolique. Une étude métabolique après hépatectomie a montré des modifications significatives du cycle de la méthionine avec inhibition de la prolifération précoce des hépatocytes et un effet bénéfique sur la survie. Le taux de méthylthioadénosine, métabolite intermédiaire du cycle de la méthionine, était

associée à la survie après hépatectomie massive⁸⁹ De prochaines analyses sur les prélèvements de foies de porc ayant bénéficié d'une modulation dynamique du flux porte par anneau portal permettront d'avancer dans la connaissance des mécanismes métaboliques impliqués dans ce phénomène.⁹⁰

En conclusion, la métabolomique par HR-MAS-NMR permet de prédire la survenue d'une insuffisance hépatocellulaire sur un prélèvement de fin d'hépatectomie. La prise en compte de ces résultats pourrait conduire à une surveillance renforcée de ces patients et à un traitement précoce et agressif, voire préventif, des complications extra-hépatiques qui précipitent souvent le décès dans ces cas. L'identification de voies métaboliques, distinctes de la cirrhose décompensée mais comparable à celle de systèmes en prolifération, supporte l'hypothèse selon laquelle l'IHC mortelle est due à une stimulation exagérée de la prolifération hépatocytaire dans la phase précoce. Ces voies métaboliques pourraient faire l'objet d'intervention métabolique dans l'avenir afin de réduire le risque d'IHC.

Introduction

A la fin du XIX^{ème} siècle, la théorie oncologique du « seed and soil » a été largement répandue à partir des idées de Stephen Paget. Selon cette théorie, le site et la probabilité d'implantation des métastases ne se fait pas au hasard. Bien que pour le cancer colo-rectal, le fait que le site le plus fréquent des métastases soit aisément expliqué par la position anatomique du foie, sur la voie de drainage des veines mésentériques, la probabilité de nouveau site métastatique pouvait être expliquée par un environnement plus ou moins adéquat pour la fixation des cellules tumorales circulantes. La présence de ces cellules tumorales circulantes est aujourd'hui attestée et est un paramètre pronostique à condition d'être recherché par des techniques complexes. L'expression au niveau du foie de molécules d'adhésion est variable et a également démontré un impact sur le risque de récurrence.

Bien que cette théorie soit tombée quelque peu en désuétude à une certaine époque – justement au détriment de la théorie dite anatomique - de nombreuses données de biologie moléculaire semblent attester de l'impact du microenvironnement local sur la probabilité d'implantation des cellules tumorales. Il est aujourd'hui largement rapporté que le risque de fixation de cellules tumorales est augmenté au décours d'une hépatectomie. Plusieurs études sur des modèles animaux ont ainsi montré que plus l'extension de l'hépatectomie est importante plus la charge tumorale est importante. Ceci est rapporté à l'environnement inflammatoire et aux mécanismes communs qui régissent la régénération hépatique et l'oncogenèse. Ainsi il est connu que les récepteurs de l'HGF sont exprimés de façon accrue après une hépatectomie. Or ces récepteurs possèdent un ligand exprimé à la surface des cellules de cancer colo-rectal.

Le microenvironnement joue un rôle majeur dans la probabilité d'implantation et de croissance des cellules tumorales une fois franchi la barrière endothéliale au niveau du foie. Il a été récemment démontré que le profil génétique du foie non tumoral prédisait le risque de récurrence après résection de métastase. D'autre part, l'environnement métabolique des cellules tumorales a fait l'objet de nombreuses études qui ont démontré l'impact de l'acidification du milieu sur la capacité de ces cellules à croître. Le métabolisme local, cause ou conséquence du niveau d'oxygénation, pourrait donc être un paramètre prédictif du risque de récurrence après hépatectomie.

Le but de cette étude préliminaire était d'évaluer l'intérêt de l'analyse métabolomique du foie restant sur le risque de récurrence après hépatectomie pour métastase de cancer colo-rectal et d'identifier de potentiels biomarqueurs prédictifs de récurrence de métastases après hépatectomie.

Matériel et méthode

L'analyse a porté sur 17 patients ayant bénéficié de 19 hépatectomies pour métastases hépatiques de cancer colo-rectal et de tumeur endocrine afin d'évaluer l'impact de la qualité du parenchyme hépatique sur le homing hépatique des cellules tumorales de façon globale. Les caractéristiques de ces patients sont rapportées au tableau 5.

Tableau 5 : caractéristiques des patients inclus dans l'analyse du risque de récurrence à 1 an par la métabolomique

Age	61 (46 - 84)
Sexe Masculin	6 (35%)
Indication	
MHCCR	17 (89%)
MHTE	2 (11%)
IMC (kg/m ²)	
Diabète	3 (28%)
Chimiothérapie néo-adjuvante	19 (100%)
Embolisation portale préopératoire	2 (12%)
Intervention	
Hépatectomie majeure	11 (58%)
Hépatectomie mineure	2 (16%)
Résection atypique	3 (16%)
CARE	3 (16%)
Résection extra-hépatique associée	
Récidive à 1 an	14 (74%)

La majorité des patients (84%) présentait une maladie métastatique avancée, les 2 résections mineures étant des résections de 1^{er} temps d'hépatectomie avec récurrence dans le futur foie restant. Le nombre médian de nodules réséqués était de 6 (1-15) avec une taille maximale de 43mm (10-65).

L'analyse métabolomique a été réalisée selon les méthodes citées plus haut.

Critère de jugement

Le critère de jugement principal était la survenue d'une récurrence dans l'année suivant l'hépatectomie. Une récurrence était diagnostiquée par l'imagerie réalisée systématiquement dans le cadre du suivi ou devant une élévation des marqueurs tumoraux. Une preuve histologique de la récurrence n'était pas considérée comme nécessaire à partir du moment où il existait une apparition d'un nodule dans un site non traité ou un nodule suspect associé à une élévation du marqueur tumoral. A noter que la réc

Résultats

Au total, 14 patients ont présenté une récurrence dans l'année suivant l'hépatectomie.

Le profil métabolique du foie restant prédit le risque de récurrence

La comparaison des profils métaboliques entre les patients ayant présenté une récurrence versus ceux n'ayant pas présenté de récurrence par OPLS-DA montrait une différence significative de profil métabolique ($Q^2=0,636$). (Figure 17)

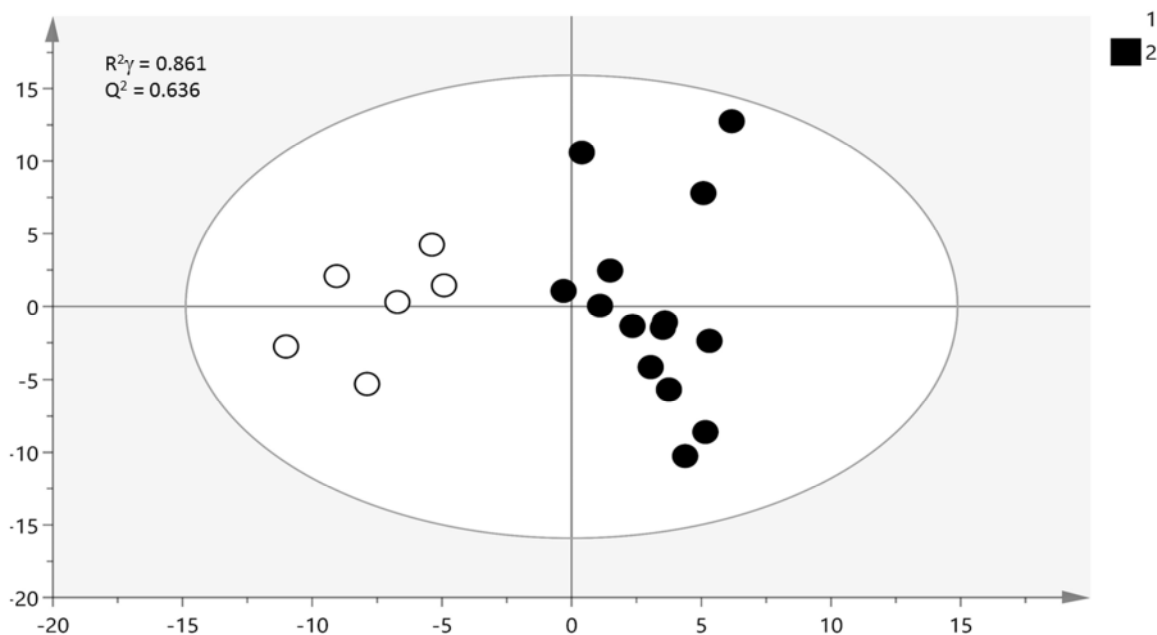


Figure 17 : Analyse OPLS-DA pour le risque de récurrence à 1 an de métastases hépatiques opérées

Identification de biomarqueurs associés au risque de récurrence

L'analyse de réseau ADEMA permettait de montrer une élévation significative des acides aminés glucoformateurs, du glucose et du lactate ainsi que de la glycérophosphocholine. La quantité d'ascorbate, de glutamate et de glutamine ainsi que d'éthanolamine étaient significativement plus bas. (Figure 18)

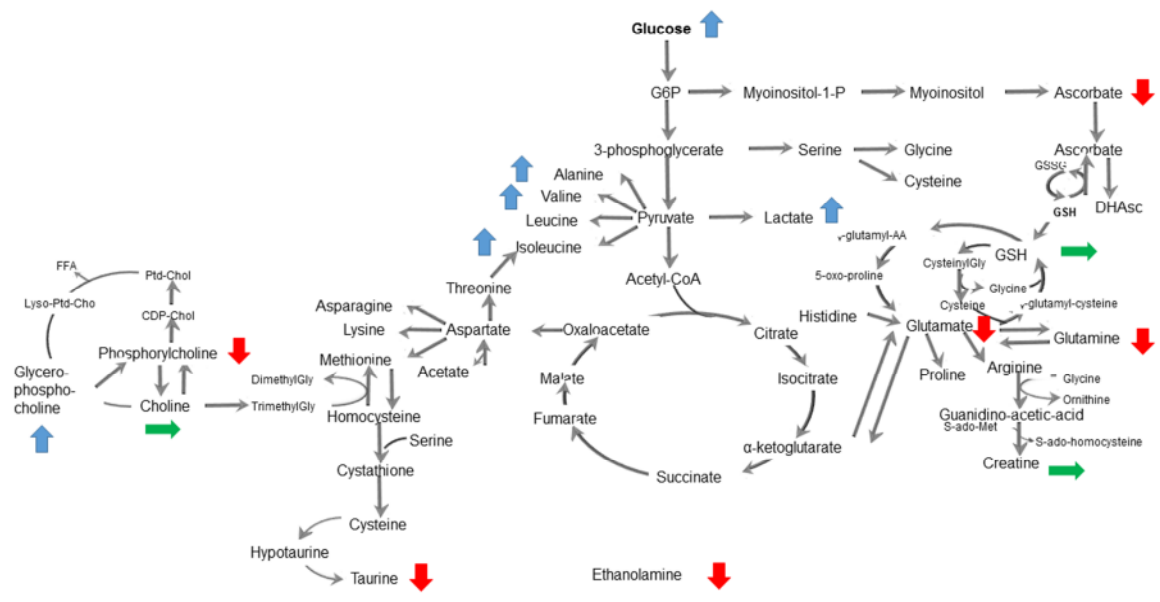


Figure 18 : analyse de réseau ADEMA pour le risque de récurrence de métastase hépatique après hépatectomie

Parmi les métabolites identifiés par l'analyse de réseau, les courbes ROC permettaient d'identifier un faible taux d'ascorbate et d'éthanolamine comme prédictif de récurrence. L'ascorbate était un excellent biomarqueur avec un seuil < 0,227mmol/g (sensibilité et une spécificité de 80% et 86% respectivement (AUROC 0,829; IC95% 0,634-1). L'AUROC pour l'éthanolamine était à 0,714. (Figure 19)

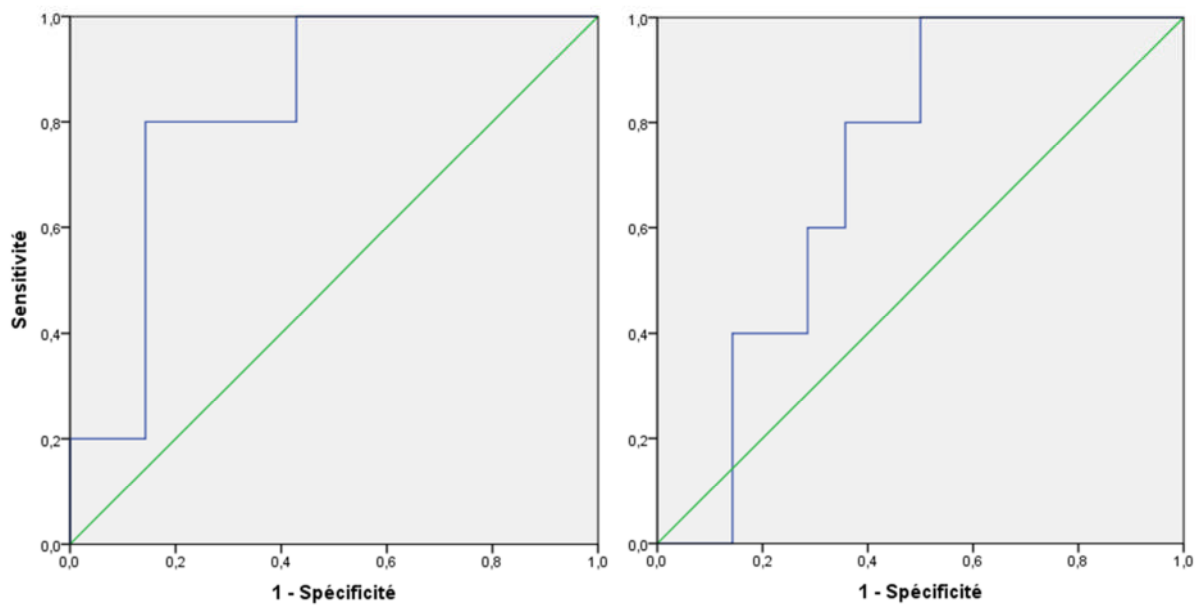


Figure 19 : courbes ROC pour la valeur prédictive de l'ascorbate (à gauche) et de l'éthanolamine (à droite) pour la récurrence des métastases hépatiques en fin d'hépatectomie

Discussion

Il s'agit d'une étude préliminaire qui montre l'intérêt de l'analyse du métabolisme du parenchyme restant sur le risque de récurrence après hépatectomie pour métastases hépatiques de cancer colorectal. Elle permet d'identifier l'éthanolamine comme un biomarqueur prédictif de récurrence qui pourrait dès lors servir pour l'indication de chimiothérapie.

Cette étude montre l'impact majeur du microenvironnement hépatique sur le homing des cellules tumorales circulantes. De nombreuses études ont portées sur le sujet en montrant que l'existence de ces cellules est un facteur de risque de récurrence. La présence d'un environnement adéquat pour leur migration et leur croissance pourrait être un élément déterminant du risque de récurrence. Chez l'homme, il est démontré que la survenue d'une insuffisance hépato-cellulaire - dont nous avons vu l'association avec un profil métabolique spécifique – est associée à un risque accru de récurrence après hépatectomie.⁹¹ La question de savoir si ce risque était dû aux causes (extension de l'hépatectomie) ou aux conséquences (insuffisance hépatocellulaire) de l'hépatectomie n'était pas abordée sous le versant métabolique. La mise en évidence d'un biomarqueur différent de ceux retrouvés comme biomarqueurs de l'insuffisance hépatocellulaire nous pousse à penser qu'il existe, outre l'impossibilité de réaliser une chimiothérapie adjuvante chez ces patients, une cause directement liée au parenchyme hépatique et aux modifications métaboliques post-hépatectomie pour expliquer ce phénomène.

A 1^{ère} vue, la croissance tumorale après hépatectomie est un sujet de controverse dans la littérature puisque les études murines sur le sujet semblent apportées des réponses variables. Toutefois une analyse fine conduit à une conclusion plutôt homogène. Les études ayant évalué la croissance de tumeurs en place au moment de l'hépatectomie (modèle applicable à l'hépatectomie en 2 temps) montrent une absence de stimulation de la croissance tumorale au moins dans la phase de prolifération cellulaire.^{92,93} A l'inverse, les études évaluant le homing des cellules tumorales (modèle applicable à la récurrence après hépatectomie) montrent un effet promoteur de la régénération hépatique sur l'implantation des cellules tumorales.⁹⁴

L'intérêt de l'analyse métabolomique est d'identifier au sein d'un profil métabolique un biomarqueur prédictif de récurrence, l'ascorbate.⁹⁵ Cet anti-oxydant est déjà connu comme ayant un rôle anti-tumoral mais les doses auxquelles il est présent dans les organes n'explique probablement que partiellement l'observation. La diminution du taux d'ascorbate dans le foie en post-hépatectomie pourrait être un marqueur de souffrance tissulaire qui est également retrouvé dans les foies présentant une insuffisance hépato-cellulaire.

On peut supputer un rôle du système immunitaire dans le risque accru de récurrence. En effet, les cellules immunitaires présentent une sensibilité importante au microenvironnement. Il est d'ailleurs démontré que le microenvironnement tumoral est modifié par le métabolisme des cellules cancéreuses. L'effet Warburg observé dans les cellules tumorales entraîne une production de lactate indépendante du degré d'ischémie.⁹⁶ L'acidification du milieu consécutive à ce métabolisme joue un rôle immunomodulateur.

Cette étude est une étude préliminaire comprenant un faible nombre de patients et pour lesquels les résultats doivent être pris avec précaution. Une cohorte plus large doit être conduite pour valider ces données en prenant en compte les facteurs confondants tels que la biologie tumorale et l'état du parenchyme avant hépatectomie. Toutefois, l'analyse de réseau présente, dans ces cas, l'intérêt de pouvoir être interprétable compte tenu de son caractère multivarié. Le taux de récurrence est relativement élevé mais correspond au taux de survie sans récurrence des patients opérés présentant des maladies métastatiques avancées. L'inclusion de patients ayant à la fois des métastases de cancer colo-rectal et de tumeur endocrine permettrait de pallier à l'effet de la biologie tumorale et de faire ressortir le rôle spécifique du terrain hépatique sur le risque de récurrence. Le facteur confondant que pourrait représenter l'extension de l'hépatectomie, qui témoigne d'une maladie métastatique plus avancée, peut être supporté par le fait que certains éléments du profil sont communs au profil mis en évidence dans le chapitre précédent sur l'insuffisance hépatique. Toutefois, les patients ayant subi une insuffisance hépatique mortelle n'ayant pas été inclus, le profil et les biomarqueurs identifiés restent valables et pourraient être utilisés dans la pratique clinique.

L'identification de ces biomarqueurs peut en effet être utilisée d'une part pour l'indication d'une chimiothérapie adjuvante mais également pour l'intensification de la surveillance. Par ailleurs, comme il est déjà suggéré dans la littérature l'administration de vitamine C pourrait, à des doses importantes, potentialiser l'effet de la chimiothérapie et ralentir la progression ou l'installation des cellules tumorales dans le foie.

Les recherches futures doivent s'orienter vers l'identification de populations cellulaires sensibles au déficit en ascorbate afin de déterminer des stratégies ciblées de modification du microenvironnement tumorale ou de l'environnement hépatique après hépatectomie.

Conclusion de la 1^{ère} partie

Cette 1^{ère} partie montre que :

- La métabolomique par HR-MAS-RMN permet de prédire le risque d'insuffisance hépatocellulaire en identifiant des profils spécifiques associés à la mortalité post-opératoire
- Le profil métabolique associé à l'insuffisance hépatique mortelle correspond à une activation de la glycolyse avec effet Warburg ainsi qu'une anomalie de la conjugaison de la choline en faveur d'un stress du réticulum endoplasmique. Ce profil est comparable à ceux retrouvés dans la littérature pour les systèmes cellulaires en prolifération.
- Le profil métabolique du foie en fin d'hépatectomie est associée au risque de récurrence signant une susceptibilité du parenchyme hépatique à l'implantation des cellules circulantes chez certains patients.

Partie 2 : intérêt de la métabolomique en transplantation hépatique

La transplantation hépatique

La transplantation est le seul et le meilleur traitement des maladies terminales du foie et du carcinome hépato-cellulaire. Elle consiste à réaliser une hépatectomie totale et à réimplanter un greffon en le reconnectant à l'ensemble des vaisseaux et au tube digestif (pour la voie biliaire) du receveur.

Indications de la transplantation hépatique

Il existe actuellement 2 grandes indications de la transplantation hépatique : la 1^{ère} est la cirrhose décompensée, la seconde les cancers du foie non opérables

L'évaluation de la balance bénéfico-risque est complexe dans la situation de receveur très fragile. Le risque de mortalité du receveur, en l'absence de greffe, est aujourd'hui déterminé par le score de MELD qui utilise 3 données biologiques (bilirubine, INR, créatinine) pour prédire la mortalité à 3 mois.⁹⁷ L'implémentation de ce score dans les systèmes d'attribution des greffons depuis maintenant une dizaine d'années semble avoir permis une réduction de la mortalité sur liste d'attente.⁹⁸ Toutefois, les résultats de la greffe chez les patients favorisés par le score de MELD semblent en deçà de ceux des patients présentant une cirrhose compensée. Certains ont souligné l'importance d'attribuer des greffons de bonne qualité à ces receveurs très fragiles afin de limiter l'impact des donneurs à critères élargis sur les résultats à long terme. D'autres ont montré qu'au contraire, seuls les patients avec une cirrhose compensée palliaient de l'utilisation de greffons « limites ».⁹⁹

Le système actuel d'attribution des greffons est nominatif, basé sur un score développé par l'Agence de Biomédecine qui gère le système des greffes en France. Ce score est principalement basé sur le MELD. Lorsqu'un donneur est proposé à une équipe, il est proposé à un receveur donné selon le score recalculé en prenant en compte la distance entre le site de prélèvement et le site du receveur. Ce dernier item a pour but de réduire le temps d'ischémie froide (TIF).

Technique

L'hépatectomie totale constitue la 1^{ère} phase de la transplantation et comprend la ligature et la section des vaisseaux afférents et efférents au foie. Il s'ensuit une ischémie du foie natif qui sera réséqué et une ischémie veineuse du tube digestif dont le drainage veineux se fait par la veine porte.

Cette congestion splanchnique n'est pas systématique pour 2 raisons. D'une part, les patients cirrhotiques présentent dans 30 à 50% des cas des voies de dérivations porto-systémiques spontanées développées au cours de l'histoire de leur maladie chronique. Un certain nombre de ces

shunts sont hémodynamiquement efficaces expliquant la tolérance à une thrombose porte qui survient chez 10 à 15% des patients cirrhotiques. Chez ces patients, le clampage portal n'induit que peu d'hypertension portale d'amont du fait de l'adaptation préalable du système veineux splanchnique. Chez les patients ne présentant pas de tels shunts, il est courant de pratiquer, au cours de la transplantation, une dérivation porto-cave temporaire soit par la réalisation d'une anastomose porto-cave termino-latérale¹⁰⁰ soit par la mise en place d'un shunt extra-corporel passif ou actif mésentérico-saphène ou mésentérico-axillaire.¹⁰¹ Il a été démontré que la réalisation d'une dérivation porto-cave permettait une réduction des besoins transfusionnels, une réduction du risque d'insuffisance rénale post-opératoire ainsi qu'une amélioration de la survie.

La phase d'anhépatie qui débute au clampage porte est critique du fait des dysrégulations métaboliques liées à l'absence de foie. Elle se terminera à la revascularisation du greffon lors du déclampage de la veine porte. La poursuite de l'explantation se fait par la section des veines hépatiques et l'implantation du greffon.

L'implantation du greffon se fait dans un ordre constant avec réalisation des anastomoses cavo-sus-hépatiques puis porte. La reperfusion portale a généralement lieu avant la reperfusion artérielle bien que certains réalisent une reperfusion simultanée afin de réduire le temps d'ischémie chaude des voies biliaires.¹⁰² En effet, les voies biliaires qui sont remises en continuité après la reperfusion artérielle sont très sensibles à l'ischémie artérielle. Les complications biliaires, qui sont majoritairement d'origine vasculaire, représentent la principale complication de la transplantation hépatique avec des conséquences à court et long terme non négligeables.¹⁰³ Des études récentes ont précisément identifié les plexus vasculaires et l'atteinte des glandes péri-biliaires péri-luminale comme marqueurs du risque de complications.¹⁰⁴ L'identification de modifications métaboliques associées à la composition de la bile fait envisager la prédiction possible de complications biliaires par une analyse métabolique du greffon.¹⁰⁵

Sélection du donneur et du greffon

En France, la transplantation hépatique est réalisée grâce au don d'organes prélevés dans 99% chez des donneurs en mort encéphalique. Le prélèvement d'organe et particulièrement celui du foie est un facteur déterminant de la réussite de la greffe. Toutes les phases, depuis la sélection à la reperfusion, vont déterminer les résultats à court et long terme.

La qualité du greffon dépend d'un certain nombre de facteurs qui ne font pas l'unanimité dans la littérature. En effet, la définition du donneur à critère élargi (c'est-à-dire du donneur dont le greffon présente un risque accru de dysfonction ou de nécessité de retransplantation) varie selon les groupes

d'étude. Il est toutefois possible de faire ressortir des facteurs de risque communément reconnus : l'âge et le degré de stéatose sont des paramètres fréquemment mis en avant.

A partir de 55 ou 65ans, selon les auteurs, l'âge est un des facteurs les plus associés à une réduction des résultats à court et long terme.¹⁰⁶ Le vieillissement cellulaire avec une moindre réserve énergétique et une moindre capacité de prolifération cellulaire, nécessaire à la régénération après reperfusion, semblent expliquer en partie ces résultats. Ainsi l'âge ne constitue pas en soit une contre-indication au prélèvement.¹⁰⁷

Le degré de stéatose est également très communément rapporté comme facteur de risque de mauvais résultat.¹⁰⁸ De nombreuses études ont corrélé le degré de stéatose et le risque de dysfonction du greffon. Ce risque paraît augmenté à partir de 30% de stéatose. Il est communément admis qu'un greffon présentant une stéatose > 60% présente un risque rédhibitoire. Là encore, il convient de préciser et de relativiser. Tout d'abord, il semblerait que seule la stéatose macrovésiculaire soit associée à une réduction des résultats.¹⁰⁹ Ceci serait dû au fait qu'une accumulation de cholestérol est plus à risque que celle de triglycérides. La sensibilité à l'hypoxie des hépatocytes sièges d'une stéatose macrovésiculaire semble très importante et expliquerait les données de la littérature. Alors que l'apoptose prédomine dans le foie sain, l'hypoxie entraîne une nécrose dans le foie stéatosique.¹¹⁰ Bien que le seuil au-delà duquel une stéatose est considérée comme significative soit fixée à 30% par la plupart des équipes, les effets significativement néfastes semblent advenir pour des seuils plus élevés de l'ordre de 50 à 60%. Mais là encore, la stéatose pourrait ne pas être un critère unique suffisant pour refuser un greffon compte tenu du fait que plus des 2/3 de greffons sévèrement stéatosiques présentent un fonctionnement satisfaisant.¹¹¹ En pratique, l'évaluation du degré de stéatose est extrêmement complexe pendant le prélèvement¹¹² et il existe des limites à l'évaluation histologique extemporanée de cette stéatose.¹¹³

En dehors de ces 2 critères majeurs, l'EASL a rapporté le BMI, le taux de bilirubine, d'ASAT, d'ALAT et la durée de ventilation avant le prélèvement comme des critères de donneur élargis.¹¹⁴ Le groupe européen d'Eurotransplant y ajoute le taux de γ GT.¹¹⁵ Le donor risk index utilisé aux Etats-Unis pour l'évaluation du risque lié au donneur prend également en compte l'ethnie du donneur (donnée non disponible en France), le caractère partiel du greffon, la taille du donneur (avec une taille « optimale » de 1,70m).¹¹⁶

Du fait de la pénurie de greffons, les équipes de greffe hépatique tendent à utiliser de plus en plus ces greffons de donneurs à critères élargis. L'impact de leur utilisation semble existant mais modéré.

Petite histoire moléculaire du greffon hépatique (d'après ¹¹⁷)

Le futur greffon hépatique subit d'abord les conséquences de la mort encéphalique. En effet, l'orage cytokinique survenant au moment de la mort encéphalique correspond hémodynamiquement à un choc septique. Il s'ensuit une souffrance hypoxique des organes du donneur qui est bien traduite par une altération des paramètres biologiques et notamment une augmentation des lactates, non systématique mais fréquente, une cytolysé hépatique et une élévation de la créatinine concomitamment à une diminution de la diurèse. Dans la plupart des cas, ces anomalies ont disparues au moment du prélèvement d'organe. La persistance d'anomalies biologiques est rapportée comme un facteur de mauvais pronostic et peut conduire à rejeter une proposition de greffon (cf plus loin).

Lors du prélèvement, le futur greffon va être perfusé (sérum physiologique ou Ringer-lactate –le plus souvent la dernière solution est préférée) avant le clampage de l'aorte qui marque le début de l'ischémie froide. En fait d'ischémie froide, le greffon passe par une phase de lavage et d'ischémie « tiède » avant d'être extrait et conditionné dans la glace où débute l'ischémie froide réelle. Après transport vers le centre de greffe, il va être préparé puis éventuellement reconditionné ou directement implanter selon l'organisation et les circonstances spécifiques de la greffe.

Il faut distinguer en fait 2 éléments dans cette phase de conservation froide : 1/ l'ischémie proprement dite, 2/ le froid.

Au cours de la conservation au froid, le métabolisme du greffon est diminué sans être totalement nul. Les réserves énergétiques se réduisent avec notamment une baisse de la quantité d'ATP disponible. Par ailleurs, le métabolisme anaérobie lié au mode de conservation statique conduit à la production de radicaux libres sous la forme de réactifs de l'oxygène tels que l' H_2O_2 et l' O_2^- .

L'ischémie hépatique même courte est marquée par une baisse de l'ATP (plus faible que dans le rein et associée à une diminution plus faible de glucose-6-phosphate en rapport avec les stocks de glycogène), une accumulation rapide de lactate et une élévation des hexose-6-phosphate et des triose-phosphates. Le statut nutritionnel joue dans les adaptations métaboliques. L'élévation du lactate est d'autant plus rapide que le sujet est dénutri et le rapport [glutamate] / [α -cétoglutarate] [NH₄] est plus élevé avec un rapport NAD⁺/NADH inférieur chez les dénutris.¹¹⁸

Au cours de la phase ischémique, le milieu intracellulaire s'acidifie sous l'effet de la glycolyse anaérobie avec l'accumulation de lactate mais aussi par l'accumulation d'ions H⁺ secondaire à l'hydrolyse de l'ATP consommé.

A la fin de la phase d'ischémie froide, la reperfusion est associée à des phénomènes néfastes pour le greffon. D'une part, un œdème cellulaire s'installe du fait d'un dysfonctionnement des pompes Na^+/K^+ ATPase secondaire au déficit en ATP. Pendant longtemps, cet œdème cellulaire a conduit à utiliser des produits de conservation de type extra-cellulaire, riche en potassium et pauvre en sodium. L'introduction de macromolécules, augmentant l'osmolarité extra-cellulaire, a conduit à l'inversion de la composition des produits de conservation. En effet, les produits de conservation aujourd'hui utilisés sont dits de 3^{ème} génération et contiennent du polyéthylène glycol (PEG) et des doses faibles de potassium (table). Leur impact sur les suites de la greffe est à nouveau largement discutés de nos jours puisque des publications récentes ont montré l'intérêt des produits utilisant des macromolécules avec une amélioration de la survie que certains rapportent à une réduction des complications vasculaires et biliaires (Savier et al ; Com affichée, SFT, 2016).

Le TIF correspond au temps séparant le clampage aortique chez le donneur du déclampage porte chez le receveur. Il s'agit d'un facteur prédictif constant des résultats de la greffe hépatique.¹¹⁹ Contrairement à la greffe de rein où les temps d'ischémie peuvent aller jusqu'à 24h, sans conséquence, il est largement rapporté qu'un TIF > 12h est un facteur de risque de dysfonction du greffon. Ce temps doit au mieux être inférieur à 8h, délai au-delà duquel des conséquences apparaissent sur les résultats de la greffe. Ce facteur est crucial mais ne peut être pris en compte au moment de l'acceptation d'un greffon.

L'exposition du greffon au contenu du sang portal du receveur est également déterminante pour l'issue de la greffe. Non seulement la tolérance de l'intestin grêle à la phase d'anhépatie pourrait jouer un rôle majeur dans les lésions d'ischémie-reperfusion, l'état du receveur est également primordial dans la reprise de fonction. En effet, même si le score MELD n'est pas directement corrélé aux résultats de la transplantation hépatique, le statut du receveur est un paramètre déterminant.

De nombreuses études ont mis en évidence des facteurs propres au receveur qui impactent de façon significative sur l'issue de la greffe. Parmi les marqueurs les plus souvent mentionnés dans la littérature sont retrouvés : l'âge du receveur, l'indication de la greffe, les défaillances d'organes associés, la retransplantation, la sarcopénie.

L'âge du receveur augmente linéairement le risque de décès après transplantation et est un facteur indépendant de mortalité précoce dans nombre d'étude quelques soit l'indication de la greffe. Il semble que les comorbidités liées à l'âge soient un paramètre encore plus important. Dans une étude sur les facteurs prédictifs de futilité de la greffe, l'indice de Charlton ressortait comme un facteur très déterminant.

Les défaillances associées n'ont pas fait l'objet d'un grand nombre de publications probablement parce que la population de patients multidéfaillants greffés du foie n'est apparue que récemment. Avec l'apparition d'une définition de l'Acute-on-Chronic liver failure (ACLF), sont apparus des scores prédictifs de survie chez le patient cirrhotique en décompensation qui prennent en compte les défaillances d'organes extra-hépatiques. Les scores SOFA ou CLIF-SOFA commencent à montrer leur intérêt dans la prédiction des résultats après transplantation. Ainsi des données récentes tendraient à contre-indiquer pour la greffe un patient ayant un CLIF-SOFA > 70. En effet, il est important de souligner que les défaillances extra-hépatiques vont impacter la reprise de fonction d'un greffon, même du meilleur greffon qui soit. Un débat existe quant au matching optimal. Alors que la plupart des équipes réservent empiriquement de « bons » greffons aux receveurs très graves, certains ont démontré que l'impact de greffons limites était majeur pour les receveurs en bon état alors que les résultats chez le receveur limite étaient inférieurs et peu dépendants des caractéristiques du donneur.

Un des paramètres récemment identifiés comme significatif pour l'issue de la greffe est l'état nutritionnel du patient. La dénutrition est fréquente chez le patient cirrhotique ce d'autant qu'il existe une hypertension portale avec une ascite. Le métabolisme du patient cirrhotique est significativement modifié comme vu dans l'introduction. La cirrhose avancée est associée à un état de catabolisme systémique important. L'absence d'activité physique souvent rencontrée chez les patients cirrhotiques en attente de greffe accentue la perte musculaire. La sarcopénie est un critère objectif de dénutrition dont il a été démontré dans plusieurs études récentes l'impact significatif sur les résultats de la transplantation hépatique. Elle est aisément appréciée sur un scanner par la mesure de la surface des psoas au niveau de L3.

Le matching donneur-receveur semble une voie à explorer pour améliorer les résultats de la greffe hépatique. Il n'existe que quelques scores facilement utilisables combinant les données du donneur et du receveur. Le BAR score a été établi dans ce sens et associe l'âge du receveur, le score MELD, la retransplantation, la nécessité de soutien des fonctions extra-hépatiques, le TIF et l'âge du donneur. Une version récente validée sur la base de données américaine montrait que l'ajout du degré de stéatose macrovésiculaire augmentait le caractère prédictif du score.

Le tableau 6 rappelle l'ensemble des paramètres du donneur qui sont considérés comme prédictifs de la survenue d'une dysfonction du greffon ou de la survie du greffon associé aux paramètres du receveur présent dans les algorithmes de matching.

Tableau 6: facteurs liés au donneur ou au receveur prédictifs de dysfonction ou de perte de greffon identifiés dans la littérature par au moins 2 études

Paramètres du donneur	Paramètres dits techniques « modifiables »	Paramètres du receveur
Age	Temps d'ischémie froide (TIF)	Age
Stéatose (macrovésiculaire)	Décompression portale	Re transplantation
Antécédents d'hypertension artérielle	Transfusions en produits sanguins labiles	MELD
Insuffisance rénale		Nécessité de soutien des organes extra hépatiques
γ GT		Hospitalisation pré-greffe
Bilirubine		
Transaminases		

Données métabolomiques de la littérature

Une analyse métabolomique urinaire par GC-MS montrait une augmentation précoce du lactate et plus tardive du pyruvate dans un modèle d'ischémie-reperfusion hépatique.¹²⁰

L'utilisation de la HR-MAS- a déjà été rapportée dans 2 articles. Le 1^{er} évaluait l'évolution des profils métaboliques au cours de la conservation de 6 greffons hépatiques et montrait une diminution de la GPC excepté dans le seul greffon ayant présenté une dysfonction.¹²¹

Une analyse métabolomique par UPLC-MS sur une large série validait le principe que le profil métabolique de greffon permettait de prédire la survenue d'une dysfonction de greffon définie selon Olthoff. L'analyse des métabolites discriminants se concentrait sur les lipides et retrouvait une augmentation de la phosphocholine et de la phosphoéthanolamine ainsi qu'une augmentation des acides biliaires. Le métabolisme de l'histidine était également perturbé avec notamment une augmentation du glutamate par augmentation de la dégradation de l'histidine par l'histidase. Cette large étude validait donc le concept de l'analyse métabolomique en utilisant une technique complexe mais sensible de chromatographie.¹²²

L'analyse métabolomique ciblée effectuée sur des biopsies de greffons en ischémie froide et après reperfusion retrouvait un rôle pour l'IQGAP1 dans le maintien du cytosquelette des canalicules biliaires. Cette étude retrouvait des modifications significatives des protéines intervenant dans le métabolisme des acides aminés et des acides puriques – sans plus de précision - témoignant de ces besoins métaboliques pour les remaniements cellulaires liés à l'ischémie-reperfusion.¹²³

Pratiques actuelles et futures de conservation

Sur les greffons perfusés sur machine, la clairance des lactates est observée et pourrait être associée à une déplétion marquée en glycogène et une stéatose macrovacuolaire importante.¹²⁴

L'effet bénéfique de la conservation hypothermique oxygénée est due, d'une part, à la réduction des besoins énergétiques liée à l'hypothermie, d'autre part – et surtout – à l'oxygénation qui empêche la formation de ROS d'origine mitochondriale. En effet, il est suspecté que la production de ROS par la mitochondrie va entraîner via la formation de DAMPs une cascade qui conduit à l'activation endothéliale et des cellules immunitaires. La prévention de la formation de ROS par la mitochondrie constitue donc pour certains un objectif majeur de la conservation des organes.¹²⁵

LC-MS et GC-MS ont également été utilisés pour évaluer l'impact de la perfusion normothermique sur les greffons hépatiques. La perfusion tendrait à diminuer le taux de glucose-6-phosphate et de fructose-6-phosphate ainsi qu'une augmentation du lactate qui passe ensuite dans l'effluent. On notait également une augmentation des intermédiaires du cycle tricarboxylique (citrate et α -cétoglutarate) signant une reprise de la fonction du TCA.¹²⁶

Le but de cette 2nde partie est donc d'évaluer l'intérêt de la métabolomique par HR-MAS-NMR pour l'évaluation de la tolérance du patient cirrhotique à l'intervention, pour l'évaluation de la qualité du greffon ainsi que pour le « matching » receveur-donneur.

Intérêt de la métabolomique pour l'évaluation du greffon hépatique

Introduction

Comme nous l'avons vu plus haut, la qualité du greffon est un paramètre majeur de la réussite de la transplantation hépatique. Cette évaluation est complexe et fait appel aux données clinico-biologiques du donneur. Les principales caractéristiques reconnues comme étant prédictives sont l'âge du donneur et le degré de stéatose. Cependant ces paramètres sont loin d'être optimaux car l'utilisation de greffons très âgés semblent n'impacter que marginalement les résultats et l'utilisation de greffons très stéatosiques (> 60%) n'est pas associée à une perte de greffon systématique. Aussi, la communauté de la transplantation en est venue à conclure que seule l'association de caractéristiques du donneur ou le matching avec le receveur pouvait prédire de façon adéquate l'issue de la greffe.

Nous posons l'hypothèse que le profil métabolique, dans le sens où il prend en compte un ensemble complexe de paramètres, pourrait identifier des greffons à risque de dysfonction indépendamment du statut du receveur. L'identification de biomarqueurs au moment de la préparation ex vivo permettrait d'identifier les greffons à risque. Dans un proche futur, ceci pourrait servir de critère de mise sur machine à perfusion hépatique. L'applicabilité clinique de la technique de HR-MAS-NMR provient du caractère quasiment extemporané de l'analyse permettant d'adapter la prise en charge.

Matériel et méthode

Parmi les patients greffés de Janvier 2014 à Décembre 2016, les greffons pour lesquels étaient disponible une biopsie mis en azote moins de 3 minutes après leur prélèvement étaient incluses. Les biopsies étaient réalisées dans le cadre de biopsies systématiques, quel que soit la présence ou non de critère de donneur dit « limites ». Elles étaient réalisées après le transport et au moins 30 minutes avant la fin de l'ex-vivo afin de se mettre dans des conditions cliniquement applicables. Par ailleurs, afin de limiter les paramètres pouvant impacter la survenue d'une EAD, étaient exclus les retransplantation, les transplantations associées ainsi que les patients ayant présentés une complication vasculaire précoce.

Une série de 42 biopsies chirurgicales de greffons prélevés au moment de la préparation ex-vivo ont été analysés par résonance magnétique à haute résolution à rotation d'angle magique (HR-MAS-NMR). Les caractéristiques des donneurs sont résumées dans le tableau 7.

Une série de 34 biopsies de reperfusion étaient également analysés par HR-MAS-NMR.

Tableau 7 : caractéristiques des receveurs et des donneurs inclus dans l'étude

	N=42
<i>Caractéristiques du receveur</i>	
Age	53 ±12
Sexe masculin	30 (71%)
Indication de transplantation	
Alcool	23 (64%)
VHC	4 (11%)
VHB	2 (5%)
Métabolique	3 (8%)
Hépatite fulminante	1 (3%)
Autre	6 (%)
Carcinome Hépatocellulaire	10 (29%)
MELD à l'inscription	26.8 ±13
MELD à la transplantation	26.9 ±14
Bilirubine à la transplantation (µmol/L)	191 ±37
Créatinine à la transplantation (µmol/L)	79 ±38
INR à la transplantation	3.04 ±2
Sarcopénie	14 (33%)
ACLF	(%)
<i>Caractéristiques du donneur</i>	
Age	57.7 ±18
IMC	26.4 ±6
Diabète	7 (17%)
Statine	9 (21%)
Syndrome métabolique	12 (29%)
ASAT / ALAT (UI)	74 ±14 / 72 ±20
Bilirubine (µmol/L)	14 ±11
γGT (UI)	59 ±9
Lactates au prélèvement (mmol/L)	1.8 ±1.3
Stéatose du greffon	
Stéatose totale >30%	2 (6%)
Stéatose macrovacuolaire >30%	2 (6%)
Donneur à critère élargi (d'après EASL)	29 (69%)
<i>Données opératoires</i>	
Temps d'ischémie froide	453 ±91
Syndrome de reperfusion	20 (48%)
Transfusion en globules rouges (unités)	7 ±1
Transfusion en PFC (unités)	9.5 ±2
Transfusion plaquettaire (unités)	1.3 ±2

Le critère principal de jugement était la survenue d'une dysfonction précoce du greffon définie par une non fonction primaire (décès ou nécessité de regreffe du fait d'une absence de reprise fonctionnelle dans la 1^{ère} semaine) ou une « early allograft dysfunction » (EAD) définie selon les

critères de la littérature par la présence d'un taux de bilirubine $> 170\mu\text{mol/L}$ à J7 ou un INR $> 1,7$ à J7 ou un taux d'ASAT ou d'ALAT > 2000 dans la 1^{ère} semaine.

L'analyse métabolomique et les analyses statistiques étaient réalisées suivant les modalités décrites dans le chapitre Matériel et Méthode plus haut.

Une analyse anatomopathologique était réalisée après l'analyse métabolomique sur le même échantillon. Le degré de stéatose macro- et microvacuolaire était réalisée et la présence d'un infiltrat inflammatoire ou d'une fibrose était également rapportées.

Résultats

Le taux de dysfonction de greffon était de 17% (n=7) avec une non fonction primaire de greffon. Le taux de dysfonction était de 21% chez les patients ayant reçu un foie de donneur à critères élargis. L'analyse métabolomique permettait de distinguer de façon significative les greffons présentant une EAD versus ceux ne présentant pas de dysfonction ($Q^2=0,57$, $R^2\gamma=0,697$). (Figure 20)

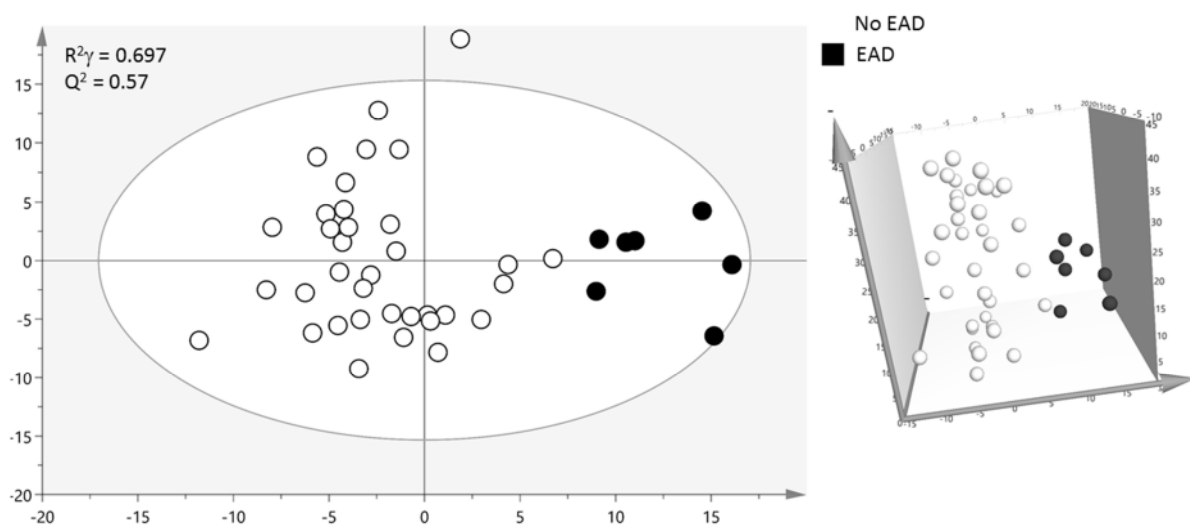


Figure 20 : analyse PCA des profils métaboliques de greffons hépatiques selon la survenue ou non d'une dysfonction précoce (EAD)

Il n'y avait pas de différence significative de profil métabolique selon le temps d'ischémie froide $>$ ou $<$ 6h ou la présence de critères élargis. (Figure 20)

A l'inverse, le profil métabolique à la reperfusion ne prédisait pas la survenue d'une EAD témoignant du rôle intrinsèque de la qualité du greffon et de sa tolérance à l'ischémie.

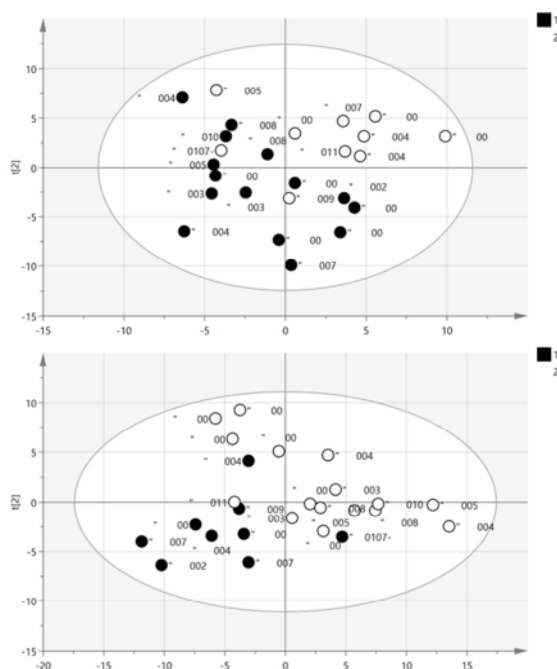


Figure 21 : PLS-DA comparant les profils métaboliques selon le temps d'ischémie froide (> ou < 8h) (panneau du haut) ainsi que pour l'utilisation de donneurs à critères élargis définis selon l'EASL (panneau du bas)

Métabolites discriminants et quantification des métabolites

L'analyse des métabolites discriminants a été effectuée sur l'ensemble de la population. Les greffons présentant une EAD se distinguaient des greffons sans EAD par une présence accrue de lactate, glutamate, alanine, glutathion, ornithine, éthanolamine, ascorbate et choline. Les greffons sans EAD semblaient plus riches en glutamine, créatine et phosphocréatine et phosphocholine.

Tableau 8 : quantification des métabolites selon la survenue ou non d'une EAD (exprimée en nmol/mg)

	No EAD	EAD	
Alanine	1.512 ±0.2	2.595 ±1.5	0.175
Valine	0.21 ±0.04	0.528 ±0.4	0.111
Isoleucine	0.145 ±0.03	0.325 ±0.2	0.139
Glutamate	1.795 ±1	2.713 ±2	0.078
Glutamine	0.76 ±0.4	1.087 ±0.7	0.115
GABA	0.485 ±0.1	1.059 ±0.5	0.069
Glucose	6.697 ±3	7.191 ±5	0.762
Lactate	6.122 ±3	13.445 ±7	<0.0001
Lactate > 8.4mmol/g	7 (%)	6 (%)	0.0006
Glycérol	4.699 ±3	6.615 ±7	0.27
Ascorbate	0.175 ±0.02	0.195 ±0.04	0.702
GSH	0.41 ±0.07	0.346 ±0.2	0.725
Créatine	0.5 ±0.05	0.7 ±0.1	0.111
Choline	1.062 ±0.1	1.568 ±0.6	0.17
Phosphocholine	0.471 ±0.2	0.741 ±0.2	0.006
Phosphocholine >0.65 mmol/g	7 (%)	6 (%)	0.00006*

Glycerophosphocholine	1.18 ±0.1	1.564 ±0.5	0.15
Taurine	3.48 ±1	5.031 ±1	0.011
Ethanolamine	0.371 ±0.06	0.633 ±0.19	0.108

L'analyse de réseau retrouvait une quantité accrue de lactate, d'acides aminés glucoformateurs et de phosphocholine. Il n'était pas mis en évidence de diminution de glutathion ou d'ascorbate. (Figure 22)

La quantification et la comparaison des métabolites selon la survenue d'une EAD sont rapportées dans le tableau. Les greffons présentant une EAD présentaient un taux significativement plus élevé de lactates (13,445 versus 6,122 ; $p < 0,0001$) et de phosphocholine (0,741 vs 0,471 ; $p = 0,006$). Il existait une tendance à un taux plus élevé de GABA ($p = 0,069$) et de glutamate ($p = 0,078$). (Tableau 8)

La courbe ROC permettait de déterminer une concentration seuil de lactate à 8,3mmol/g permettant de prédire une EAD avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 80% (AUROC=0,906). L'AUROC pour la phosphocholine était de 0,856 correspondant à une bonne prédictibilité avec un seuil de 0,65mmol/g (sensibilité 86% et spécificité 80%). (Figure 23)

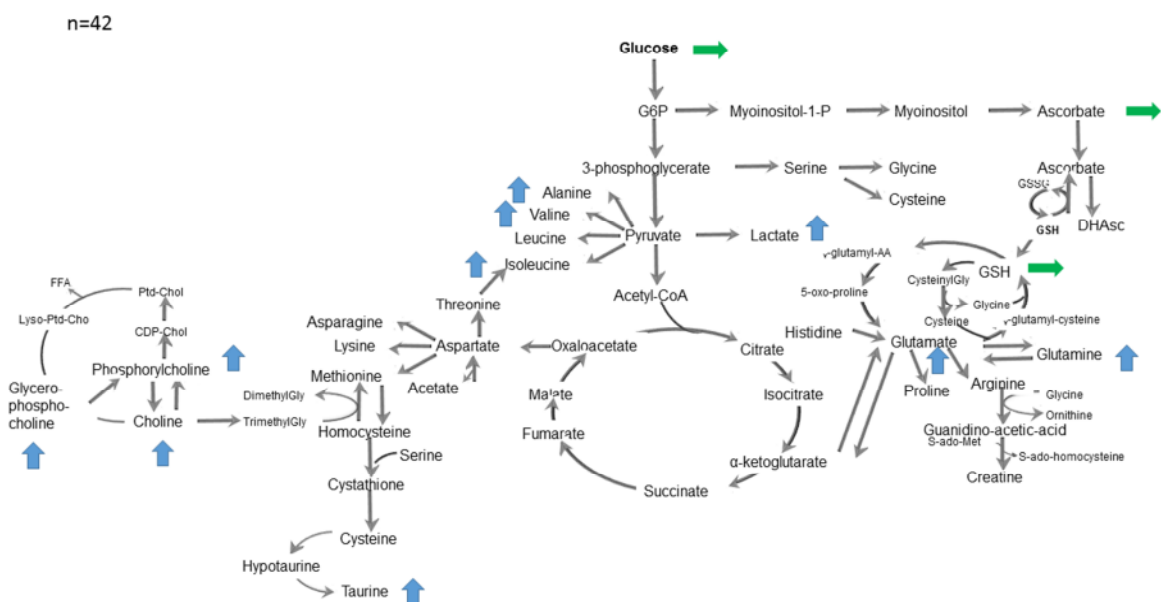


Figure 22 ; analyse de réseau identifiant les métabolites discriminants dans les biopsies de greffon lors de la préparation ex vivo en cas de survenu d'une EAD

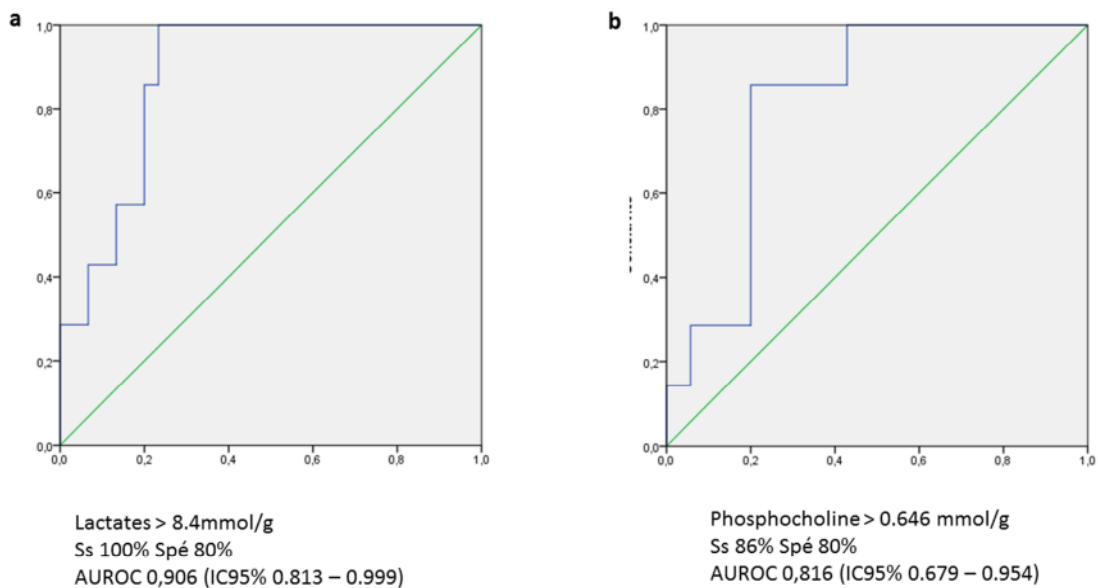


Figure 23 : courbes ROC pour la valeur prédictive pour l'EAD du contenu en lactate (à gauche) et en phosphocholine (à droite) des greffons lors de la préparation ex vivo

Définition donneurs à critères métaboliques élargis (DCME)

Les greffons présentant à la fois des lactates > 8,3 et une phosphocholine > 0,65 étaient définis comme DCME. Il présentait un risque de 63% de faire une EAD ce qui était significativement supérieur au risque des autres greffons. Le taux d'interleukine 6 à la reperfusion, cytokine de l'inflammation qui est prédictive des suites de greffe, était significativement plus élevé dans ce groupe ($p=0,045$). Or le taux d'interleukine 6 était associé à la survenue d'une EAD ainsi qu'à la survenue de décompensation d'organes extra-hépatiques qui ont un impact sur la survie du patient. De même, une réponse inflammatoire à la reperfusion importante, définie par un taux d'IL6 > 1000, était également prédictive de complications artérielles du greffon. Par ailleurs, les patients recevant un DCME avait un risque significativement plus important de perte de greffon à 1 an par rapport aux autres. (Figure 24)

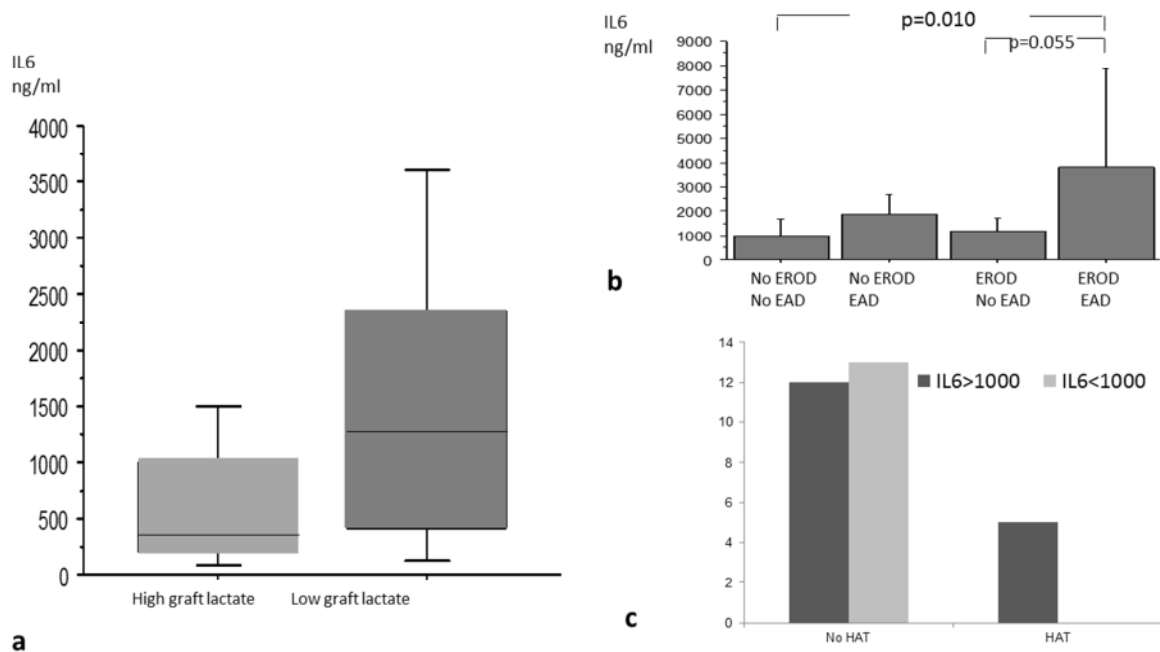


Figure 24 : (a) association entre le taux d'interleukine 6 au déclantage et la quantité de lactate intra-hépatique mesurée lors de la préparation ex vivo. (b) association du taux d'interleukine 6 et des complications extra-hépatiques et de l'EAD dans une population de 289 patients transplantés entre 2009 et 2013 (c) association entre le taux d'interleukine 6 et la survenue de thrombose de l'artère hépatique post-greffe.

Facteurs prédictifs du profil métabolique

Le temps d'ischémie froide n'était pas significativement associé au profil métabolique. Un seuil de 6 et 8h était testé sans montrer de différence. Il n'existait pas de différence de profil métabolique selon l'âge avec différents seuils. Toutefois les petits foies de femmes âgées présentaient un profil spécifique qui n'était pas associé à un risque accru d'EAD.

Facteurs prédictifs et conséquence de la dysfonction précoce de greffon (Tableau 9)

Parmi les facteurs du donneur, seule une stéatose macrovésiculaire >30% était associée à une dysfonction de greffon. Parmi les données du receveur, il était retrouvé les facteurs de risque classique d'EAD que sont le score MELD à l'inscription ($p=0,003$), associé à l'indication pour CHC et pour ACLF, et la stéatose > 30% ($p=0,002$). La sarcopénie était également un facteur pronostique déterminant ($p=0,019$). Toutefois en analyse multivariée, seul le taux de lactate du greffon lors de la préparation était prédictif de l'EAD.

Tableau 9 : Facteur prédictifs de dysfonction précoce de greffon identifiés par analyse univariée

	No EAD N=35	EAD N=7	p univariate
<i>Caractéristiques du receveur</i>			
Age	53 ±12	53 ±15	0.885
Sexe masculin	25 (71%)	5 (71%)	>0.999
Indication de la transplantation			
Alcool	23 (66%)	3 (43%)	0.256
VHC	5 (14%)	0 (0%)	0.287
Métabolique	3 (9%)	1 (14%)	0.638
Carcinome hépatocellulaire	12 (34%)	0 (0%)	0.067
Lab-MELD à l'inscription	24.7 ±12	37.3 ±7	0.013
Lab-MELD à la TH (uncapped)	24.3 ±13	40.7 ±11	0.003*
Bilirubine à la TH(μmol/L)	162 ±32	337 ±103	0.041
Créatinine à la TH(μmol/L)	83 ±50	81 ±37	0.905
INR à la TH	2.61 ±1	4.37 ±2	0.011
Sarcopénie	9 (26%)	5 (71%)	0.019*
<i>Caractéristiques du donneur</i>			
Age	59 ±17	53 ±20	0.421
IMC (kg/m ²)	26.7 ±6	24.8 ±6	0.468
Diabète	7 (20%)	0 (0%)	0.195
Statine	8 (23%)	1 (14%)	0.614
Syndrome métabolique	11 (31%)	1 (14%)	0.359
γGT (UI)	55 ±9	82 ±32	0.274
Lactates au PMO (mmol/L)	1.78 ±1	1.93 ±1	0.786
Stéatose du greffon			
Stéatose globale >30%	0 (0%)	2 (28%)	0.002*
Stéatose macrovésiculaire (%)	5.7 ±2	11.4 ±5	0.137
Donneur à critère élargi (d'après EASL)	23 (%)	6 (%)	0.296
<i>Données opératoires</i>			
TIF	453±90	450 ±104	0.926
Syndrome de reperfusion	16 (46%)	4 (57%)	0.581
Transfusion de globules rouges (unités)	5 ±4	15 ±13	0.002
Transfusion de plasma frais (unités)	7 ±5	20 ±8	0.006
Transfusion plaquettaire (unités)	1.6 ±1	1.3 ±1	0.817

* paramètres significativement associées à l'EAD en analyse multivariée

Profil métabolique des patients sarcopéniques et matching métabolique

Les foies natifs des patients présentant une sarcopénie avaient un profil métabolique significativement différent de celui des patients non sarcopéniques ($Q^2=0,528$; $R^2\gamma=0,783$). L'analyse de réseau mettait notamment en évidence un taux plus bas de lactate et de glycérophosphocholine mais un taux plus élevé de choline, d'acides aminés néoglucogéniques et d'éthanolamine. La

quantification permettait d'identifier un taux de glycérophosphocholine <0,556mmol/g comme significativement associée à la sarcopénie (AUROC 0,812).

Etant donné l'opposition apparente de métabolisme des patients cirrhotiques sarcopéniques avec le profil métabolique des greffons à risque, notamment en termes de concentration hépatique en lactates, nous avons posé l'hypothèse que l'attribution d'un greffon à risque métabolique à un patient sarcopénique était très à risque d'échec de la greffe.

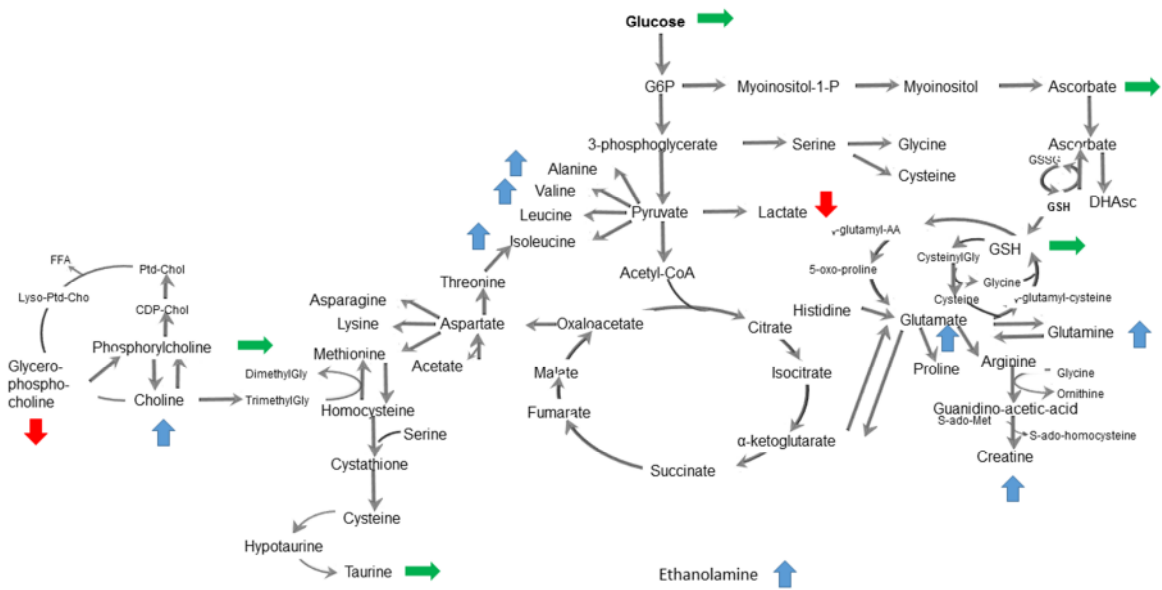


Figure 25 : analyse de réseau ADEMA identifiant les métabolites discriminants les patients sarcopéniques et non sarcopéniques

L'utilisation de greffons à risque métabolique chez un patient sarcopénique était associée à un risque d'EAD de 100% alors qu'aucune EAD n'était mis en évidence chez les patients non sarcopéniques recevant un greffon limite, indépendamment du MELD.

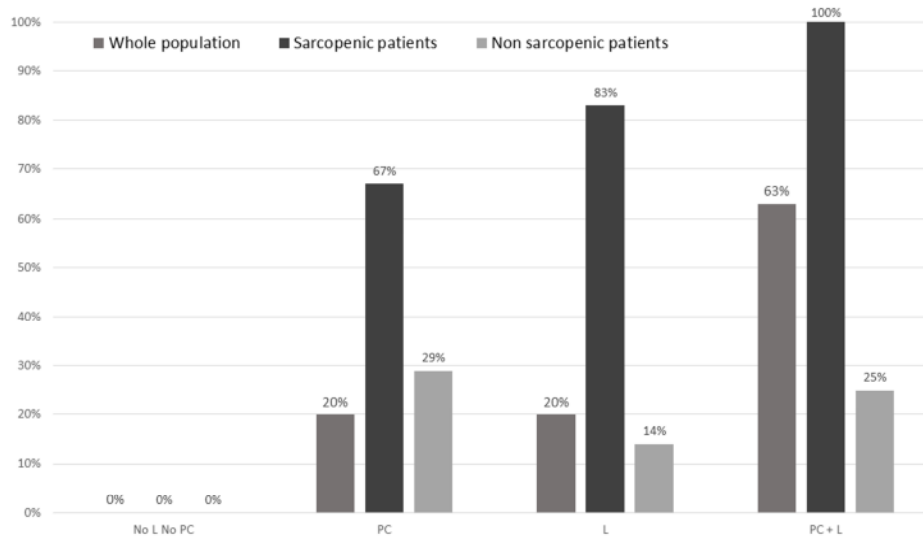


Figure 26 : risque d'EAD selon le risque métabolique du donneur évalué par le taux de lactate et de phosphocholine dans la population globale et selon la présence d'une sarcopénie chez le receveur

Soulignant l'impact de l'adaptation métabolique pour le métabolisme de la choline, il était intéressant de retrouver un taux élevé d'EAD chez les patients sarcopéniques (chez qui le taux de phosphocholine et d'éthanolamine est élevé) recevant un foie pauvre en phosphocholine.

Discussion

Dans cette étude, le profil métabolomique par HR-MAS-NMR prédit la survenue d'une dysfonction du greffon de façon indépendante du receveur. L'identification du lactate et de la phosphocholine comme puissants biomarqueurs de la qualité et de la tolérance du greffon permettent d'envisager une utilisation pratique de cette technique pour l'utilisation des greffons arbitrairement jugés limites.

La survenue d'une dysfonction de greffon est un facteur reconnu de résultats à long terme de la transplantation. Son incidence varie de 20 à 35% dans la littérature et constitue un des principaux critères utilisés pour définir les greffons à critères élargis (ECD pour extended criteria donor). Les paramètres utilisés pour les définir sont variables selon les études et les sociétés savantes. Cette variabilité a conduit à considérer que les caractéristiques du donneur seules ne suffisaient pas à accepter ou non un greffon pour un receveur donné. Cette étude montre toutefois qu'il existe des caractéristiques intrinsèques objectives du greffon qui peuvent, à elle seules, prédire les suites immédiates et à distance de la greffe.

Cette évaluation du greffon est permise par le caractère intégratif de la méthode. Le point majeur de cette technique est son applicabilité clinique certaine. En effet, contrairement aux techniques de

spectroscopie qui nécessitent de lourdes et longues mises en œuvre, un profil métabolique peut être obtenu en 30 minutes et une quantification des métabolites nécessitent quelques minutes supplémentaires. L'introduction du profil métabolique dans un modèle prédictif déjà construit, peut permettre une interprétation du profil métabolique dans son ensemble ou en ne prenant en compte que des métabolites cibles identifiés comme particulièrement associés au risque d'EAD.

Les marqueurs prédictifs identifiés sont le lactate et la phosphocholine. Le lactate est souvent utilisé en pratique clinique car il est associé à nombres de situations cliniques critiques. Pour la plupart, il représente un marqueur de souffrance ischémique puisqu'il provient de la glycolyse anaérobie. Le greffon hépatique en ischémie utilise le glycogène puis le glucose pour former de l'ATP selon cette voie métabolique peu efficace. L'analyse de réseau montrait une augmentation des acides aminés glucoformateurs pouvant correspondre à une augmentation de la dégradation protéique permettant la néoglucogénèse. Dans le même temps, l'élévation de la phosphocholine pourrait provenir du stress du réticulum endoplasmique due à l'ischémie. Elle s'associe souvent à une élévation de la choline et une diminution de la glycérophosphocholine qui ne sont pas observés dans notre étude. Elle est certainement un marqueur de dégradation des membranes cellulaires favorisée et/ou favorisant les lésions d'ischémie-reperfusion.

Le lactate intra-hépatique semble un marqueur extrêmement puissant de prédiction de la dysfonction du greffon. Avec une aire sous la courbe de 0,906, elle représente l'un des plus puissants facteurs prédictifs de dysfonction identifiés dans la littérature. Couplé à la phosphocholine, le taux de lactate intra-greffon prédit l'issue à court et à long terme et pourrait donc être utilisé pour décider de la nécessité d'une « réanimation » du greffon. En effet, le développement des machines à perfusion pour le foie permet d'envisager l'utilisation de greffons refusés par tous les transplantateurs jusqu'à maintenant. L'expérience de Zurich avec les greffons stéatosiques et des équipes anglaises avec les greffons de donneurs en arrêt circulatoire en sont des exemples. La métabolomique et les biomarqueurs identifiés pourraient permettre de guider la mise sur machine et surtout de suivre l'état de la réanimation de ces greffons avant de les implanter ou non.

Le 2^{ème} point d'intérêt de notre étude est d'identifier des circonstances cliniques du receveur qui permettent d'affiner le caractère prédictif de la définition du donneur à critères métaboliques élargis. En effet, il est largement rapporté l'importance du matching donneur-receveur sur les résultats. Des algorithmes ont été créés tel que le donor risk index (DRI) aux Etats-Unis ou le BAR score en Europe. L'analyse métabolomique a permis d'identifier des caractéristiques cliniques associées à des profils métaboliques différents de ceux du greffon à critères élargis conduisant au concept de coût de l'adaptation métabolique.

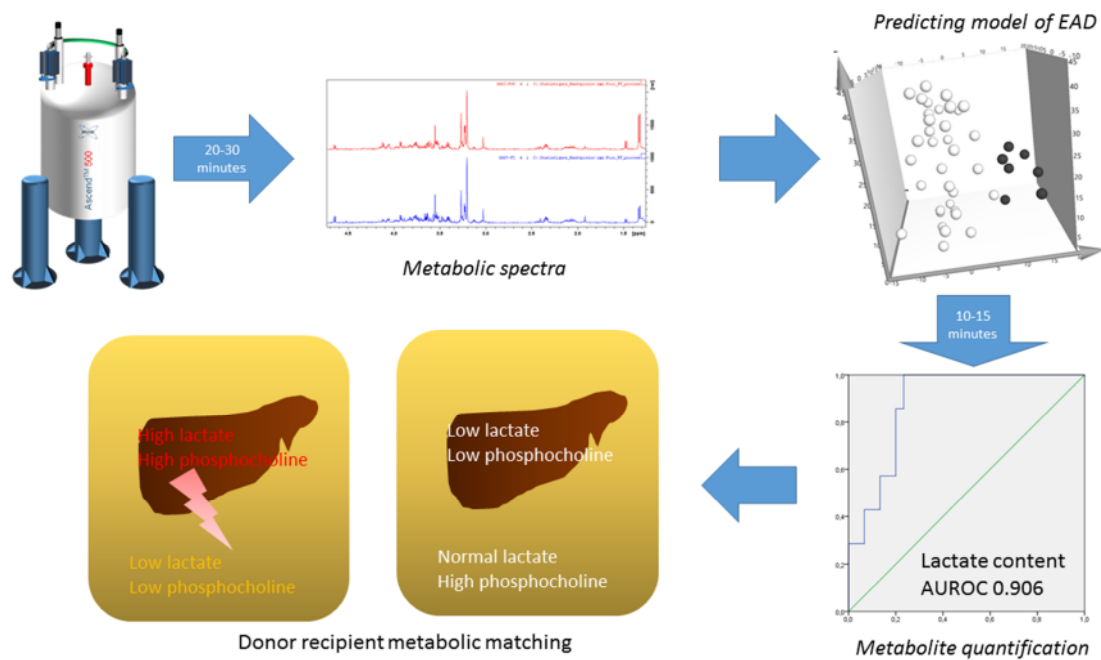


Figure 27 : résumé de la démarche permettant un matching métabolomique en transplantation hépatique

Ainsi l'implantation d'un greffon riche en lactate chez un receveur dont le métabolisme était associé à un taux pauvre en lactate hépatique conduit à la nécessité pour ce greffon d'adapter son métabolisme ce qui peut favoriser la dysfonction. Ici nous mettons en évidence l'altération significative du métabolisme chez le patient sarcopénique. Chez ces patients, le switch métabolique qui survient au cours de l'aggravation de la cirrhose pourrait conduire à une utilisation accrue des lactates qui au lieu d'être éliminé est utilisé comme source de la néoglucogénèse. Ces lactates proviennent du catabolisme musculaire et entrent dans le cycle de Cori. Même chez les patients MELD bas, les cirrhotiques sarcopéniques présentent un taux de lactates hépatiques et de glycérophosphocholine bas.

Nous mettons en évidence que l'adaptation métabolique, c'est-à-dire la différence de profil métabolique pour certaines voies métaboliques significatives, a un coût qui se traduit par la survenue d'une dysfonction du greffon plus fréquente.

D'autres caractéristiques cliniques pourraient être associées à des altérations métaboliques qui pourraient également conduire à une adaptation métabolique significative. Il en est ainsi de l'hypertension portale, qui jugée sur des critères cliniques, biologiques et morphologiques est également associée à un profil comparable à celui de la dénutrition.

La métabolomique par HR-MAS-NMR est donc un outil efficace et puissant pour l'évaluation des greffons hépatiques. Son intérêt dans la décision reste encore hypothétique du fait du court délai entre la réalisation d'une biopsie sur la table de préparation et l'implantation mais d'autres applications pourraient rapidement voir le jour. Ainsi il est tout à fait envisageable d'utiliser cette méthode pour évaluer les greffons perfusés sur machine. Elle présente plusieurs utilisations potentielles dans cette circonstance. D'une part, elle pourrait être utilisée comme critère de mise sur machine à perfusion. L'identification de taux élevé de lactate ou de phosphocholine serait alors une bonne application pratique. D'autre part, cette technique pourrait être utilisée pour évaluer la capacité des machines à perfusion à « réanimer » les greffons jugés à risque. Des études ultérieures devraient être menées dans ce sens car les critères actuels pour juger de la transplantabilité de ces greffons marginaux restent incertains.

La métabolomique HR-MAS-NMR nous a donc permis d'identifier le lactate comme un excellent biomarqueur. Compte tenu de son impact majeur, il nous a semblé intéressant d'évaluer le caractère prédictif du lactate chez le donneur et le receveur.

Lactates au cours de la transplantation : du donneur au receveur

Comme nous l'avons démontré plus haut, le lactate est un paramètre déterminant des suites de la transplantation notamment les lactates contenus dans le greffon. En situation clinique courante, le lactate est mesuré en réanimation car il est considéré comme un marqueur de dysfonction microcirculatoire. . Au niveau d'un organisme, l'interprétation des lactates est plus complexe du fait de la circulation du métabolite et de la capacité des organes à utiliser celui-ci pour fonctionner. Son effet acidifiant est certainement délétère mais il peut être également vu comme un carburant pour le fonctionnement cellulaire. En effet, le lactate est maintenant connu pour être une source d'énergie pour le cerveau. Il semblerait protéger le patient en insuffisance hépatocellulaire contre l'encéphalopathie.

Le niveau de lactate au décours de la transplantation est un biomarqueur potentiel de la fonction du greffon. Mais l'origine des lactates produits au cours de la transplantation hépatique fait l'objet de bien des hypothèses.

D'une part, l'état du receveur détermine le niveau de lactate à 2 niveaux. D'abord, la gravité de la cirrhose est un facteur déterminant du taux de lactates systémiques. Plus le score de Child-Pugh, plus le score de MELD sont élevés, plus le niveau de lactate est élevé. Une étude récente a démontré que le patient cirrhotique présente un shift métabolique au cours de l'évolution de sa cirrhose passant d'un métabolisme par phosphorylation oxydative à une glycolyse anaérobie puis à une incapacité à produire et utiliser le glucose entraînant l'insuffisance hépatocellulaire terminale. D'autre part, l'état aigu du patient en attente de greffe va également impacter le niveau des lactates. Les patients en décompensation aigu présente des taux de lactates plus élevé que les patients compensés. Chez les patients en décompensation aigu sur cirrhose (ACLF), le niveau des lactates est proportionnel au degré de l'ACLF mesuré par le score CLIF-SOFA.

La production de lactates par le greffon est variable comme nous l'avons démontré dans la 1^{ère} partie de cette thèse. En effet, la capacité d'un greffon à tolérer l'ischémie froide varie. Nous ne reviendrons pas sur ce point qui a déjà été discuté plus haut.

Enfin, lors de la phase d'anhépatie, le tube digestif peut souffrir du fait d'une congestion veineuse. Le degré de congestion veineuse varie selon la présence de shunts porto-systémiques spontanés et selon la réalisation ou non d'une dérivation porto-cave chirurgicale. Cette souffrance intestinale pourrait s'accompagner d'une production accru de lactate.

Méthode

Population

Dans une 1ère partie, une analyse rétrospective des patients transplantés de 2009 à 2014 pour lesquels un dosage de lactate artériel dans les 30 minutes suivant la reperfusion était conduit pour évaluer le caractère prédictif de ce biomarqueur sur la reprise de fonction du greffon.

Dans une 2ème partie, une série de patients transplantés entre 2014 et 2015 (n=75) étaient inclus s'ils bénéficiaient d'une mesure étagée du lactate par une méthode capillaire. Les patients ayant préalablement donné leur consentement bénéficiaient également d'une biopsie pour quantification ciblée du lactate par HR-MAS-NMR.

Transplantation hépatique

Les Patients étaient inscrits sur la liste nationale d'attente après une évaluation multidisciplinaire. Le bilan pré-greffe était standard comprenant notamment un scanner thoraco-abdomino-pelvien avec injection et une fibroscopie oeso-gastro-duodénale permettant d'apprécier le degré d'hypertension portale. Les principales indications étaient représentées par la cirrhose alcoolique puis la cirrhose post-virale C. Les patients inscrits pour CHC entraient dans les critères du score AFP. Un traitement d'attente était réalisé lorsque la fonction hépatique le permettait comme il est communément accepté.

Les donneurs étaient tous des donneurs en mort encéphalique dont la répartition était faite selon l'algorithme de l'Agence de la Biomédecine. Les caractéristiques démographiques, cliniques et biologiques du donneur était prospectivement récoltées dans la base de données. A partir de 2009, le taux de lactate avant prélèvement était disponible pour la plupart des patients et était extrait rétrospectivement de la base de données de l'ABM pour être analysé.

La transplantation hépatique était réalisée selon une technique classique avec conservation cave selon la technique du Piggy-back dans la grande majorité des cas. Une décompression portale était mise en place selon le choix du chirurgien selon 2 techniques différentes : shunt porto-cave temporaire classique ou shunt passif mésentérico-saphène selon une technique du service. Afin d'évaluer l'impact du clampage porte sur les pressions splanchnique et systémique, une mesure de la pression portale et de la pression veineuse centrale était réalisée systématiquement avant et après clampage ainsi qu'à la fin de la transplantation. L'élévation de la pression portale au clampage était considérée comme significative lorsque celle-ci augmentait de plus de 33%. En effet, dans un certain nombre de cas, la pression portale n'augmente que peu du fait de la présence de shunt porto-systémiques pré-existants opérationnels.

Afin d'évaluer ces shunts spontanés hémodynamiquement efficaces, le scanner abdomino-pelvien avec injection était systématiquement revu. Les shunts étaient considérés comme significatifs en taille lorsqu'ils mesurés > 5mm. Ils étaient classés selon la classification issue de Saab en shunt spléno-rénal directe ou indirect, gastrique gauche, mésentérique, ombilical ou intra-hépatique (incluant les TIPS).

Mesure du lactate par méthode capillaire

Le taux de lactate au niveau de la veine porte, du tronc commun des veines hépatiques et de l'artère radiale était mesuré de façon instantanée par méthode capillaire. Une goutte de sang était prélevée à différents endroits et appliquée sur une bandelette. Cette bandelette était insérée dans le lecteur Edge (Apex Biotechnology, Taiwan) adapté à la manière d'une glycémie capillaire.

Le gradient artério-porte était appelé production intestinale de lactate (PIL) et défini comme suit: $[\text{lactate}]_{\text{portal}} - [\text{lactate}]_{\text{arteriel}}$. Le gradient porto-sus-hépatique de lactate était appelé production hépatique de lactate (PHL) et défini comme suit : $[\text{lactate}]_{\text{hépatique}} - [\text{lactate}]_{\text{portal}}$.

Mesure du contenu intra-hépatique de lactate

La mesure du contenu intra-hépatique de lactate était réalisé par la quantification du lactate dans des biospies des greffons en fin de préparation ex-vivo par HR-MAS-NMR selon la méthode décrite plus haut.

Critères d'évaluation et définitions

Le critère principal de jugement était la survenue d'une dysfonction de greffon (EAD) telle que définie plus haut selon Olthoff. Le critère de jugement secondaire était la perte du greffon à 1 an défini par le décès du receveur ou la nécessité d'une retransplantation dans les 12 1^{er} mois suivants la transplantation. Ce critère de jugement secondaire n'était utilisé que pour la 1^{ère} partie au vu de la population analysée.

Résultats

Un total de 317 patients était transplanté pendant la période de la 1^{ère} partie de l'étude. L'indication principale de transplantation était la cirrhose alcoolique (n=184;45%). Le MELD médian était de 22 (IQR 20). Une EAD était survenue chez 105 patients (33%).

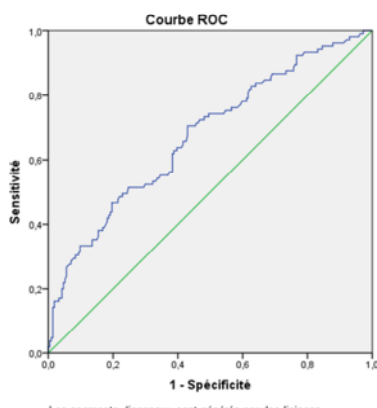
La lactatémie à la reperfusion ne prédit que médiocrement la dysfonction de greffon

Le taux de lactate à la reperfusion était significativement plus élevé chez les patients dont le foie présentait une dysfonction (5.16 vs 3.88; p<0.0001). Une courbe ROC montrait toutefois que la

lactatémie n'était que modérément corrélée à l'EAD avec une AUROC à 0.628 (95%IC 0.55-0.71). Un seuil de 5mmol/L prédisait l'EAD avec une sensibilité et une spécificité de 73% et 82% respectivement. (Figure 28)

La lactatémie n'était pas associée à la mortalité à 90 jours, à la retransplantation ou à la perte de greffon à 1 an.

Lactates at reperfusion for EAD
AUROC 0.674 (0.611 – 0.738)



Lactates at reperfusion for graft loss at 1year
AUROC 0.670 (0.592 – 0.748)
Seuil 4,77 (Ss 60% Spe 68%)

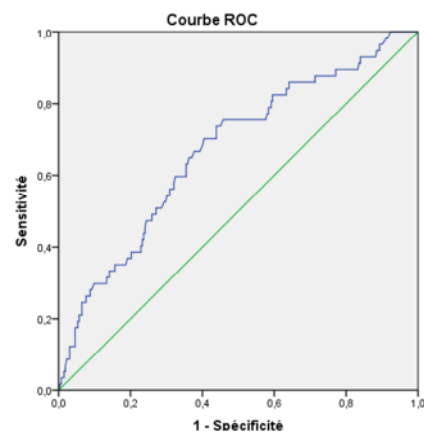


Figure 28 : courbe ROC pour la prédiction de la dysfonction de greffon (courbe de gauche) et pour la perte de greffon à 1 an selon la lactatémie à la reperfusion.

La lactatémie au moment du prélèvement ne prédit pas la dysfonction du greffon

Durant la même période, la lactatémie au moment du prélèvement était disponible pour 190 patients. Il n'y avait pas de différence significative du taux de lactate du donneur en fonction de la survenue d'une EAD ($p=0.307$) ou la perte du greffon à 1 an ($p=0.985$). La courbe ROC confirmait l'absence de caractère prédictif avec des AUROC à 0,461 et 0,469 respectivement. (Figure 29)

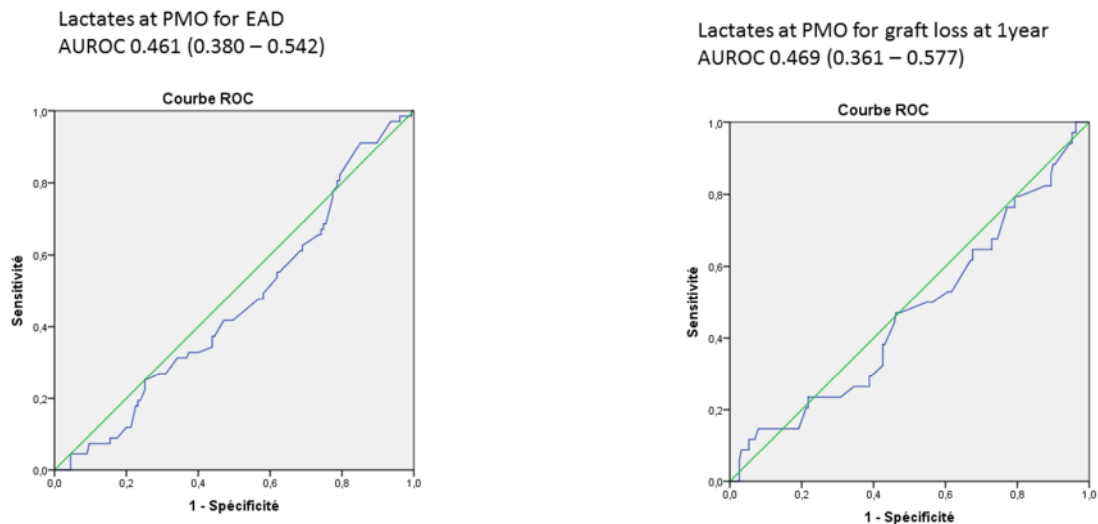


Figure 29 : courbe ROC pour la prédiction de la dysfonction de greffon (à gauche) et pour la perte de greffon à 1 an (à droite) selon la lactatémie du donneur avant le prélèvement.

Le contenu intra-hépatique de lactate prédit la survenue d'une EAD et la perte de greffon à 1 an

Le contenu intra-hépatique de lactate (CIHL) était disponible chez 34 des patients inclus dans l'étude. Le CIHL était significativement plus élevé chez les patients présentant une EAD. Un seuil de 8mmol/L prédisait la survenue d'une EAD avec une sensibilité et une spécificité de 73% et 100% respectivement. La valeur prédictive évaluée par courbe ROC était très bonne (AUROC 0,853 - IC95% 0,731-0,981) (Figure 30).

Un taux de lactate intra-hépatique > 8mmol/L était associé à un risque accru de perte de greffon à 1 an (p=0.006) avec une valeur prédictive négative de 100%.

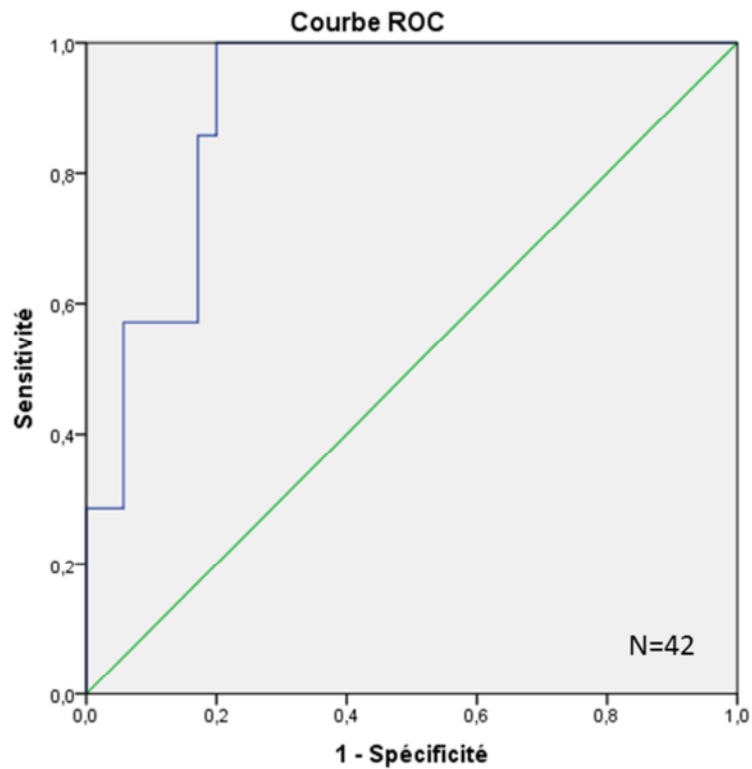


Figure 30 : courbe ROC pour la prédiction de la dysfonction de greffon selon le contenu de lactate intra-hépatique lors de la préparation du greffon.

Aucune des caractéristiques du donneur prise individuellement n'était associée à un taux élevé de lactate bien qu'un taux de stéatose macrovésiculaire > 30% montre une tendance vers un taux de lactate supérieur (n=2) (p=0.065).

Chez 20 patients pour lesquels une biopsie de reperfusion était disponible, le CIHL de fin de greffe n'était pas associé à la survenue d'une EAD.

Le gradient trans-hépatique de lactate en fin de greffe ne prédit pas la survenue d'une dysfonction

Une 1ère hypothèse permettant d'expliquer ces 1er résultats "statiques" était que le greffon hépatique qui produit des lactates est à risque de dysfonction. Pour tester cette hypothèse, le gradient trans-hépatique de lactate en fin de greffe était calculé selon la formule sus-citée de PHL.

La figure 31 montre les valeurs moyennes et les évolutions moyennes des taux étagés de lactate.

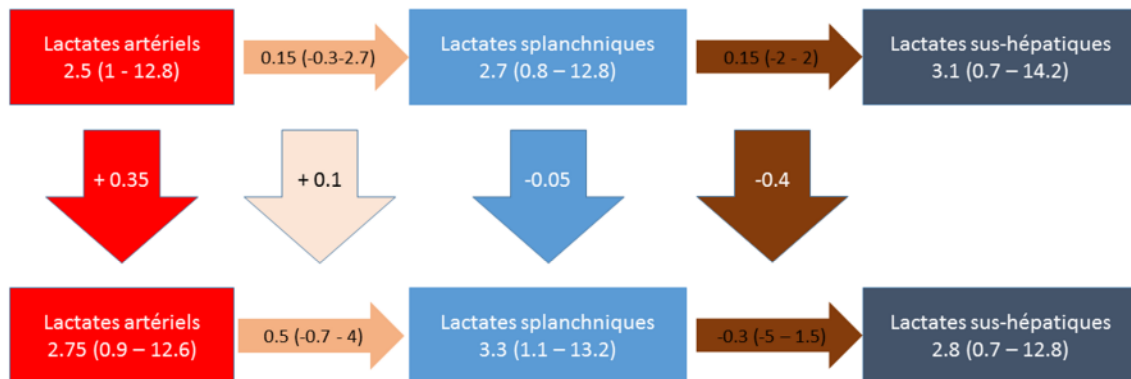


Figure 31 : valeurs moyennes et variations du taux de lactate au niveau artériel, portal et sus-hépatique selon le moment de la greffe (début en haut, fin en bas).

Au total, la PHL était en moyenne de -0,3 (-5 - 1,5). Il n'y avait pas de différence de PHL selon la survenue ou non d'une EAD ($p=0,341$). Il était observé qu'aucun des patients présentant une EAD n'avait un gradient positif, c'est-à-dire qu'aucun ne produisait de lactate, le greffon étant plutôt consommateur de lactate à la reperfusion. A l'inverse, 21% des greffons fonctionnels présentaient un PHL positif.

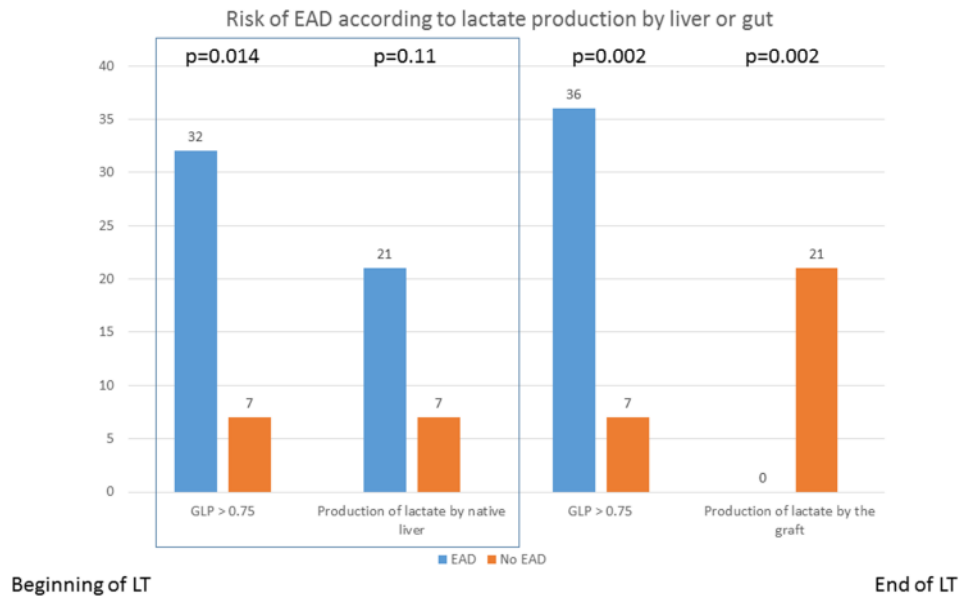


Figure 32 : incidence de la dysfonction de greffon selon la production de lactate par le foie et par l'intestin au début et en fin de greffe

La production intestinale de lactate en fin de greffe est associée à l'EAD

Durant la phase d'anhépatie, un degré variable de congestion splanchnique survient. Cette variabilité tient au fait, d'une part, de la durée de la phase d'anhépatie mais aussi à la présence ou non de voies de décompression portale qu'elles soient spontanées ou chirurgicales. L'hypothèse posée était donc que le taux de lactate de fin de greffe était un marqueur de la souffrance splanchnique. La PIL était calculée en fin de greffe afin d'apprécier cette souffrance intestinale. La PIL était significativement plus élevée chez les patients présentant une EAD versus les patients ne présentant pas d'EAD (1.35mmol/L vs 0.48mmol/L; $p=0.002$). Une courbe ROC déterminait un seuil de PIL à 0.75mmol/L comme prédictif d'EAD avec une spécificité et une sensibilité toutes deux de 73%. L'association pouvait être considérée comme bonne avec une AUROC à 0,775.

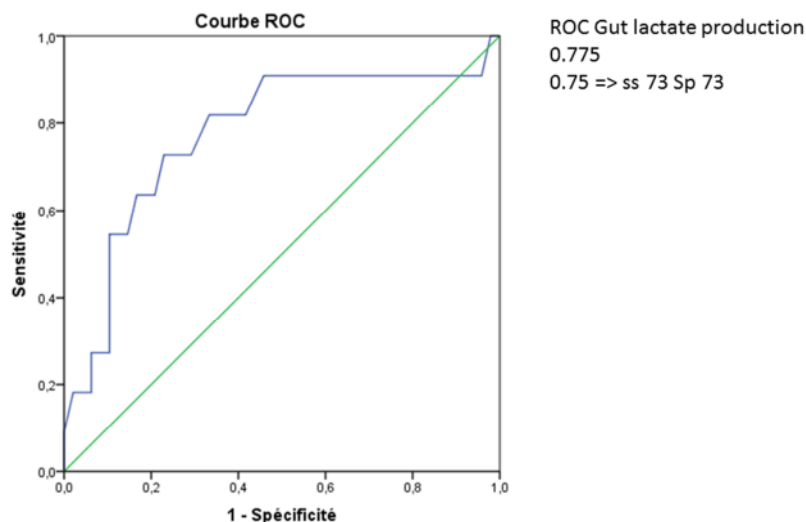


Figure 33 : courbe ROC pour la prédiction de la survenue d'une dysfonction de greffon selon la production de lactate par l'intestin grêle en fin de transplantation

Il est à noter que le taux de lactates artériels n'était pas associé à la survenue d'une EAD ($p=0,241$) ce qui va à l'encontre de troubles perfusionnels systémiques. Il existait une corrélation forte entre le taux de lactates artériel et porte (corrélation test 0,917; $p<0.0001$), mais aucun des 2 paramètres ne prédisait la survenue d'une EAD.

La production intestinale de lactate de début de greffe est associée au risque d'EAD

Il ne semblait pas exister de lien direct entre la production pré- et post-transplantation de lactate intestinaux. Sur les 18 patients avec une PIL de début de greffe $> 0,45\text{mmol/L}$, 9 (50%) avait une PIL basse en fin de greffe et 9 une PIL élevée. A l'inverse, 9 patients présentaient une augmentation de la PIL en cours de greffe.

Une analyse supplémentaire était réalisée pour évaluer si la production de lactate intestinale de fin de greffe n'était liée qu'à la phase d'anhépatie. La production de lactate par l'intestin en début de greffe était donc évaluée. Elle montrait une PIL significativement plus élevée chez les patients qui présenteraient une EAD versus les patients sans EAD ($p=0.001$). Le seuil identifié par courbe ROC était de $0,45\text{mmol/L}$ et prédisait l'EAD avec une sensibilité de 67% et une spécificité de 73% (AUROC=0.773).

Le seul facteur prédictif de PIL élevé était la présence de shunt porto-systémiques opérationnels ($p=0.049$). Ces derniers présentaient plus souvent des stigmates d'hypertension portale avec un taux plus faible de plaquettes mais une quantité d'ascite inférieure par rapport aux patients sans shunt.

Discussion

Cette étude montre l'impact significatif du lactate dans les résultats de la transplantation. L'un des points d'originalité de cette étude réside dans le fait qu'elle montre que la survenue d'une dysfonction du greffon peut être jugée avant l'implantation au niveau du greffon (contenu hépatique en lactate) et chez le receveur au niveau du tube digestif (production intestinale de lactate).

Les études ayant porté sur l'intérêt du lactate en transplantation hépatique sont relativement nombreuses^{127,128,129} mais peu ont étudié précisément l'origine et le devenir du lactate hépatique.

La lactatémie systémique à la reperfusion est un biomarqueur attractif et simple à mettre en œuvre pour prédire l'issue de la transplantation. Il est le témoin à la fois de l'état circulatoire et métabolique général du receveur et des lésions d'ischémie-reperfusion. Cette étude souligne toutefois ses limites en termes d'évaluation du greffon. En effet, alors que dans un système fermé – comme celui d'une machine à perfusion – le taux de lactate circulant est un bon témoin de la fonction du greffon, le lactate systémique est difficilement interprétable au cours d'une transplantation hépatique vu le nombre de paramètres impliqués dans son métabolisme.

Le lactate est souvent considéré comme un déchet de l'oxydation incomplète du glucose par la glycolyse anaérobie.¹³⁰ Or, il existe une tendance actuelle à considérer les lactates comme un potentiel précurseur du glucose dans les situations critiques telles que les périodes inflammatoires majeures. Le lactate pourrait être un combustible pour les mitochondries.¹³¹ Ainsi, bien que le lactate systémique soit un marqueur fiable de troubles de la microcirculation systémique – notamment dans le cadre du sepsis –, le lactate produit par un organe donné ne peut être interprété que comme tel.

Le cas du lactate intestinal chez le patient greffé est particulièrement intéressant sur ce point. En effet, à première vue, la production de lactate par l'intestin est un paramètre fiable prédictif de mauvais résultat après la greffe. Il est utile aussi bien en début de greffe qu'en fin de greffe avec des seuils prédictifs différents. Il est connu de par la pratique que le tube digestif est particulièrement sensible aux événements hémodynamiques. En effet, l'ischémie mésentérique est un modèle bien connu où les lactates ont une place très importante dans le diagnostic et le pronostic.¹³² Ils sont souvent un marqueur précoce qui permet le diagnostic dans une situation clinique souvent silencieuse. Le problème de l'impact de l'ischémie veineuse sur la production intestinale de lactate n'est, quant à lui, pas ou peu rapporté. Une étude récente montre que l'ischémie veineuse était associée à une élévation plus importante des lactates que l'ischémie-reperfusion artérielle. Les lésions histologiques étaient également plus importantes.¹³³

L'interprétation de la différence artério-porte en lactate doit d'ailleurs être analysée avec plus de finesse que la simple supposition selon laquelle certains patients ont un tube digestif qui tolère l'ischémie veineuse. Le rôle de l'hypertension portale - dont nous avons vu plus haut le rôle sur le métabolisme du foie cirrhotique au même titre que la dénutrition - est significatif. Les patients présentant une cirrhose décompensée au stade d'ACLF présentent des lésions intestinales. Des analyses histologiques et moléculaires ont montré des anomalies des jonctions intercellulaires.¹³⁴ Des troubles microcirculatoires aigus sur les anomalies circulatoires splanchniques chroniques entraînent une hypoxie avec mise en route de la glycolyse anaérobie. Les troubles extra-splanchniques tels que l'insuffisance rénale peuvent eux-mêmes entraîner et entretenir une acidose associée à des troubles ioniques. Enfin certaines bactéries peuvent produire des lactates qui seront utilisés par les mitochondries intestinales sur un modèle de symbiose comme récemment démontré.¹³⁵ Les déséquilibres du microbiote, communs chez le cirrhotique, favoriseraient donc les modifications métaboliques en dehors d'une ischémie seule. L'ensemble de ces paramètres pourrait expliquer pourquoi la différence artério-porte en lactate prédit la survenue d'une dysfonction, comme étant un signe de souffrance de l'organisme plutôt que du seul intestin.

Au cours de la cirrhose décompensée, notamment lors de l'ACLF, le lactate est un marqueur pronostique important mais dont l'origine est multifactorielle : insuffisance rénale et circulatoire jouent un rôle central.¹³⁶ Le rôle de clairance du lactate par le foie est également une hypothèse parfois soulevée mais celle-ci ne semble pas valider par cette étude.

En effet, l'un des points d'originalité de cette étude est de mettre en évidence l'absence de caractère prédictif de la clairance des lactates par le foie au décours de la greffe. Cette notion a déjà été démontrée dans le cadre de transplantation pour hépatite fulminante. Il était alors montrer que le foie en insuffisance aiguë produisait une quantité importante de lactates dans tous les cas mais que le fait que le greffon soit consommateur ou producteur de lactate ne prédisait pas les suites.¹²⁸ Nous retrouvons cette donnée. Dans le cadre du sepsis, d'autres études expérimentales ont confirmé la faible part du foie dans l'hyperlactatémie.¹³⁷ Contrairement à une idée reçue, la capacité du greffon à éliminer les lactates de la circulation n'est pas un paramètre déterminant des suites de la greffe. Aucun des patients présentant un greffon producteur de lactate n'a présenté de dysfonction. Ceci peut sembler contradictoire avec le caractère hautement prédictif du contenu intra-hépatique en lactate. Ce paradoxe apparent pourrait s'expliquer par le fait que les lactates intra-hépatiques sont rapidement « flushés » au cours du lavage ou lors de la reperfusion, expliquant le caractère - faiblement - prédictif des lactates à la reperfusion, la production ou la consommation des lactates étant plutôt déterminées par le taux de lactate auquel le foie est exposé à la reperfusion. En effet,

plus que le métabolisme hépatique du lactate, l'attention doit être attirée par le métabolisme intestinal du lactate.

C'est précisément la production intestinale de lactate qui est étudiée par la différence artério-porte en lactate. L'un des seuls paramètres associé à cette différence artério-porte en lactate est la présence de shunts spontanés hémodynamiquement efficaces au cours de la greffe. Cette double notion est importante car il convient de distinguer la présence de shunts spontanés, présents chez 30-40% des patients transplantés et les shunts hémodynamiquement efficaces au cours de la greffe qui n'ont jamais fait l'objet d'une analyse précise. En effet, une veine ombilicale reperméabilisée ou un TIPS peuvent être des shunts efficaces chez le patient cirrhotique mais ils ne sont pas hémodynamiquement efficaces en phase d'anhépatie car ils ont été déconnectés pendant la phase de dissection. Par ailleurs, il existe des situations où, malgré la présence d'un shunt, la pression portale augmente de façon significative témoignant de leur inefficacité hémodynamique. Dans notre étude, les shunts étaient plus souvent spléno-rénaux ou mésentériques et plus rarement gastrique gauche. La différence artério-porte en début de greffe était significativement plus élevée en cas de shunt hémodynamiquement efficaces. L'interprétation d'une différence artério-porte supérieure en cas de shunt peut être interprété de 2 façons : 1/ le taux de lactate artériel est plus élevé témoignant d'une souffrance plus importante de l'organisme en début de transplantation, 2/ le taux de lactate portal est plus bas ce qui peut être due soit à une souffrance intestinale moindre témoignant de l'efficacité hémodynamique de la dérivation spontanée soit à l'effet shunt avec dilution du taux de lactate entre la veine porte et le système cave ce qui favoriserait une élévation du lactate systémique.

La réalité est probablement entre les 2 puisqu'il n'a pas été mise en évidence de différence de taux de lactate porte ou systémique entre les patients avec ou sans shunt efficace. Cette absence de différence semble en tout cas valider la définition des shunts hémodynamiquement efficaces qui pourrait être un élément décisionnel dans la réalisation d'une décompression portale au cours de la greffe.

La prise en charge de ces shunts en fin de greffe est une seconde problématique soulevée par le caractère prédictif de la production intestinale de lactate en fin de greffe. Là où la plupart des auteurs utilisent une mesure directe du flux porte par débitmétrie¹³⁸ ou d'autres évaluent la pression portale en fin de greffe¹³⁹, l'utilité de la production intestinale de lactate pourrait être plus fine étant donné les nombreux paramètres qui font varier les mesures de flux ou de pression en fin de transplantation. Les shunts spléno-rénaux ont fait l'objet d'une attention particulière. La ligature de

la veine rénale ou la splénectomie sont des techniques rapportées qui semblent présenter des avantages et inconvénients différents mais des résultats comparables.¹⁴⁰

En conclusion, le métabolisme du lactate au cours de la transplantation est décisif pour les suites de la greffe. Le foie en décompensation est bien producteur de lactate, un greffon souffrant lors de la phase de conservation froide est bien producteur de lactate mais contrairement à l'idée reçue, un greffon producteur de lactate en fin de greffe n'est pas forcément souffrant au point de présenter une dysfonction par la suite. La différence artério-porte en lactate est un marqueur significatif de dysfonction car il pourrait témoigner d'un état de souffrance systémique et d'une cirrhose avancée et vieillie avec une hypertension portale. Cette hypertension portale est responsable de voies de dérivations dont l'efficacité hémodynamique peut être démontrée par la production de lactate. Cette dernière peut donc servir d'outil métabolique pour la décision de ligature des shunts.

Conclusion de la 2nde partie

Dans cette 2nde partie, nous avons démontré l'intérêt de la métabolomique en transplantation hépatique par la mise en évidence du coût de l'adaptation métabolique.

- La métabolomique HR-MAS-NMR permet d'identifier les greffons ayant souffert de la phase de conservation froide. Elle permet également d'identifier des profils métaboliques spécifiques pour les patients présentant une sarcopénie ou une hypertension portale qui sont souvent associée l'une à l'autre.
- La métabolomique HR-MAS-NMR permet d'identifier des biomarqueurs tels que le lactate et la phosphocholine dont la quantification en extemporané pourrait guider l'utilisation des greffons et la mise sur machine à perfusion.
- Le lactate est un biomarqueur intéressant dont il convient d'analyser précisément la source et le devenir. Contrairement à une idée reçue, la production hépatique de lactate par le greffon en fin de transplantation n'est pas un facteur de mauvais pronostic. La production intestinale de lactate est un paramètre à prendre en compte notamment parce qu'elle identifie des shunts spontanés significatifs pour l'issue de la greffe.

Limites générales et perspectives

Comme le montre bien les données sur le métabolisme des lactates au cours de la transplantation, l'analyse du métabolisme hépatique est complexe étant donné la situation « géographique » du foie au confluent de la circulation splanchnique et générale.

L'une des principales limites de ce travail de thèse repose sur l'absence de données sur l'état métabolique initial, d'une part, ainsi que sur les flux de métabolites entrant et sortant. En effet, nous ne disposons que de biopsies en fin d'hépatectomie ou en fin de conservation froide du greffon sans connaître le statut métabolique de l'état de base. En ce qui concerne les foies hépatectomisés, la qualité du parenchyme, l'indication opératoire n'ont pas démontré être associées à un profil métabolique différent mais ceci pourrait être lié à un lissage par la phase opératoire qui impacte certaines voies métaboliques, sous l'effet de l'inflammation notamment. L'obtention et l'analyse métabolomique pré-opératoire permettrait d'identifier avant le geste certains groupes à risque pour lesquels une intervention préparatrice peut être réalisée. Il en est ainsi chez le patient cirrhotique dénutri en attente de transplantation. Comme démontré par notre étude, les patients sarcopéniques sont à haut risque d'échec lorsqu'ils reçoivent un greffon qui tolère mal l'ischémie froide. La renutrition et la rééducation physique avant la greffe sont des voies d'amélioration significatives dans la prise en charge du patient cirrhotique en attente de greffe. De la même façon, la sarcopénie étant un paramètre prédictif de complications après hépatectomie, l'identification de profils métaboliques à risque sur lesquels une intervention métabolique simple et peu coûteuse pourrait être bénéfique est importante. En ce sens, la métabolomique HR-MAS-NMR a démontré dans cette thèse son intérêt puisqu'elle permet, dans un temps clinique, d'obtenir un profil exploitable facilement et rapidement pour la prise en charge du patient.

Les flux des métabolites sont également primordiaux à analyser. La métabolomique donne une image instantanée du contenu en métabolites d'un fragment donné à un moment donné. Or le contenu en métabolites est hautement dépendant, pour un organe qui utilise ou produit une quantité importante de métabolites, de la quantité de métabolites qui entrent. Ainsi une quantification des métabolites analysés par HR-MAS-NMR au niveau du sang portal permettrait de mieux comprendre et d'expliquer les différences de contenu au moment du prélèvement. Ceci est particulièrement important au niveau du foie qui reçoit le flux de l'intestin. Bien que les patients subissant une intervention soient à jeun et que le flux de nutriments puisse être limité, un certain nombre de métabolites peuvent provenir du métabolisme intestinal. Deux points particuliers peuvent moduler de façon majeure ce flux portal de métabolites. D'une part, les modifications hémodynamiques de la circulation splanchnique – aigue lors de l'hépatectomie avec une élévation

brutale de la pression portale ou chronique avec les modifications de la microcirculation intestinale via les médiateurs que sont le NO et l'activation du système sympathique chez le cirrhotique – peuvent modifier les flux de métabolisme et entraîner par eux-mêmes une modification du métabolisme des cellules intestinales. Cette hypothèse semble valider par l'étude sur les lactates splanchniques mais nous ne disposons pas de la quantification des autres métabolites tels que le glucose ou les acides aminés néoglucoformateurs pour affiner l'analyse. D'autre part, de nombreuses études récentes montrent un impact majeur de la flore intestinale microbienne sur la fonction hépatique. Il est rapporté des modifications de la flore intestinale dans la cirrhose selon sa gravité mais également selon l'origine de la cirrhose.¹⁴¹ Des modifications particulières ont été rapportées dans les cirrhoses biliaires ainsi que dans le cadre de la maladie stéatosique du foie. Ceci a certainement un impact sur le métabolisme intestinal. Ainsi les bactéries de l'intestin sont productrices de lactate qui est transporté activement au travers des entérocytes et utilisé en partie par ces cellules ou par le foie dans un système symbiotique.¹³⁶ Lors des modifications de la flore intestinale liée à un phénomène pathologique (cirrhose, insuffisance hépatique), il pourrait advenir un déséquilibre de ce système qui favoriserait la décompensation et le décès. L'analyse des métabolites portaux en rapport avec les modifications de la flore intestinale est donc une voie d'exploration future avec un impact thérapeutique direct visant à moduler la flore intestinale avant ou après un geste chirurgical.

L'analyse des métabolites qui sortent du foie est également importante pour connaître les changements de statut producteur ou consommateur du foie pour chaque métabolite. Ainsi la libération de glucose ou d'acides aminés par le foie en rapport avec la quantité de ces métabolites entrant permettrait d'interpréter le contenu intra-hépatique et les données de l'analyse de réseau sous un jour plus dynamique. Ces données sont facilement obtenues par la quantification au laboratoire hospitalier de biologie moléculaire.

Une seconde limite importante tient à la technique de métabolomique utilisée qui présente une sensibilité limitée. Associée à cette sensibilité limitée, l'impossibilité d'analyser les profils lipidiques par cette technique pourrait limiter l'étendue des conclusions. En effet, au vue de la richesse en lipides et du rôle fondamental de ces lipides dans le fonctionnement du foie, l'absence d'analyse de la constitution en lipides des prélèvements est une limite importante. Comme évoqué dans l'introduction, le métabolisme des lipides est fortement perturbé dans nombre de pathologies hépatiques. Les pathologies hépatiques liées à l'accumulation de graisse, qui sont en nette augmentation dans les pays occidentaux, sont aujourd'hui reconnues comme des facteurs de risque majeurs tant après hépatectomie que pour la fonction du greffon. Bien que le profil métabolique des greffons soit clairement modifié par le taux de stéatose, une analyse plus précise de la constitution

en lipides est primordiale. Le lien entre lipides et inflammation est largement établi en hépatologie. Ainsi une analyse lipidomique parallèle est indispensable. Elle permettrait d'une part une analyse non ciblée permettant d'analyser l'impact de la répartition des différents groupes de lipides, d'autre part une analyse ciblée portant sur certains lipides impliqués dans la régulation de l'inflammation tels que les prostaglandines, les eicosanoïdes etc...

D'autre part, la faible sensibilité de la technique empêche l'identification et la quantification d'un certain nombre de métabolites notamment des métabolites du cycle de Krebs dont les produits apparaissent et disparaissent très rapidement. Par ailleurs, du fait de la richesse du foie en graisses, un certain nombre de métabolites ne sont pas quantifiables du fait d'une superposition de plusieurs métabolites sur l'axe des ^1H .

L'utilisation de techniques de métabolomique différentes permettrait de compléter les données de l'HR-MAS-NMR. Il est donc nécessaire d'associer les techniques de métabolomique comme mentionné dans l'introduction pour avancer dans la connaissance de la physiopathologie des phénomènes complexes telles que l'insuffisance hépatocellulaire. Les résultats de cette thèse valident l'utilisation de la technique d'HR-MAS-NMR chez l'homme et montrent l'intérêt pratique de l'HR-MAS-NMR en clinique. Par contre, ils posent de nombreuses questions quant aux mécanismes impliqués dans l'insuffisance hépatocellulaire post-hépatectomie et l'ischémie du greffon. L'utilisation de technique de spectroscopie de masse à haute résolution est donc nécessaire et devrait être combiné sur des échantillons identiques à ceux analysés par HR-MAS-NMR. Ainsi le couplage d'une technique de laboratoire pure qu'est la spectroscopie de masse avec la technique d'HR-MAS-NMR utilisable en clinique permettrait de faire entrer le laboratoire au bloc opératoire.

Cette passerelle entre les 2 mondes est déjà en passe d'être franchie par certaines équipes dont le laboratoire ICube. Le principe de métabolomique extemporanée est appliqué en HR-MAS-NMR pour les tumeurs cérébrales. Etant donné la différence de profil métabolique entre un tissu sain et un tissu tumoral, il est aisé de savoir si la marge est envahie. L'utilisation de la spectroscopie de masse grâce à une technique MALDI-TOF permet d'obtenir en extemporané un profil métabolique encore plus précis de la tranche de section chirurgicale. Le principe a d'ailleurs déjà été proposé par une lilloise du Pr Fournier avec le Spidermass.¹⁴² L'association de la spectroscopie avec la microscopie (MALDI-imaging) permet d'aller encore plus loin dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques en jeu.

Bien que conservatrice des tissus sur lesquels on l'applique, l'HR-MAS-NMR ne permet pas d'identifier précisément les cellules à l'origine des profils métaboliques observés. Bien que la masse représentée par les hépatocytes soit largement supérieure à la masse des autres cellules, et qu'il soit

donc en grande part responsable des mécanismes métaboliques observés, il serait intéressant d'identifier si certaines zones du foie sont plus métaboliquement touchées que d'autres ou si certaines populations cellulaires jouent un rôle dans les modifications métaboliques. Il est connu que les zones péri-portales sont plus exposées aux phénomènes inflammatoires et qu'il existe un switch métabolique de la zonation hépatique au décours d'une hépatectomie. Par ailleurs, de nombreuses interactions existent entre les cellules particulièrement au niveau du foie. Les cellules immunitaires sont activées au décours d'une hépatectomie. Cette activation peut modifier le microenvironnement métabolique au même titre que les cellules tumorales modifient leur environnement pour permettre leur prolifération au dépend des cellules non pathologiques. La connaissance de telles interactions permettrait de cibler des populations cellulaires (cellules de Küpffer, cellules endothéliales) sur lesquelles une intervention métabolique améliorerait la situation métabolique globale.

Il s'agit probablement par ce biais qu'il est possible d'identifier un profil métabolique prédictif de récurrence des métastases hépatiques de cancer colorectal après hépatectomie. En effet, la vieille théorie du « seed and soil » pourrait voir apporter des arguments métaboliques qui commencent déjà à poindre dans la littérature. Bien que le modèle du CHC soit différent, en ce sens que l'oncogenèse de CHC provient de l'évolution d'un nodule dysplasique au sein d'un parenchyme inflammatoire, il a été démontré que le pronostic après hépatectomie dépend plus du profil génétique du parenchyme que de la tumeur réséquée.¹⁴³ Il est plausible que l'environnement métabolique notamment secondaire à l'inflammation postopératoire soit favorable à l'implantation de cellules tumorales circulantes. Ceci pourrait être autant vrai pour la récurrence de CHC après transplantation hépatique que pour les métastases après hépatectomie.

La combinaison de la microscopie avec la métabolomique, la protéomique ou la lipidomique notamment par le MALDI-TOF ouvre des voies de recherche passionnante permettant d'envisager un approfondissement des connaissances dans le métabolisme hépatique. D'abord par son aspect fondamental, la combinaison de ces différentes techniques permettra de préciser les mécanismes de biologie moléculaire bien plus précisément que par la résonance magnétique seule. La combinaison de données immunologiques et métaboliques, pour une part spécifique au foie pour d'autre part témoins de l'état général - notamment nutritionnel - du patient permettra d'envisager des interventions métaboliques. L'usage de médicaments du métabolisme au décours d'une hépatectomie pourrait être une voie à suivre. L'évaluation de l'effet métabolique des interventions modifiant la circulation portale ou l'inflammation en sont d'autres.

Dans son caractère pratique, le développement d'outils permettant une évaluation extemporanée étape par étape au cours d'une hépatectomie. En fonction de ces résultats, le développement

d'alternatives techniques ou la mise en place d'intervention métabolique médicamenteuse ou technologique pourrait permettre d'envisager d'élargir les résections sans faire courir le risque d'insuffisance hépatocellulaire et de réduire le risque de récurrence.

Le chemin est encore long mais mieux connaître l'état métabolique hépatique et général du patient semble permettre d'envisager une amélioration des résultats de la chirurgie hépatique et de la transplantation dans un avenir moins lointain que les interventions génétiques ou cellulaires.

Bibliographie

- ¹ Yang W, Lu Z. Nuclear PKM2 regulates the Warburg effect. *Cell Cycle*.2013.12(19):3154-8
- ² Liu J, Wu N, Ma L, Liu M, Liu G, Zhang Y, Lin X. Oleic acid suppresses aerobic glycolysis in cancer cells by switching pyruvate kinase type M isoforms. *Plos One*.2014.9(3):e91606.doi:10.1371/journal.pone.0091606.
- ³ Sookian S, Pirola CJ. Alanine and aspartate aminotransferase and glutamine-cycling pathway: their roles in pathogenesis of metabolic syndrome. *World J Gastroenterol*.2017;18(29):3775-81
- ⁴ Van der Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*.2009;324:1029-33
- ⁵ Martinez-Granados B, Morales JM, Rodrigo JM, De Olmo J, Serra MA et al. Metabolic profile of chronic liver disease by NMR-spectroscopy of human biopsies. *Int J Mol Med*.2011;27(1):111-7
- ⁶ Nishikawa T, Bellance N, Damm N, Bing H, Zhu Z, Handa K et al. A switch in the source of ATP production and a loss of capacity to perform glycolysis are hallmarks of hepatocytes failure in advanced liver disease. *J Hepatol*.2014;60(6):1203-11
- ⁷ Amathieu R, Triba MN, Nahon P, Bouchemal N, Kamoun W, Haouache H et al. Serum ¹H-NMR metabolomic fingerprint of acute-on-chronic liver failure in intensive care unit patients with alcoholic cirrhosis. *PlosOne*.2014;9(2):e89230.doi:10.1371/journal.pone.0089230
- ⁸ Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*.2005;42(5):987-1000
- ⁹ Satapati S, Kucejova B, Duarte JAG, Fletcher JA, Reynolds L, Sunny NE et al. Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. *J Clin Invest*.2015;4447-62
- ¹⁰ Alonso C, Fernandez-Ramos D, Varela-Rey M, Martinez-Arranz I, Navasa N, Van Liempd SM et al. Metabolomic identification of subtypes of non alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*.2017;152(6):1449-61
- ¹¹ Sigal SH, Rajvanshi P, Gorla GR, Sokhi RP, Saxena R, Gebhard Dr Jr et al. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocytes replication and activates cell aging events. *Am J Physiol*.1999;276(5Pt1):G1260-72
- ¹² Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*.2004;5(10):836-47
- ¹³ Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*.2005.433:760-762
- ¹⁴ Seglen PO. DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival. *Cell Biol Toxicol*.1997;13(3-4):301-15
- ¹⁵ Toshima T, Shirabe K, Fukuhara T, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y et al. Suppression of autophagy during liver regeneration impairs energy charge and hepatocyte senescence in mice. *Hepatology*.2014;60(1):290-300
- ¹⁶ Brand HS, Deutz NE, Meijer AJ, Jorning GG, Chalumeau RA. In vivo amino acid fluxes in regenerating liver after two-thirds hepatectomy in the rat. *J Hepatol*.1995;23(3):333-40
- ¹⁷ Fowler FC, Banks RK, Mailliard ME. Characterization of sodium-dependent amino acid transport activity during liver regeneration. *Hepatology*.1992;16(5):1187-94
- ¹⁸ Miettinen TP, Pessa HK, Caldez MJ, Fuhrer T, Diril MK, Sauer U et al. Identification of transcriptional and metabolic programs related to mammalian cell size. *Current Biology*.2014;24(6):598-608
- ¹⁹ Ferri D, Moro L, Mastrodonato M, Capuano F, Marra E, Liquori GE et al. Ultrastructural zonal heterogeneity of hepatocytes and mitochondria within the hepatic acinus during liver regeneration after partial hepatectomy. *Bio Cell*.2005;97(4):277-88

-
- ²⁰ Rehman H, Sun J, Shi Y, Ramshesh VK, Liu Q, Currin RT et al. NIM811 prevents mitochondrial dysfunction, attenuates liver injury, and stimulates liver regeneration after massive hepatectomy. *Transplantation*.2011;91(4):406-12
- ²¹ Folmes CD, Arrell DK, Zlatkovic-Lindor J, Martinez-Fernandez A, Perez-Terzic C, Nelson TJ et al. Metabolome and metaboproteome remodeling in nuclear reprogramming. *Cell cycle*.2016;12(15):2355-65
- ²² Jia C, Dai C, Bu X, Peng S, Xu F, Xu Y et al. Coadministration of prostaglandin EA with somatostatin attenuates acute liver damage after massive hepatectomy in rats via inhibition of inflammatory responses, apoptosis and endoplasmic reticulum stress. *Int J Mol Med*.2013;31(2):416-22
- ²³ Wack KE, Ross MA, Zegarra V, Sysko LR, Watkins SC, Stoltz DB. Sinusoidal ultrastructure evaluated during revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology*.2001;33(2):363-78
- ²⁴ Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z, et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature*.2010;468(7321):310-5
- ²⁵ Shimizu H, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Mitsuhashi N, Kato A, Ito H et al. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol*.2001;34(5):683-9
- ²⁶ Fernandez M, Vizzutti J, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF Receptor 2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessels formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology*.2004;126:886-894
- ²⁷ Liu WT, Jing YY, Han ZP, Li XN, Liu Y, Lai FB et al. The injured liver induces hyperimmunoglobulinemia by failing to dispose of antigens and endotoxins in the portal system. *PlosOne*.2015;doi:10.1371/journal.pone.0122739
- ²⁸ Malik R, Selden C, Hodgson H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol*.2002;13(6):425-631
- ²⁹ Xu C, Chen X, Chang C, Wang G, Wang W, Zhang L et al. Characterization of transcriptional profiling of Kupffer cells during liver regeneration in rats. *Cell Biol Int*.2012 ;36(8) :721-32
- ³⁰ Hu J, Srivastava K, Wieland M, Runge A, Mogler C, Besemfelder E et al. Endothelial cell-derived angiopoietin-2 controls liver regeneration as a spatiotemporal rheostat. *Science*.2014;343(6169):416-9
- ³¹ Dold S, Richter S, Kollmar O, von Heesen M, Scheuer C, Laschke MW et al. Portal hyperperfusion after extended hepatectomy does not induce a hepatic arterial buffer response (HABR) but impairs mitochondrial redox state and hepatocellular oxygenation. *PlosOne*.2015;doi:10.1371/journal.pone.0141877
- ³² Schadde E, Tsatsaris C, Swiderska-Syn M, Breitenstein S, Urner M, Schimmer R et al. Hypoxia of the growing liver accelerates regeneration. *Surgery*.2017;161(3):666-679
- ³³ Kron P, Linecker M, Limani P, Schlegel A, Kambakamba P, Lehn JM et al. Hypoxia-driven Hif2a coordinates mouse liver regeneration by coupling parenchymal growth to vascular expansion. *Hepatology*.2016;64(6):2198-2209
- ³⁴ Dahn MS, Mitchell RA, Lange MP, Smith S, Jacobs LA. Hepatic metabolic response to injury and sepsis. *Surgery*.1995;117(5):520-30
- ³⁵ Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*.2006;43(2Suppl1):S45-53
- ³⁶ Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol*.2007;213(2):286-300

-
- ³⁷ Paranjpe S, Bowen WC, Mars WM, Orr A, Haynes MM, DeFrances MC et al. Combined systemic elimination of Met and epidermal factor receptor signaling completely abolishes liver regeneration and leads to liver decompensation. *Hepatology*.2016;64(5):1711-24
- ³⁸ Rosa JL, Bartrons R, Tauler A. Gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver. *Biochem J*.1992;187(Pt1):113-6
- ³⁹ Haber BA, Chin S, Chuang E, Buikhuisen W, Naji A, Taub R. High levels of glucose-6-phosphatase gene and protein expression reflect an adaptive response in proliferating liver and diabetes. *J Clin Invest*.1995;95(2):832-41
- ⁴⁰ Reddy MS, Shrivastav M, Kaliamoorthy I, Kota V, Dabora A, Govil S, Rela M. Safety of live liver donation by individuals with G6PD deficiency: initial results and comparative study. *Transplantation*.2016;100(4):814-8
- ⁴¹ Kasahara H, Ohyanagi H, Saito Y. Changes of gluconeogenesis and alanine metabolism following partial hepatectomy in normal and cirrhotic rats. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*.1988;89(3):365-75
- ⁴² Straatsburg IH, Boermeester MA, Houdjik AP, Frederiks WM, Wesdorp RI, van Leeuwen PA et al. Endotoxin- and cytokine-mediated effects of liver cell proliferation and lipid metabolism after partial hepatectomy: a study with recombinant N-terminal bactericidal/permeability increasing protein and interleukin-1 receptor agonist. *J Pathol*.1996;179(1):100-105
- ⁴³ Mead JE, Braun L, Martin DA, Fausto N. Induction of replicative competence (« priming ») in normal liver. *Cancer Res*.1990;50(1);7023-30
- ⁴⁴ Van de Poll MC, Lighart-Melis GC, Boelens PG, Deutz NE, van Leeuwen PA, de Jong CH. Intestinal and hepatic metabolism of glutamine and citrulline in humans. *Am J Physiol Gastrointest Physiol*.2007;581(Pt2):819-27
- ⁴⁵ Moriyama M, Makiyama I, Shiota M, Uesugi K, Kannan Y, Ohta M et al. Decreased ureagenesis from alanine, but not from ammonia and glutamine , in the perfused liver after partial hepatectomy. *Hepatology*.1996;23(6):1584-90
- ⁴⁶ Du Z, Zhou Y, Lu X, Li L, Lu C, Li L et al. Octreotide prevents liver failure through upregulating 5'-methylthioadenosine in extended hepatectomized rats. *Liver Int*.2016;36(2):212-22
- ⁴⁷ Garcia-Arcos I, Gonzalez-Kother P, Aspichueta P, Rueda Y, Ochoa B, Fresnedo O. Lipid analysis reveals quiescent and regenerating liver specific populations of lipid droplets. *Lipids*.2010;45(12):1101-8
- ⁴⁸ Bollard ME, Contel NR, Ebbels TM, Smith L, Beckonert O, Cantor GH et al. NMR-based metabolic profiling identifies biomarkers of liver regeneration following partial hepatectomy in the rat. *J Proteome Res*.2010;9(1):59-69
- ⁴⁹ Mukherjee S, Chellappa K, Moffitt A, Ndungu J, Dellinger RW, Davis JG, Agarwal B et al. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis promotes liver regeneration. *Hepatology*.2016;65(2):616-30
- ⁵⁰ Miettinen TP, Pessa HK, Caldez MJ, Fuhrer T, Diril MK, Sauer U et al. Identification of transcriptional and metabolic programs related to mammalian cell size. *Curr Biol*.2014;24(6):598-608
- ⁵¹ Shteyer E, Liao Y, Muglia LJ, Hruz PW, Rudnick DA. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology*.2004;40(6):1322-32
- ⁵² Ling J, Chaba T, Zhu LF, Jacobs RL, Vance DE. Hepatic ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine predicts survival after partial hepatectomy. *Hepatology*.2012;55(4):1094-1102

-
- ⁵³ Valdecantos MP, Pardo V, Ruiz L, Castro-Sanchez L, Lanzon B, Fernandez-Millan E et al. A novel glucagon-like peptide 1/glucagon receptor dual agonist improves steatohepatitis and liver regeneration. *Hepatology*.2017;65(3):950-68
- ⁵⁴ Brinkmann A, Katz N, Sasse D, Jungermann K. Increase of the glucogenic and decrease of the glycolytic capacity of the rat liver with a change of the metabolic zonation after partial hepatectomy. *Hoppe Seyler Z Physiol Chem*.1979;359(11):1561-71
- ⁵⁵ Wagenaar GT, Chamuleau RA, de Haan JG, Maas MA, de Boer PA, Marx F et al. Experimental evidence that the physiological position of the liver within the circulation is not a major determinant of zonation of gene expression. *Hepatology*.1993;18(5):1144-53
- ⁵⁶ Wagenaar GT, Chamuleau RA, Maas MA, de Bruin K, Korfage HA, Lamers WH et al. The physiological position of the liver in the circulation is not a major determinant of its functional capacity. *Hepatology*.1994;20(6):1532-40
- ⁵⁷ Ohtake Y, Kobayashi T, Maruko A, Oh-Shi N, Yamamoto F, Katoh S et al. Norepinephrine modulates the zonally different hepatocyte proliferation through the regulation of transglutaminase activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.2010;299(1):G106-14
- ⁵⁸ Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl acad Sci USA*.1971;68:2374-76
- ⁵⁹ Horning E, Horning MG. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *AM Assoc Clin Chem*.1971;17:802-809
- ⁶⁰ Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Bagnanz F, Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotech*.1998;16:373-78
- ⁶¹ Tweedale, Notley-McRobb L, Ferenci T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherischia coli* as revealed by global metabolite pool (metabolome) analysis. *J Bacteriol*.1998;180:5109-5116
- ⁶² Mise Y, Vauthey JN, Zimmitti G, Parker NH, Conrad C, Aloia TA et al. Ninety-day postoperative mortality is a legitimate measure of hepatopancreatobiliary surgical quality. *Ann Surg*. 2015;262(6):1071-8
- ⁶³ Madrahimov N, Dirsch O, Broeschl C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Ann Surg*.2006;244(1):89-98
- ⁶⁴ Narita M, Oussoultzoglou E, Fuchshuber P, Pessaux P, Chenard MP, Rosso E et al. What is the safe future liver remnant size in patients undergoing major hepatectomy for colorectal liver metastases and treated by intensive preoperative chemotherapy? *Ann Oncol Surg*.2012;19(8):2526-38
- ⁶⁵ Kishi Y, Abdalla EK, Chun YS, Zorzi D, Madoff DC, Wallace MJ et al. Three hundred and one consecutive extended right hepatectomies: evaluation of outcome based on systematic liver volumetry. *Ann Surg*. 2009;250(4):540-8
- ⁶⁶ Truant S, Boleslawski E, Sergent G, Leteurtre E, Duhamel A, Hebbar M et al. Liver function following extended hepatectomy can be accurately predicted using remnant liver volume to body weight ratio. *World J Surg*.2015;39(5):1193-201
- ⁶⁷ Chapelle T, Op de Beeck B, Huyghe I, Francque S, Driessen A, Roeyen G et al. Future remnant liver function estimated by combining liver volumetry on magnetic resonance imaging with total liver function on (99m)Tc-mebrofenin hepatobiliary scintigraphy: can this tool predict post-hepatectomy liver failure? *HPB (Oxford)*;18(6):494-503
- ⁶⁸ Pauta M, Rotllan N, Fernandez-Hernando A, Langhi C, Ribera J, Lu M et al. Akt-mediated foxo1 inhibition is required for liver regeneration. *Hepatology*.2016 ;63(5) :1660-74

-
- ⁶⁹ Margonis GA, Amini N, Buettner S, Besharati S, Kim Y, Sobhani F et al. Impact of early postoperative platelet count on volumetric liver gain and perioperative outcomes after major liver resection. *Br J Surg*.2016;103(7):899-907
- ⁷⁰ Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature*.2010;468(7321):310-5
- ⁷¹ Ninomiya M, Shirabe K, Terashi T, Ijichi H, Yonemura Y, Harada N et al. Deceleration of regenerative response improves the outcome of rat with massive hepatectomy. *Am J Transplant*.2010;10:1580-87
- ⁷² Tautenhahn HM, Bruckner S, Baumann S, Winkler S, Otto W, von Bergen M et al. Attenuation of postoperative liver failure by mesenchymal stem cell treatment due to metabolic implications. *Ann Surg*.2016;263(3):546-56
- ⁷³ Ochoa-Ruiz E, Diaz-Ruiz R. Anaplerosis in cancer : another step beyond the Warburg effet. *Am J Mol Biol*.2012;2:291-303
- ⁷⁴ Guido C, Whitaker-Menezes D, Capparelli C, Balliet R, Lin Z, Pestell RG et al. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF-b drives tumor growth. *Cell Cycle*.2012;11:3019-35
- ⁷⁵ Yang Z, Matteson EL, Goronzy JJ, Weyand CM. T-cell metabolism in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther*.2015;17:29:doi:10.1186/s13075-015-0542-4
- ⁷⁶ Parks SJ, Lee SA, Prasain N, Bae D, Kang H, Ha T et al. Metabolome profiling of partial and fully reprogrammed induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*.2017;26(10):734-742
- ⁷⁷ Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R, Brooke-Smith M, Crawford M, Adam R et al. Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery*.2011;149(5):713-24
- ⁷⁸ Fowler FC, Banks RK, Mailliard ME. Characterization of sodium-dependent amino acid transport activity during liver regeneration. *Hepatology*.1992;16(5):1187-94
- ⁷⁹ Brand HS, Deutz NE, Meiter AJ, Joming GG, Chalumeau RA. In vivo amino acid fluxes in regenerating liver after two-thirds hepatectomy in the rat? *J Hepatol*. 1995;23(3):333-40
- ⁸⁰ Seglen PO. DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival. *Cell Biol Toxicol*.1997;13:301-15
- ⁸¹ Vibert E, Boleslawski E, Cosse C, Adam R, Castaing D, Cherqui D, et al. Arterial lactate concentration at the end of an elective hepatectomy is an early predictor of the postoperative course and a potential surrogate of intraoperative events. *Ann Surg*.2015;262(5):787-92
- ⁸² Wires ES, Trychta KA, Back S, Sulima A, Rice KC, Harvey BK. High fat diet disrupts endoplasmic reticulum calcium homeostasis in the rat liver. *J Hepatol*, 2017;doi:10.1016/j.hep.2017.05.023
- ⁸³ Manekeller S, Seinsche A, Sioutis M, Hirner A. Extended liver resection after preoperative chemotherapy: influence on regeneration and endoplasmic reticulum stress response. *Langenbecks Arch Surg*.2009;394(4):681-8
- ⁸⁴ Shimada M, Yanaga K, Higashi H, Makowka L, Kakizoe S, Starzl TE. Pretransplant assessment of human liver graft by plasma lecithin:cholesterol acyltransferase (LACT) activity in multiple organ donors. *Transpl Int*.1992;5(1):27-30
- ⁸⁵ Lee CF, Lo YC, Cheng CH, Furtmüller GJ, Oh B, Andrade-Oliveira V et al. Preventing allograft rejection by targeting immune metabolism. *Cell Rep*.2015;13(4):760-70

-
- ⁸⁶ Jeschke MG, Abdullahi A, Burnett M, Rehou S, Stanojcic M. Glucose control in severely burned patients using metformin: an interim safety and efficacy analysis of a phase II randomized controlled trial. *Ann Surg.*2016;264(3):518-27
- ⁸⁷ Ben Mosbah I, Duval H, Mbatchi SF, Ribault C, Grandadam S, Pajaud J et al. Intermittent selective clamping improves rat liver regeneration by attenuating oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Dis.*2014;doi:10.1038/cddis.2014.65
- ⁸⁸ Mokham K, Darnis B, Schimtt Z, Duperret S, Ducerf C, Mabrut Y. Successful modulation of portal inflow by somatostatin in a porcine model of small-for-size syndrome. *Am J Surg.*2016;212(2):321-6
- ⁸⁹ Zhenggui D, Yongjie Z, Xufeng L, Lei L, Changli L, Li L et al. Octreotide prevents liver failure through upregulating 5'-methylthioadenosine in extended hepatectomized rats. *Liver Int.*2016;36:212-222
- ⁹⁰ Bucur PO, Bekheit M, Audebert C, Othman A, Hammad S, Sebah M et al. Modulating portal hemodynamics with vascular ring allows efficient regeneration after partial hepatectomy in a porcine model. *Ann Surg.*2017doi/10.1097/SLA.0000000000002146
- ⁹¹ Vibert E, Pittau G, Gelli M, Cunha SA, Jamot L, Faivre J et al. Actual incidence and long-term consequences of posthepatectomy liver failure after hepatectomy for colorectal liver metastases. *Surgery.*2014;155(1):94-115
- ⁹² Harun N, Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Liver regeneration stimulates tumor metastases. *J Surg Res.* 2007;138(2):284-90
- ⁹³ De Jong KP, Lont HE, Bijma AM, Brouwers MA, de Vries EG, van Veen ML et al. The effect of partial hepatectomy on tumor growth in rats : in vivo and in vitro studies. *Hepatology.* 1995;22:1263-72
- ⁹⁴ Heinrich S, Jochum W, Graf R, Clavien PA. Portal vein ligation and partial hepatectomy differentially influence growth of intrahepatic metastasis and liver regeneration in mice. *J Hepatol.*2006;45(1):35-42
- ⁹⁵ Verrax J, Calderon PB. Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. *Free Radic Biol Med.*2009;47(1):32-40
- ⁹⁶ Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MM, Prado-Garcia H, Sanchez-Garcia FJ. Lactate contribution to the tumor microenvironment: mechanisms, effects on immune cells and therapeutic relevance. *Front Immunol.*2016;7:52. doi:10.3389/fimmu.2016.00052
- ⁹⁷ Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc C, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology.*2001;33(2):464-70
- ⁹⁸ Tenorio AL, Macedo FI, Miranda LE, Fernandes JL, da Silva CM, Neto OL et al. Survival on waiting liste for liver transplantation before and after intorduction of the model for end-stage liver disease score. *Transplant Proc.*2010 ;42(2):407-11
- ⁹⁹ Croome KP, Marotta P, Wall WJ, Dale C, Chandok N, Hernandez-Alejandro R. Should a lower quality organ go to the least sick patient? Model for end-stage liver disease score and donor risk index as predictors of early allograft dysfunction. *Transpl Proc.* 2012;44(5):1303-6
- ¹⁰⁰ Belghiti J, Noun R, Sauvanet A. Temporary portocaval anastomosis with preservation of caval flow during orthotopic liver transplantation. *Am J Surg.*1995;169(2):277-9
- ¹⁰¹ Pratschke S, Meimarakis G, Bruns CJ, Kaspar M, Prix N, Zchoval R et al. Temporary intraoperative porto-caval shunt: useless or beneficial in piggy back liver transplantation? *Transpl Int;*26(1):90-98
- ¹⁰² Lu D, Xu X, Wang J, Ling Q, Xie H et al. The influence of a contemporaneous portal and hepatic artery revascularization protocol on biliary complications after liver transplantation. *Surgery.*2014;155(1):190-5

-
- ¹⁰³ Seehofer D, Eurich D, Veltzke-Schlieker W, Neuhaus P. Biliary complications after liver transplantation: old problems and new solutions. *Am J Transplant.*2013;13(2):253-65
- ¹⁰⁴ Op den Dries S, Westerkamp AC, Karimian N, Gouw AS, Bruinsma AG et al. Injury to peribiliary glands and vascular plexus before liver transplantation predicts formation of non-anastomotic biliary strictures. *J Hepatol.*2014;60(6):1172-9
- ¹⁰⁵ Buis CI, Geuken E, Visser, DS, Kuipers F, Haagsma EB, Verkade HJ et al. Altered bile composition after liver transplantation is associated with the development of nonanastomotic biliary strictures. *J Hepatol.*2009;50(1):69-79
- ¹⁰⁶ Hodgson R, Christophi C. What determines ageing of the transplanted liver? *HPB (Oxford);*17(3):222-5
- ¹⁰⁷ Barbier L, Cesaretti M, Dondero F, Cauchy F, Khoy-Ear L, Aoyagi T et al. Liver transplantation with older donors: a comparison with younger donors in a context of organ shortage. *Transplantation.*2016;100(11):2410-2415
- ¹⁰⁸ Pais R, Barritt AS, Calmus Y, Scatton O, Runge T, Lebray P et al. NAFLD and liver transplantation: current burden and expected challenges. *J Hepatol.*2016;65(6):1245-57
- ¹⁰⁹ De Graaf EL, Kench J, Dilworth P, Shackel NA, Strasser SI, Joseph D, Pleass H et al. Grade of deceased donor liver macrovesicular steatosis impacts graft and recipient outcomes more than the Donor Risk Index. *J Gastro Hepatol.*2012;27:540-546
- ¹¹⁰ Selzner M, Rüdiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology.*2000;32(6):1280-8
- ¹¹¹ McCormack L, Petrowsky H, Jochum W, Mullhaupt B, Weber M, Clavien PA. Use of severely steatotic grafts in liver transplantation: a matched case-control study. *Ann Surg.*2007;246(6):940-6
- ¹¹² Yersiz H, Lee C, Kaldas FM, Hong JC, Rana A, Schnickel GT et al. Assessment of hepatic steatosis by transplant surgeon and expert pathologist: a prospective, double-blind evaluation of 201 donor livers. *Liver Transpl.*2013;19(4):437-49
- ¹¹³ El-Badry AM, Breitenstein S, Jochum W, Washington K, Paradis V, Rubbia-Brandt L et al. Assessment of hepatic steatosis by expert pathologists: the end of gold standard. *Ann Surg.*2009;250(5):691-7
- ¹¹⁴ European Association for the Study of the Liver. *EASL Clinical Practice Guidelines: Liver Transplantation.* *J Hepatol.*2016;64(2):433-85
- ¹¹⁵ Braat AE, Blok JJ, Putter H, Adam R, Burroughs AK, Rahmel AO et al. The Eurotransplant donor risk index in liver transplantation:ET-DRI. *Am J Transplant.*2012;12(10):2789-96
- ¹¹⁶ Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, Dykstra DM, Punch JD, DeRoy MA et al. Characteristics associated to liver graft failure: the concept of donor risk index. *Am J Transpl.*2006;6:783-790
- ¹¹⁷ www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/92/Chapitre_8.html
- ¹¹⁸ Hems DA, Brosnan JT. Effects of ischemia on content of metabolites in rat liver and kidney in vivo. *Biochem J.* 1970;120(1):105-11
- ¹¹⁹ Burroughs AK, Sabin CA, Rolles K, Delvart V, Karam V, Buckels J et al. 3-month and 12-month mortality after first liver transplant in adults in Europe: predictive models for outcomes. *Lancet.*2006;367(9506):225-32
- ¹²⁰ Chen, *Disease Markers*, 2013
- ¹²¹ Duarte IF, Stanley EG, Holmes E, Lindon JC, Gil AM, Tang H et al. Metabolic assessment of human liver transplants from biopsy samples at the donor and recipient stages using High-resolution Magic angle spinning 1H NMR spectroscopy. *Anal Chem.*2005;77:5570-78

-
- ¹²² Cortes M, Pareja E, Garcia-Canaveras M, Donato T, Montero S, Mir J et al. Metabolomics discloses donor liver biomarkers associated with early allograft dysfunction. *J Hepatol*.2014;
- ¹²³ Emadali A, Muscatelli-Groux B, Delom F, Jenna S, Boismenu D, Sacks DB et al. Proteomic analysis of ischemia-reperfusion injury upon human liver transplantation reveals the protective role of IQGAP1. *Mol Cell Proteom*.2006;5(7):1300-13
- ¹²⁴ Mergental H, Perera MT, Laing RW, Muiesan P, Isaac JR, Smith A, Stephenson BT et al. Transplantation of declined liver allografts following normothermic ex-situ evaluation. *Am J Transpl*.2016;16(11):3235-3245
- ¹²⁵ Schlegel A, Kron P, Dutkowski P. Hypothermic Oxygenated Liver perfusion: basic mechanisms and clinical application. *Curr Transpl Rep*.2015;2(1):52-62
- ¹²⁶ Bruinsma BG, Sridharan GV, Weeder PD, Avruch JH, Saeidi N, Ozer S et al. Metabolic profiling during ex vivo machine perfusion of the human liver. *Sci Rep*.2016;3;6:22415.doi:10.1038/srep22415
- ¹²⁷ Murphy ND, Kodakat SK, Wendon JA, Jooste CA, Muiesan P, Rela M et al. Liver and intestinal lactate metabolism in patients with acute hepatic failure undergoing liver transplantation. *Crit Care Med*.2001.29(11):2111-18
- ¹²⁸ Silva MA, Murphy N, Richards DA, Wigmore SJ, Bramhall SR, Buckels JAC et al. Interstitial lactic acidosis in the graft during organ harvest, cold storage, and reperfusion of human liver allografts predicts subsequent ischemia reperfusion injury. *Transplantation*.2006;82:227-233
- ¹²⁹ Cardoso N, Silva T, Cagnolati D, Freitas T, Mente ED, Basile-Filho A et al. Can joint analysis of postoperative MELD, base excess and blood lactate levels be used as an index of postoperative outcome for patients submitted to liver transplantation ? *Acta Cir Bras*.2013;28 Suppl 1:54-60
- ¹³⁰ Rogatzki MJ, Ferguson BS, Goodwin ML, Gladden LB. Lactate is always the end product of glycolysis. *Front Neurosci*.2015;9:22
- ¹³¹ Chen Y, Mahieu NG, Huang X, Singh M, Crawford PA, Johnson SL et al. Lactate metabolism is associated with mammalian mitochondria. *Nature Chem Biol*.2016;12:937-43
- ¹³² Leone M, Bechis C, Baumstarck K, Ouattara A, Collange O, Augustin P et al. Outcome of acute mesenteric ischemia in intensive care unit: a retrospective multicenter study of 780 cases. *Intensive Care Med*.2015;41(4): 667-76
- ¹³³ Vincenti M, Berhends M, Dang K, Park YH, Hirose R, Blasi-Ibanez A et al. Induction of intestinal ischemia reperfusion injury by portal vein outflow occlusion in rats. *J Gastroenterol*.2010;45(11):1103-10
- ¹³⁴ Jiang W, Wu N, Wang X, Chi Y, Zhang Y, Qiu X et al. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*.2015;5:8096
- ¹³⁵ Kahlert S, Junnikkala S, Renner L, Hynonen U, Hartig R, Nossol C et al. Physiological concentration of exogenous lactate reduces antimycin A triggered oxidative stress in intestinal epithelial cell line IPEC-A and IPEC-J2 In vitro. *Plos One*. 2016.doi:10.1371/journal.pone.0153135
- ¹³⁶ Edmark C, McPhail MJ, Bell M, Whitehouse T, Wendon J, Christopher KB. LIFe: a liver injury score to predict outcome in critically ill patients. *Intensive Care Med*.2016;42(3):361-9
- ¹³⁷ Tapia P, Soto D, Bruhn A, Alegria L, Jarufe N, Luengo C et al. Impairment of exogenous lactate clearance in experimental hyperdynamic septic shock is not related to total liver hypoperfusion. *Critical Care*.2015;19:188-94

-
- ¹³⁸ Draoua M, Titze N, Gupta A, Fernandez HT, Ramsaw M, Saracino G, McKenna G et al. Significance of measured intraoperative portal vein flows after thrombectomy in deceased donor liver transplantations with portal vein thrombosis. *Liver Transpl.*2017;23(8):1032-39
- ¹³⁹ Ogura Y, Hori T, Uemoto S. Intentional portal pressure control is key to improving the outcome of living donor liver transplantation: the Kyoto University Hospital experience. *Clin Transpl.*2008;143-9
- ¹⁴⁰ Golse N, Bucur PO, Faitot F, Bekheit M, Pittau G, Ciacio O, et al. Spontaneous splenorenal shunt in liver transplantation: results of left renal vein ligation versus splenectomy. *Transplantation.*2015;99(12):2576-85
- ¹⁴¹ Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, White MB, Monteith P et al. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J Hepatol.*2014;60(5):940-7
- ¹⁴² Fatou B, Fautemont P, Leblanc E, Vinatier D, Mesdaq V, Wisztorki M et al. In vivo real-time mass spectrometry for guided surgery application. *Sci Rep.*2016;6.doi:10.1038/srep25919
- ¹⁴³ Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A et al. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.*2008;359(19):1995-2004

Communications en congrès international :

Faitot F, Battini S, Ruhland E, Besch C, Addeo P, Bachellier P, Namer IJ. Extemporaneous HR-MAS-NMR metabolomic profiling of back-table liver grafts predicts early allograft dysfunction. *American Association for the Study Liver Disease*, Boston, Novembre 2016 ; Poster 1378

Faitot F, Lebas B, Besch C, Addeo P, Lehmann C, Pottecher T, Diemunsch P, Bachellier P. Significance of lactate production during liver transplantation: look at the gut rather than the liver. *International Liver Transplantation Society*, Prague, Mai 2017 ; Poster 149

Faitot F, Battini S, Besch C, Ruhland E, Addeo P, Woehl-Jaeglé ML, Ellero B, Bachellier P, Namer IJ. Cost of metabolic adaptation in liver transplantation: guiding donor-recipient matching through real-time metabolomics. *International Association of Surgery and Gastroenterology*, Lyon, Novembre 2017

Communication en congrès national :

Faitot F, Besch C, Felli E, Nappo G, Onea M, Addeo P, Bachellier P, Namer IJ. Intérêt de la métabolomique dans l'évaluation du greffon hépatique. *Association de Chirurgie Hépato-Biliaire et Transplantation-Société Francophone de Chirurgie Digestive*, Décembre 2016 ; Poster 76

Publications soumise ou en cours de soumission :

- *Cost of metabolic adaptation in liver transplantation: guiding donor-recipient matching through realtime metabolomics*

Faitot F^{1,2}, Battini S², Besch C¹, Ruhland E², Onea M³, Addeo P¹, Woehl-Jaeglé ML¹, Ellero B¹, Bachellier P¹, Namer IJ^{2,4} - *J Hepatol* (revision required)

- *Liver metabolomics after major hepatectomy : a further step in understanding liver failure*

Faitot F^{1,2}, Addeo P¹, Ruhland E², Oncioiu C¹, Besch C¹, Battini S², Bachellier P¹, Namer IJ^{2,3} – *Ann Surg* (submitted)

- *The underestimated impact of ischemia-reperfusion-induced remote organ injuries on long-term outcomes of liver transplantation*

Faitot F^{1,3}, Besch C¹, Lebas B², Addeo P¹, Ellero B¹, Woehl-Jaegle ML¹, Namer IJ^{3,4}, Bachellier P¹, Freys G² – *Transplantation* (submitted)

- *Lactates and liver transplantation: origin and consequences of hyperlactatemia*

Faitot F, Lebas B, Besch C, Addeo P, Ruimy A, Bachellier P, Lehmann C, Namer IJ, Diemunsch P (en cours de rédaction)

- *From histological to subcellular changes: implication of metabolism in posthepatectomy liver failure at different biological levels.*

Faitot F, Namer IJ, Bachellier P (en cours de rédaction)

Annexe 1

1 Cost of metabolic adaptation in liver transplantation: guiding donor-recipient matching through real-
2 time metabolomics

3 Francois Faitot^{1,2}, Stephanie Battini², Camille Besch¹, Elisa Ruhland², Mihaela Onea³, Pietro Addeo¹,
4 Marie-Lorraine Woehl-Jaeglé¹, Bernard Ellero¹, Philippe Bachellier¹, Izzie-Jacques Namer^{2,4}

5
6
7 Hepatobiliopancreatic Surgery and Transplantation Department, Hopital de HautePierre, CHU de
8 Strasbourg, France

9 ² Laboratoire ICube, UMR7357, University of Strasbourg, France

10 ³ Pathology Department, Hopital de HautePierre, CHU de Strasbourg, France

11 ⁴ Nuclear Medicine Department, Hôpital de HautePierre, CHU de Strasbourg, France

12
13 *Corresponding author* : Pr IJ Namer, Nuclear Medicine Department, CHU Strasbourg ; ICube
14 laboratory, UMR7357, University of Strasbourg ; phone +3388128650; fax : +338127286 ; [izzie-
jacques.namer@chru-strasbourg.fr](mailto:izzie-jacques.namer@chru-strasbourg.fr)

15 Electronic word count: 4637 words

16 Number of figure = 5 ; Number of tables = 2

17 Keywords : liver transplantation; metabolomics; lactate; early allograft dysfunction

18 *Abbreviations*

19 HR-MAS-NMR : high-resolution magic-angle-spinning nuclear magnetic resonance

20 ECD : extended criteria donor

21 DCD : donor in cardiac death

22 DRI : donor risk index

23 EAD : early allograft dysfunction

24 GPC : glycerolphosphocholine

25 ER : endoplasmic reticulum

26 Conflict of interest : the authors declare no conflict of interest and no financial disclosures regarding the

Abstract

1 The purpose of this study was to evaluate the potential value of high-resolution magic-angle-spinning
2 nuclear magnetic resonance (HR-MAS-NMR) metabolomic analysis of native liver and back-table
3 biopsies for the prediction of early allograft dysfunction and donor-recipient matching. Indeed there
4 is an emerging need to assess the metabolic state of liver allograft especially in the novel setting of
5 machine perfusion preservation. HR-MAS-NMR could be a useful tool in this setting as it can
6 extemporaneously provide untargeted metabolic profile. In order to validate this method, the
7 metabolic profiles obtained by HR-MAS-NMR of back-table biopsies were compared according to the
8 presence of early allograft dysfunction. The identification and quantification of differentially
9 expressed metabolites showed that intragraft lactate level $>8\text{mmol/g}$ and phosphocholine content
10 $>0.646\text{ mmol/g}$ were significantly associated with graft dysfunction with an excellent accuracy
11 ($\text{AUROC}_{\text{lactates}}=0.906$; IC95% 0.813-0.999) and $\text{AUROC}_{\text{phosphocholine}}=0.816$ (IC95% 0.679-0.954)). A graft metabolic score
12 was designed to predict early graft function. Metabolic profiles from native livers from sarcopenic
13 patients, who experience higher morbidity, showed opposite content in lactate and
14 glycerophosphocholine. In sarcopenic patients, the risk of EAD was significantly higher when
15 transplanting a graft exerting high risk graft metabolic score.
16

17 This study underlines the cost of metabolic adaptation identifying lactate and choline-derived
18 metabolites as predictors of poor graft function in both native livers and liver grafts. Moreover HR-
19 MAS-NMR seems a valid technique to evaluate the quality of a graft and the consequences of cold
20 ischemia on the graft and could thus be used to assess the efficiency of graft resuscitation on
21 machine perfusion in future studies.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

Introduction

1 Liver transplantation is a life-saving procedure for patients with end-stage liver disease and a
2 potentially curative treatment of hepatocellular carcinoma. The major limitation for liver
3 transplantation is the current organ shortage due to an increasing discrepancy between indications
4 and a stable donor pool. In an attempt to answer to the issue of increased number of patients in the
5 waiting lists, many teams have extended the criteria for acceptance of liver grafts. Although there is
6 hardly a wide consensus on its definition, extended criteria donors (ECD) represent a growing
7 proportion of the harvested donors. Many donor factors have been reported as influencing the
8 outcome of liver transplantation mainly age¹, steatosis^{2,3} and cold ischemia time⁴. Even though
9 increasing the pool of donors, the use of ECD, particularly DCD, may be associated to higher graft
10 loss⁵ or increased risk of vascular and biliary complications.^{6,7} Indeed the tolerance of allograft to cold
11 ischemia-reperfusion injury is altered in ECD allografts.^{8,9}

12
13 Donor-recipient matching is of utmost importance in this setting. MELD score and life-support
14 therapies have been identified as significant recipient factors that alter results, specifically when
15 using extended criteria donor. The BAR score is an example of application of such donor-recipient
16 matching. Additionally the addition of graft steatosis in the score further enhances the accuracy of
17 BAR score.¹⁰

18
19 Among significant factors impacting early outcomes after liver transplantation, sarcopenia and portal
20 hypertension have been increasingly studied in the last years. Both are probably linked as ascites is
21 often associated to malnutrition and portal hypertension may be a surrogate of long-term evolving
22 cirrhosis. Sarcopenia may be a marker of significant metabolic shift and there are currently no clear
23 data on differentially expressed metabolites in the liver of cirrhotic sarcopenic patients.

24
25 There is currently a lack of effective tools and biomarkers to evaluate the liver grafts before
26 implantation. Liver biopsies with fibrosis and steatosis assessment may be informative¹¹ but do not
27 take in consideration the metabolic insults due to static cold storage. Interpretation of frozen section
28 biopsies can be confusing and mislead the decision of going forward with a marginal graft.¹² In order
29 to further extend and enhance the quality of the grafts, machine perfusion is currently under intense
30 evaluation for liver grafts.^{13,14,15} The benefit of dynamic cold storage has been demonstrated in
31 kidney transplantation¹⁶ and a growing set of data are supporting its use in liver transplantation. The
32 data available tend to show efficient “resuscitation” of ECD grafts especially steatotic grafts.^{17,18}

33
34 Metabolomics is an emerging area in the omics field consisting in the simultaneous evaluation of
35 cellular metabolic products on liquid or solid phase. NMR spectroscopy metabolomics has already
36 been applied in the field of liver transplantation¹⁹ but only mass spectroscopy has shown to be

1 predictive of allograft dysfunction²⁰. Whereas many metabolomic methods are not relevant for
2 clinical practice because they need complex sample handling and long treatment time, 1H high-
3 resolution magic-angle-spinning nuclear magnetic resonance (1H HR-MAS NMR) spectroscopy is an
4 attractive solution. Metabolomic profile of solid fresh frozen biopsy may be obtained in a short
5 period of time without destruction of the sample thus enabling further classical histopathological
6 evaluation.

7 The goal of this study was to evaluate the potential value of 1H HR-MAS NMR metabolomics in a
8 clinical setting and eventually identify biomarkers in the graft and in the native liver to predict early
9 outcomes after liver transplantation. The main hypothesis was that liver allograft exerts significant
10 metabolic derangements that depend on each allograft capacity to cope with cold ischemia. At the
11 early stages of reperfusion, the allograft is exposed to significant changes in metabolism themselves
12 depending on the metabolic state of the recipient. Metabolic donor-recipient matching may be a
13 novel way of looking at early graft function.

Material and methods

1 This study included patients transplanted between December 2014 and December 2016 who
2 responded to the following criteria: first liver transplantation, absence of early vascular
3 complications, available snap-frozen biopsy within less than 5 minutes after realization of the biopsy,
4 available histopathological analysis of the specimen, available biological and clinical data and
5 informed consent from the patient. This study was approved by the local ethical committee.

6
7 Back-table biopsies are routinely realized at the beginning of the back-table in our center without
8 selection criteria according to the donor characteristics but only biopsies that were rapidly snap-
9 frozen in nitrogen were analyzed in order to avoid metabolic changes due to ischemia. A biopsy from
10 the native liver was also harvested just after portal clamping.

11 All donors were brain dead donors harvested according to a classical technique.²¹ Portal cannulation
12 with washing was always realized using Ringer-lactate before clamping and dual arterial and portal
13 washing was achieved with various conservation liquids.

14
15 Histopathological analysis were realized on the sample analyzed in spectroscopy to take in
16 consideration zonal variations of necrosis, fibrosis and steatosis.

17
18 Extended criteria donors were defined according to the EASL guidelines²² as the donor-risk index
19 (DRI) is not adapted to the liver transplantation organization in France.

20 Liver recipients were listed on the French national list after complete pre-transplantation evaluation.
21 Indication, presence of hepatocellular carcinoma and lab-MELD at listing and at transplantation are
22 reported.

23 Endpoint definition

24
25 Early allograft dysfunction (EAD) was defined according to the Olthoff's criteria²³, namely bilirubin \geq
26 170 μ mol/L at day 7, INR \geq 1.6 at day 7 and peak transaminases \geq 2000 within the 7 first postoperative
27 days, in the absence of technical causes.

28
29 Sarcopenia was defined as low psoas surface as defined by Golse et al according to the psoas
30 surface.²⁴

31 Metabolomic study

32
33 Samples were prepared in a -20°C environment. 15 to 20mg of tissue were punched-biopsied from
34 the specimen. Deuterium oxide (8 μ L) with 0.75 weight percent 2,2,3,3-D₄-3-(trimethylsilyl) propionic
35 acid was added for chemical shift reference for NMR spectrometer.

1 HRMAS analysis was achieved on a Bruker Avance III 500 spectrometer operating at a proton
2 frequency of 500.13MHz and equipped with a 4mm triple resonance gradient HR-MAS probe. The
3 analysis was conducted at -80°C after placing the insert in a 4mm ZrO₂ rotor.

4 A one-dimensional (1D) proton spectrum using Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence
5 and 128 transients was acquired for each tissue sample. Free induction decay were multiplied by an
6 exponential window function of 0.3Hz prior to Fourier transformation and were corrected for phase
7 and baseline distortion using TopSpin 3.2 (Bruker GmbH, Germany). The chemical shift was
8 calibrated to the peak of the methyl proton of L-lactate at 1.33ppm.

9 In order to confirm resonance assignments, two-dimensional (2D) heteronuclear experiments were
10 recorded immediately after the end of 1D spectra acquisition for 4 representative samples. Spectra
11 were referenced by setting lactate doublet chemical shift to 1.33ppm in proton dimension and
12 22.70ppm in carbon dimension. Metabolites were assigned using standard metabolites chemical shift
13 tables available in the literature.

14
15 Metabolite quantification was performed using an external reference standard of lactate (3 μ mol),
16 scanned under the same analytical conditions. Spectra were normalized according to sample weight.
17 Peaks of interest were automatically defined by an in-house program using Matlab 7.0 (Mathwork,
18 Natick, USA). Peak integration was then compared to the one obtained with the lactate reference and
19 were corrected according to the number of protons. Only well-defined peaks with no overlapping in
20 the 1D CPMG spectra were selected for quantification.

21 Statistical analysis

22
23 Continuous variables are expressed as mean \pm standard deviation. Student t-test or Mann-Whitney U
24 test were used to compare the means between groups as appropriate. Categorical variables are
25 expressed as number and percentage. Chi-2 test was used to compare the distribution of categorical
26 variables between groups. Spearman's test was performed to determine correlation between
27 variables. These statistical analysis were performed using Statview software (USA)

28
29 Receiving Operating Characteristics (ROC) curves were constructed to evaluate the value of identified
30 metabolic biomarkers and to identify the best cutoff for these variables. SPSS software was used for
31 this analysis.

32 Statistical analysis for metabolomics study

33
34 PCA (Principal Component Analysis) was performed to evaluate whether metabolic profile
35 differentiated groups of patients. The 2 measurements of model quality were R²_y and Q²_y

representing the accuracy of fit (ie data variation) and accuracy of prediction respectively. $Q^2 \geq 0.5$ was considered as a good predictor.

Network analysis

Algorithm to Determine Expected Metabolite Level Alterations Using Mutual Information (ADEMA) was applied on metabolite quantification values. The network was constructed using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes and Selway's work using the following pathways : glucose / lactate ; glucose / ascorbate / glutathione / glutamate ; glucose / alanine / valine / isoleucine ; choline / glycerophosphocholine / phosphocholine / total choline.

Design of the study

The value of metabolomic profiling using HR-MAS-NMR was evaluated on a set of 42 liver grafts at the time of ex vivo preparation and 36 native livers. PCA was used to compare metabolic profiles according to the occurrence of EAD, MELD > 15 or sarcopenia. Network analysis was conducted to identify differentially expressed metabolites between the groups. Optimal cut-off values for the most accurate biomarkers were then defined. A liver graft metabolic score (GMS) using these parameters was calculated. In a second step, this score was evaluated for prediction of EAD and one-year graft loss. Predictive factors for high metabolite levels were searched to define extended criteria donors using available clinical datas from the donor chart.

Results

Population

There were 42 available biopsies for the analysis. As shown in table 1, there were 69% of extended criteria donors according to EASL. Median donor age was 56.5 (21-81). Regarding recipients, there were 33% (n=14) with very high MELD (>35) and 15% were transplanted while in ICU. The main indication was alcohol cirrhosis (62%) followed by HCV and metabolic cirrhosis.

The incidence of EAD was 17% in the whole population and 21% in the ECD. The 90-day mortality was 4%.

Metabolomic analyses were realized in a median time of 25 minutes and quantification of metabolites could be obtained in 10 minutes.

Metabolomic profile from ex vivo liver graft predicts EAD

Metabolomic profile were significantly different between ex vivo biopsies of liver grafts presenting EAD versus no EAD ($Q^2=0.573$, $R^2y=0.697$) (Figure 1). Of note cold ischemia time > 6h was not associated to a significantly different metabolic profile.

Metabolomic study identifies potential biomarkers of EAD

The network analysis showed higher lactate, glutamate, glutamine, alanine, valine, isoleucine and choline derivatives concentration in EAD grafts. There was no change in glucose, ascorbate or GSH levels (Figure 2).

Quantification showed that grafts presenting EAD had significantly higher lactate level ($p<0.0001$), phosphocholine ($p=0.006$) and taurine levels ($p=0.011$).

Among the identified metabolites, only lactate and phosphocholine showed high accuracy for predicting EAD. ROC curve analysis showed an excellent predicting value of intragraft lactate level (AUROC=0.906; IC95% 0.813-0.999) (Figure 3a). The optimal threshold was 8.3mmol/g predicting EAD with a 100% sensitivity and 80% specificity. Similarly AUROC for phosphocholine was 0.816 (IC95% 0.679-0.954) and a threshold of 0.65mmol/g gave an 86% sensibility and 80% specificity (Figure 3b).

Predicting factors and prognostic value for metabolomic-defined extended criteria donor (MD-ECD)

A metabolomic-defined extended criteria donor (MD-ECD) could be defined by the association of high lactate and high phosphocholine levels at the time of ex vivo preparation. None of the donor

1 characteristics predicted MD-ECD . even the degree of macroscopic steatosis. Neither cold ischemia
2 time nor preservation solution were associated to MD-ECD.

3 MD-ECD were associated to a 63% risk of EAD. Most interestingly, MD-ECD recipients had a
4 significantly higher risk of one-year graft loss (38%) than non MD-ECD (10%) (p=0.037). At
5 reperfusion, MD-ECD had higher level of IL6 (1309 ±333 vs 575 ±108; p=0.014).

6 *Predicting factors of EAD (Table 2)*

7
8 Patients presenting EAD had a significantly higher MELD (37 ±7 vs 25 ±13 ; p=0.014), with higher
9 bilirubin and INR levels, less frequently HCC. Sarcopenia was associated to EAD (p=0.019). Individually
10 none of the donor characteristics predicted EAD except for macrovacuolar steatosis >30% (p=0.002).
11 CIT was not associated to EAD in this population (p=0.57).

12
13 Multivariate analysis for EAD showed that graft lactate content was the only independent predictor
14 of EAD (p=0.046).

15 *Recipient parameters affecting the metabolic profiles*

16
17 Metabolomic profiles from cirrhotic patients were compared according to MELD score, ACLF and
18 presence of sarcopenia. Metabolomic profiles differed only according to presence or absence of
19 sarcopenia (Q²=0.528, R²_y=0.783).

20
21 Network analysis showed a lower level of lactate and glycerophosphocholine but a significantly
22 higher level of choline, neoglucogenic amino acids and ethanolamine. Using ROC curve analysis, only
23 low glycerophosphocholine <0.556mmol/g was an accurate biom arker (AUROC=0.812). (Figure 4)

24 *Metabolomic profile from native liver do not predict EAD*

25
26 Metabolomic profile from native liver were not significantly different between patients presenting
27 EAD versus no EAD (Q²=0.296, R²_y=0.629).

28 *Donor-recipient matching according to MD-ECD*

29
30 Given its significant impact on liver metabolic profile, sarcopenia was used as a major determinant
31 for donor-recipient matching. Use of MD-ECD in a sarcopenic patient was associated with a 100% risk
32 of EAD whereas as non MD-ECD in non sarcopenic patient was associated to no risk of EAD. Most
33 interestingly, EAD was more common in sarcopenic recipients of phosphocholine -poor donors
34 underlining the metabolic cost of graft adaptation. (Figure 5)

Discussion

1 Evaluation of graft quality is a highly complex daily task for transplant team as many factors come in
2 the equation. Metabolic biomarkers have merely been evaluated but may present the unique
3 advantage of informing on the cellular state and function. This study demonstrates that
4 metabolomics using HR-MAS-NMR is efficient in predicting early allograft dysfunction and is
5 applicable to a daily clinical practice.
6

7 The predictive value of metabolomics study of liver grafts has already been shown in a previous study
8 using mass spectroscopy.¹⁶ HR-MAS-NMR presents the advantage of being easily applicable in the
9 clinical setting and the data from this study support its use in a clinical setting

10 One of the main findings of this study was to show that lactate content is highly predictable of EAD as
11 soon as during back-table preparation. Given the 0.906 AUROC, lactate content is one of the most
12 powerful reported biomarker for prediction of early graft outcome. Indeed even established scores
13 using both donor and recipient parameters do not achieve such accuracy. For instance, BAR
14 score achieves a c-statistic of 0.7.²⁵ Although adding the degree of macrovacuolar steatosis increases
15 the accuracy, the simple measure available at the time of back-table preparation of lactate content is
16 at least as powerful as modified BAR score.
17

18 The high level of lactate is mainly due to anaerobic metabolism that takes place during cold ischemia.
19 It may be a marker of graft tolerance to the static cold storage and underlines the impact of
20 mitochondrial dysfunction during this phase. Recent works have shown the beneficial impact of
21 oxygenation on mitochondrial function in liver perfused grafts.²⁶ In mammalian cells, lactate
22 represent the end product of anaerobic glycolysis explaining the significant impact of this metabolite
23 as a predictive biomarker for liver dysfunction. High lactate levels induce local acidosis and may act
24 as Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP) leading to exacerbated inflammatory response at
25 reperfusion.²⁷ Furthermore intracellular acidosis and cold storage may lead to imbalance in the
26 protein turnover^{28,29} that lead to vital protein destruction and enzymatic inhibition that will block the
27 reconstitution of ATP reserve after reperfusion. Systemic lactate clearance within the 24 hours after
28 liver transplantation is a marker of graft function.³⁰ The lactate content in the graft should be
29 distinguished from excreted lactates which are measured in the effluent. As well shown by another
30 metabolomic study on machine perfused grafts, lactate effluent may be low even in case of high
31 intragraft content.
32

33 Glutamine is the most important amino acid in the body applying major roles in gut integrity,
34 immune system viability as it can serve as energy fuel through the production of α -ketoglutarate,
35 one of the components of Krebs's cycle. It is also the main carrier of ammonium. Glutamate is the
36

intermediate metabolite between glutamine and α -ketoglutarate. Elevation of glutamate has already been reported in metabolomics studies of cirrhotic livers according to the stage of liver fibrosis, necroinflammatory activity and steatosis³¹ as well as in circulating blood of diabetic patients³². In hibernating animals, high glutamine levels are observed during the hypothermic torpor period and is seen as a metabolic adaptation for the storage of nitrogen. Indeed period of hypothermic ischemia, urea cycle is inhibited thus limiting the capacity to eliminate ammonia.³³ Regulation of the glutamine-glutamate axis is not fully described but data have shown that it is dependent on the response to steroids.³⁴

Phospholipid metabolism is highly impaired during ischemia. The formation of “blebs” in ischemic livers is a well described phenomenon preceding membrane rupture and cell destruction due to ATP depletion.³⁵ The differential concentration of choline-derivatives emphasizes the major impact of membrane turnover in liver grafts submitted to ischemia. Phosphocholine derives from choline and is transformed in endoplasmic reticulum (ER) in GPC. High phosphocholine may be a marker of ER stress. GPC has already been shown to decrease during the different stages of liver transplantation from harvesting to reperfusion.¹⁵ GPC has also been reported as protective against microvascular alterations in rat models of ischemia.³⁶ Choline deficiency represents a model of liver disease and specifically in metabolic and steatotic disease.³⁷ In mice with choline deficiency, tolerance to hepatectomy is reduced and inflammatory response has been reported to be increased.³⁸

The second highlight of this study is to show the significant cost of metabolic adaptation in high risk patients. Sarcopenia is now a recognized risk factor for poor LT outcomes. Sarcopenia is a marker of long-term evolving cirrhosis and is often associated to portal hypertension and ascites. It is a sign of late metabolic adaptation in the cirrhotic patient when the liver metabolism has switched to lactate use from the muscle according to the Cori cycle. It has been well shown that end-stage liver disease is associated to a metabolic shift whatever the cause of cirrhosis. There are now studies showing the significant difference of metabolic profiles between fibrotic, compensated cirrhotic and decompensated cirrhotic livers. Although the difference in metabolic profiles between sarcopenic and non sarcopenic patients is not surprising, the striking finding of this study was that lactate and choline derivatives are decreased in sarcopenic patients even in case of low MELD.

When using the graft metabolic score, it becomes obvious that donor-recipient matching is particularly important in a cirrhotic population. Although we identify sarcopenic patients in this study, other clinical parameters may be associated to low GPC and lactate. In this population, the use of MD-ECD leads to a significant need for metabolic adaptation for the liver graft. The cost of

1 metabolic adaptation may explain early graft poor function that is otherwise poorly explained by the
2 routinely used clinical and biological parameters.

3 The main limitation of this study may be that early allograft dysfunction should not necessarily lead
4 to refusing a liver graft. Although it is associated to long-term results, the life-saving place of liver
5 transplantation may lead to overcome this point. Although the rate of donors exerting extended
6 criteria as defined by EASL was quite high, the rate of severely steatotic livers was low in this series.
7 One could question the significant impact of the 2 steatotic liver donors on metabolic profiles as they
8 both experienced EAD. An additional analysis confirmed the data even after exclusion of these two
9 donors with an even high AUROC for lactate of 0.936. Unfortunately it is not possible to identify
10 steatotic livers with favorable metabolic profiles. Indeed the literature has shown a significantly
11 higher rate of EAD in severely steatotic livers but “only” 40% exert EAD and recent studies have
12 confirmed good results with steatotic livers when recipient is well selected.

13 In the clinical practice, the back-table time seems the most appropriate time for the study as it takes
14 in consideration the impact of cold ischemia on the graft but leaves sufficient time to change strategy
15 in case of major metabolic abnormalities on the profile. We advocate the use of HR-MAS-NMR
16 metabolomics to evaluate the quality of liver graft after cold storage. In case of favorable metabolic
17 profile, liver transplantation could be safely realized even in case of criteria of ECD. In case of
18 significant metabolic derangements identified by HR-MA-NMR, the use of machine perfusion could
19 be indicated as there is a significantly higher risk of one-year graft loss. Most importantly the use of
20 lactate- and phosphocholine-rich patients in sarcopenic recipients and more generally in cirrhotic
21 patients exerting advanced stage metabolic derangements should be avoided as it leads to significant
22 graft failure. Metabolomics profiling may be a future way of evaluating the efficiency of graft
23 resuscitation on machine perfusion.
24

Disclosures :

1 The authors of this manuscript have no conflicts of interest to

2
3
4 Legends of figures

5 **Figure 1: PCA analysis comparing metabolic profiles of back-table liver allograft biopsies in patients**
6 **experiencing (black dots ; n=7) or not (white dots ; n=35) early allograft dysfunction .** This analysis
7 shows a clear distinction of metabolic profiles between the 2 groups ($Q^2 > 0,5$)

8
9 **Figure 2 : Network analysis (ADEMA) showing independent variations of significant metabolites in**
10 **univariate analysis for EAD.** A significant increase in lactate, choline derivatives, taurine and
11 neoglucogenic amino acids are observed in EAD allograft during back-table.

12 **Figure 3: ROC curve analysis showing the sensibility and specificity of intragraft lactate and**
13 **phosphocholine content quantified by 1H-HR-MAS-NMR.** AUROC is excellent for lactate content
14 (AUROC=0.906) and good for phosphocholine content (AUROC=0.816).

15
16 **Figure 4: Network analysis (ADEMA) showing independent variations of significant metabolites in**
17 **univariate analysis for sarcopenia in native livers.** A significant decrease in lactate and
18 glycerophosphocholine with concomitant increase in neoglucogenic amino acids and ethanolamine is
19 observed in sarcopenic native liver grafts.

20
21 **Figure 5: Rate of EAD according to the metabolic profile of the graft.** The population was evaluated
22 as a whole (n=42) or according to the presence (dark blocks) or not (light grey blocks) of sarcopenia.
23 This graph shows the significant impact of metabolic donor-recipient matching as use of lactate
24 and/or phosphocholine rich-liver grafts in sarcopenic patients who exert low lactate and
25 glycerophosphocholine content is associated to a growing risk of EAD.

References

- 1
2 _____¹ Ghinolfi D, Marti J, De Simone P et al. Use of octogenarian donors for liver
3 transplantation : a survival analysis. *Am J Transplant* 2014;14(9):2062-71
- 4
5 ² Dutkowski P, Schlegel A, Slankamenac K et al. The use of fatty liver grafts in modern allocation systems; risk
6 assessment by the balance of risk (BAR)score. *Ann Surg* 2012;256:861-869
- 7
8 ³ Chu MJ, Dare AJ, Phillips AR et al. Donor hepatic steatosis and outcome after liver transplantation. *J*
9 *Gastrointest Surg* 2015;19(9):1713-24
- 10
11 ⁴ Burroughs AK, Sabin CA, Rolles K, et al. 3-month and 12-month mortality after first liver transplant in adults
12 in Europe: predictive models for outcome. *Lancet* 2006; 367:225.
- 13
14 ⁵ Gruttadauria S, Vizzini G, Biondo D et al. Critical use of Extended Criteria Donor Liver grafts in adult-to-adult
15 whole liver transplantation : a single-center experience. *Liver Transpl* 2008;14(2):220-227
- 16
17 ⁶ Renz JF, Kin C, Kinkhabwala M et al. Utilization of Extended Donor Criteria Allografts maximizes donor use and
18 patient access to liver transplantation. *Ann Surg* 2005;242(4):556-63
- 19
20 ⁷ Ghinolfi D, De Simone P, Lai Q et al. Risk analysis of ischemic-type biliary lesions after liver transplant using
21 octogenarian donors. *Liver Transpl* 2016;22(5):588-598
- 22
23 ⁸ Ali JM, Davies SE, Brais RJ et al. Analysis of ischemia/reperfusion injury in time-zero biopsies predicts allograft
24 outcomes. *Liver Transpl* 2015;21(4):487-99
- 25
26 ⁹ Gaffey MJ, Boyd JC, Traweek ST et al. Predictive value of intraoperative biopsies and liver function tests for
27 preservation injury in orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1997;25(1):184-189
- 28
29 ¹⁰ Dutkowski P, Schlegel A, Slankamenac MC et al. The use of fatty liver grafts in modern allocation systems.
30 Risk assessment by the Balance of Risk (BAR) Score. *Ann Surg.*2012;256(5):861-869
- 31
32 ¹¹ Gabrielli M, Moisan F, Vidal M et al. Steatotic livers. Can we use them in OLTX ? Outcome data from a
33 prospective baseline biopsy study. *Ann Hepatol* 2012. 11(6):891-898
- 34
35 ¹² El-Badry AM, Brei tenstein S, Jochum W, et al. Assessment of hepatic steatosis by expert pathologists : the
36 end of a gold standard. *Ann Surg* 2009;250(5):691-697
- 37
38 ¹³ Monbaliu D, Liu Q, Libbrecht L et al. Preserving the morphology and evaluating the quality of liver grafts by
hypothermic machine perfusion : a proof-of-concept study using discarded human livers. *Liver Transpl*
2012;18:1495-1507
- ¹⁴ Bruinsma BG, Yeh H, Ozer S et al. Subnormothermic machine perfusion for ex vivo preservation and recovery
of the human liver for transplantation. *Am J Transpl* 2014;14(6):1400-1409
- ¹⁵ Op den Dries S, Karimian N, Sutton ME et al. Ex vivo normothermic machine perfusion and viability testing of
discarded human donor livers. *Am J Transpl* 2013;13:1327-1335
- ¹⁶ Moers C, Slits JM, Maathuis MHJ et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney
transplantation. *N Eng J Med* 2009;360:7-19
- ¹⁷ Graham JA and Guarrera JV. Resuscitation of marginal liver allografts for transplantation with machine
perfusion technology. *J Hepatol* 2014.61:418-431
- ¹⁸ Okamura Y, Hata K, Tanaka H et al. Impact of subnormothermic machine perfusion preservation in severely
steatotic rat livers : a detailed assessment in isolated setting. *Am J Transpl* 2016;DOI:10.1111/ajt.14110

- 19 Duarte IF, Stanley EG, Holmes E et al. Metabolic assessment of Human Liver Transplants from biopsy samples at the donor and recipient stages using High-resolution Magic angle Spinning 1H NMR spectroscopy. *Ann Chem* 2005;77:5570-5578
- 20 Cortes M, Pareja E, Garcia-Canaveras JC et al. Metabolomics discloses donor liver biomarkers associated with early allograft dysfunction. *J Hepatol* 2014.61(3):564-574
- 21 Memeo R, Le Roy B, Pittau G et al. Personal experience with 150 isolated procurements of liver allografts : two different techniques. *Prog transplant* 2015;25:287-288
- 22 European Association for the study of the liver. EASL Clinical Practice Guidelines : Liver Transplantation. *J Hepatol* 2016;64(2):433-85
- 23 Olthoff KM, Kulik L, Samstein B, Kaminski M, Abecassis M, Emond J, et al. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver Transpl* 2010;16:943-949.
- 24 Golse N, Bucur PO, Ciacio O, Pittau G, Sa Cunha A, Adam R et al. A new definition of sarcopenia in patients undergoing liver transplantation. *Liver Transpl* 2017;23(2):143-154
- 25 Dutkowski P, Oberkofler CE, Slankamenac K et al. Are there better guidelines for allocation in liver transplantation? A novel score targeting justice and utility in the Model for End-stage liver disease era. *Ann Surg* 2011;254:745-753
-
- 26 Van Golen RF, van Gulik TM Heger M. Mechanistic overview of reactive species-induced degradation of the endothelial glycocalyx during hepatic ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(8):1382
- 27 Land WG, Agostinis P, Gasser S, et al. Transplantation and Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs). *Am J Transplant* 2016; 16(12):3322-3337
- 28 Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G15-G26
- 29 Defamie V, Cursio R, Le Brigand K, Moreilhon C, Saint-Paul MC, Laurens M, et al. Gene expression profiling of human liver transplants identifies an early transcriptional signature associated with initial poor graft function. *Am J Transplant* 2008;8:1221-1236.
- 30 Wu JF, Wu RY, Chen J et al. Early lactate clearance is a reliable predictor of initial poor graft function after orthotopic liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2011;10(6):587-592
- 31 Sarfaraz MO, Myers RP, Coffin CS et al. A quantitative metabolomics profiling approach for the non invasive assessment of liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Clin Trans Med* 2016;5:33
- 32 Cheng S, Rhee EP, Larson MG and al. Metabolite Profiling identifies Pathways associated with metabolic risk in humans. *Circulation* 2012;125(18):2222-31
- 33 Lindell SL, Klahn SL, Piazza TM et al. Natural resistance to liver cold ischemia-reperfusion injury associated with the hibernation phenotype. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:473-480
- 34 Abraham I, JuhaszG, Kekesi KA et al. Corticosterone peak is responsible for stress induced elevation of glutamate in the hippocampus. *Stress* 1998. 2 (3):171-181
- 35 Lemasters JJ, Di Giuseppe J, Nieminen AL et al. Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 1987;325:78-81

- ³⁶ Hartmann P, Ngwi F, Garab D et al. L-alpha-GPC reduces the microcirculatory dysfunction and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase type 4 induction after partial hepatic ischemia in rats. *J Surg Res* 2014;32-40
- ³⁷ Lau JKC, Zhang X, Yu J et al. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease:current perspectives and recent advances. *The Journal of pathology* 2016;DOI10.1002/path.4829
- ³⁸ Van der Veen JN, Lingrell S, Gao X et al. Pioglitazone attenuates hepatic inflammation and fibrosis in phosphatidylethanolamine-N-methyl-transferase-deficient mice. *Am J Physiol Gast Liv* 2016;310(7):G526-38

Table 1 : population characteristics

	N=42
<i>Recipient's characteristics</i>	
Age	53 ±12
Male gender	30 (71%)
Indication for transplantation	
Alcoholic	26 (62%)
HCV HBV	5 (12%)
Metabolic	2 (5%)
Fulminant hepatitis	1 (2%)
Hepatocellular carcinoma	12 (29%)
Lab-MELD at listing	26.8 ±12
Lab-MELD at LT	27.1 ±14
Bilirubin at LT (µmol/L)	192 ±33
Creatinin at LT (µmol/L)	83 ±8
INR at LT	2.92 ±2
Sarcopenia	14 (33%)
ACLF	19 (45%)
<i>Donor's characteristics</i>	
Age	57.7 ±18
BMI	26.4 ±6
Diabetes	7 (17%)
Statin use	9 (21%)
Metabolic syndrome	12 (29%)
ASAT / ALAT (UI)	74 ±14 / 72 ±20
Bilirubin (µmol/L)	14 ±11
GGT (UI)	59 ±9
Lactates at harvesting (mmol/L)	1.8 ±1.3
Graft steatosis	
Overall degree of steatosis (%)	2% (0-65)
Extended criteria donor	29 (69%)
<i>Operative data</i>	
Cold ischemia time	453 ±91
Reperfusion syndrome	20 (48%)
Red blood cell transfusion (units)	7 ±1
Fresch frozen plasma (units)	9.5 ±2
Platelets (units)	1.3 ±2

Table 2 : risk factors of early allograft dysfunction in uni- and multivariate analysis

	No EAD N=35	EAD N=7	p univariate	p multi
<i>Recipient's characteristics</i>				
Age	53 ±12	53 ±15	0.885	
Male gender	25 (71%)	5 (71%)	>0.999	
Indication for transplantation				
Alcoholic	23 (66%)	3 (43%)	0.256	
HCV	5 (14%)	0 (0%)	0.287	
			0.638	
Hepatocellular carcinoma	12 (34%)	0 (0%)	0.067	
Lab-MELD at listing	24.7 ±12	37.3 ±7	0.013	
Lab-MELD at LT (uncapped)	24.3 ±13	40.7 ±11	0.003*	0.116
Bilirubin at LT (tmol/L)	162 ±32	337 ±103	0.041	
Creatinin at LT (tmol/L)	83 ±50	81 ±37	0.905	
INR at LT	2.61 ±1	4.37 ±2	0.011	
Sarcopenia	9 (26%)	5 (71%)	0.019*	0.158
<i>Donor's characteristics</i>				
Age	59 ±17	53 ±20	0.421	
BMI	26.7 ±6	24.8 ±6	0.468	
Dia betes	7 (20%)	0 (0%)	0.195	
Statin use	8 (23%)	1 (14%)	0.614	
Metabolic syndrome	11 (31%)	1 (14%)	0.359	
γGT (UI)	55 ±9	82 ±32	0.274	
Lactates at harvesting (mmol/L)	1.78 ±1	1.93 ±1	0.786	
Graft steatosis				
Overall steatosis >30%	0 (0%) 5.7 ±2	2 (28%) 11.4 ±5	0.002*	0.102
Extended criteria donor	23 (%)	6 (%)	0.296	
<i>Operative datas</i>				
Cold ischemia time	453±90	450 ±104	0.926	
Reperfusion syndrome	16 (46%)	4 (57%)	0.581	
Red blood cell transfusion (units)	5 ±4	15 ±13	0.002	
Fresch frozen plasma (units)	7 ±5	20 ±8	0.006	
Platelets (units)	1.6 ±1	1.3 ±1	0.817	
<i>Metabolomic quantification</i>				
Alanine	1.512 ±0.2	2.595 ±1.5	0.175	
Valine	0.21 ±0.04	0.528 ±0.4	0.111	
Isoleucine	0.145 ±0.03	0.325 ±0.2	0.139	
Glutamate	1.795 ±1	2.713 ±2	0.078	
Glutamine	0.76 ±0.4	1.087 ±0.7	0.115	
GABA	0.485 ±0.1	1.059 ±0.5	0.069	
Glucose	6.697 ±3	7.191 ±5	0.762	
Lactate	6.122 ±3	13.445 ±7	<0.0001	
Lactate > 8.4mmol/g	7 (%)	6 (%)	0.0006	0.046

Glycérol	4.699 ±3	6.615 ±7	0.27	
Ascorbate	0.175 ±0.02	0.195 ±0.04	0.702	
GSH	0.41 ±0.07	0.346 ±0.2	0.725	
Créatine	0.5 ±0.05	0.7 ±0.1	0.111	
Choline	1.062 ±0.1	1.568 ±0.6	0.17	
Phosphocholine	0.471 ±0.2	0.741 ±0.2	0.006	
Phosphocholine >0.65 mmol/g	7 (%)	6 (%)	0.00006*	0.207
Glycerophosphocholine	1.18 ±0.1	1.564 ±0.5	0.15	
Taurine	3.48 ±1	5.031 ±1	0.011	
Ethanolamine	0.371 ±0.06	0.633 ±0.19	0.108	

Figure 1

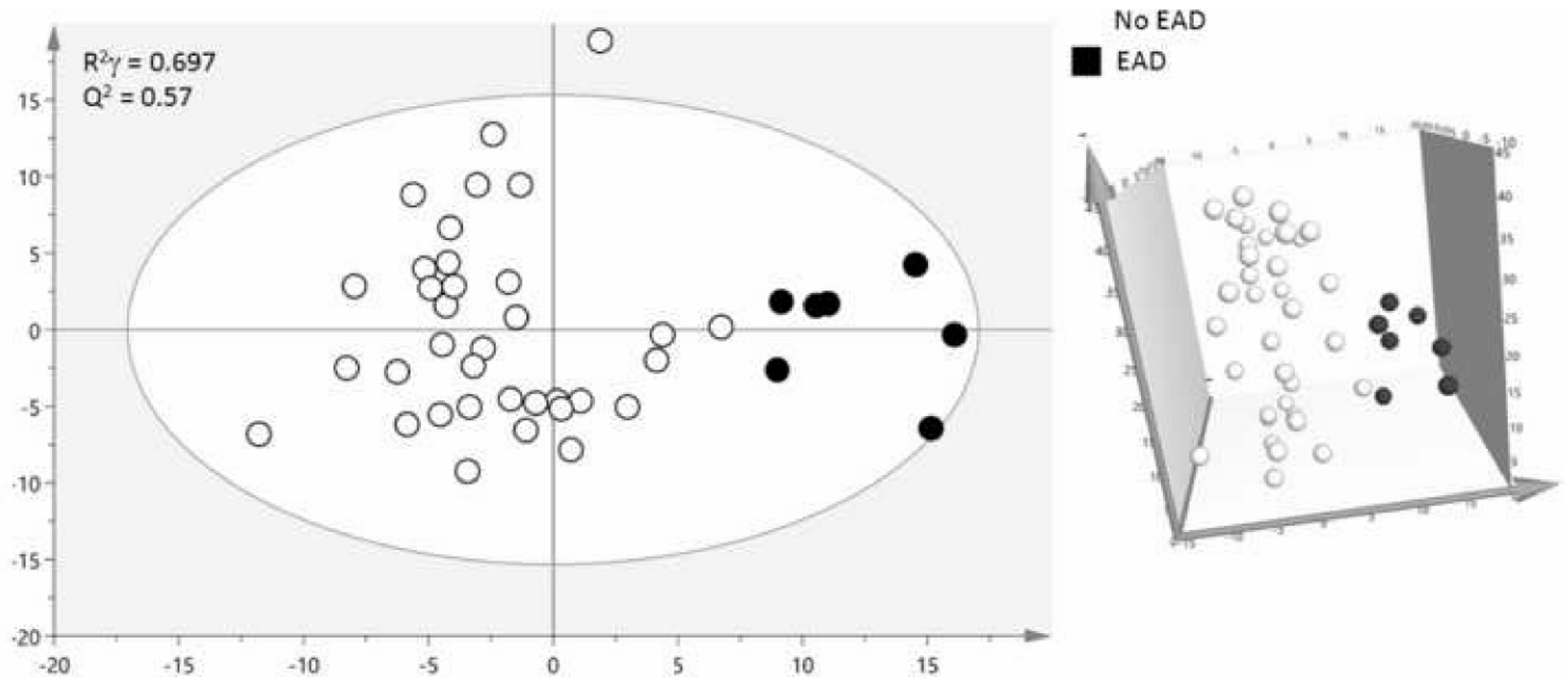


Figure 2

n=42

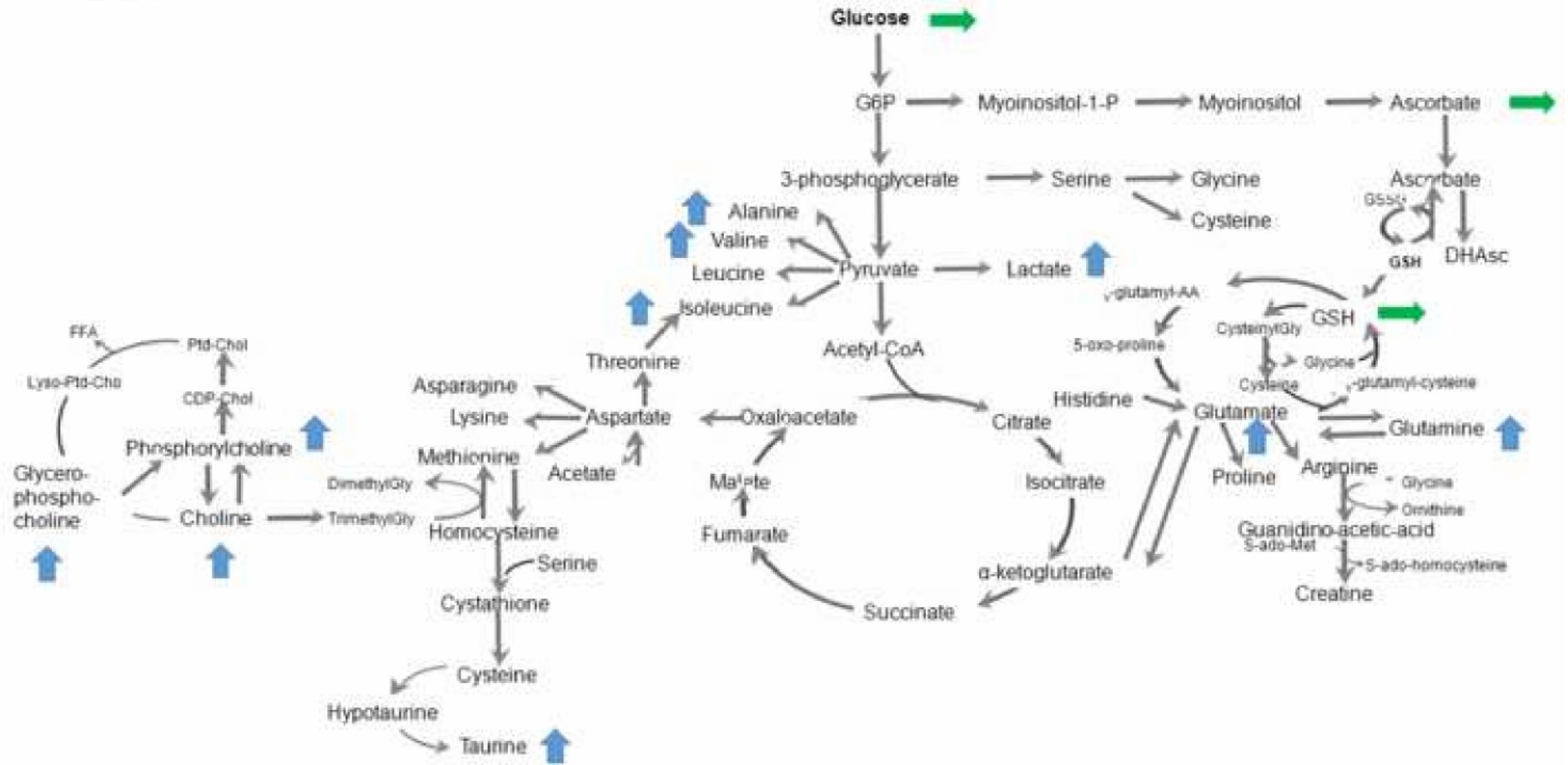
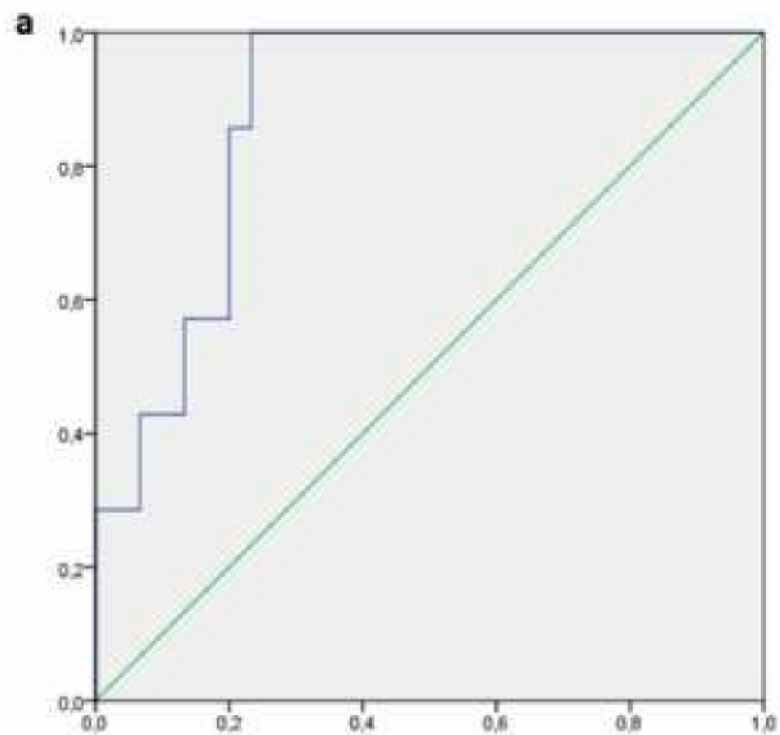
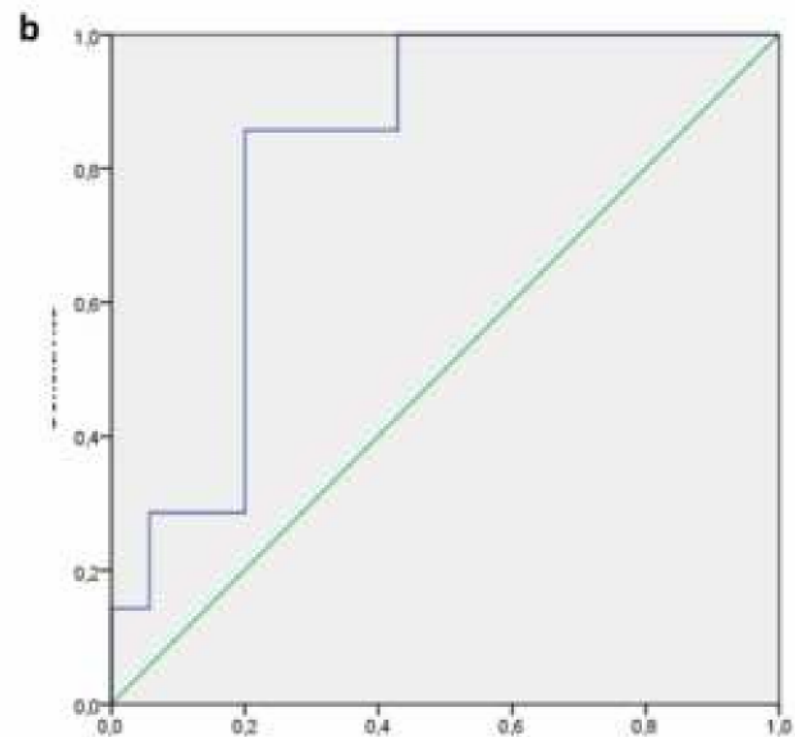


Figure 3

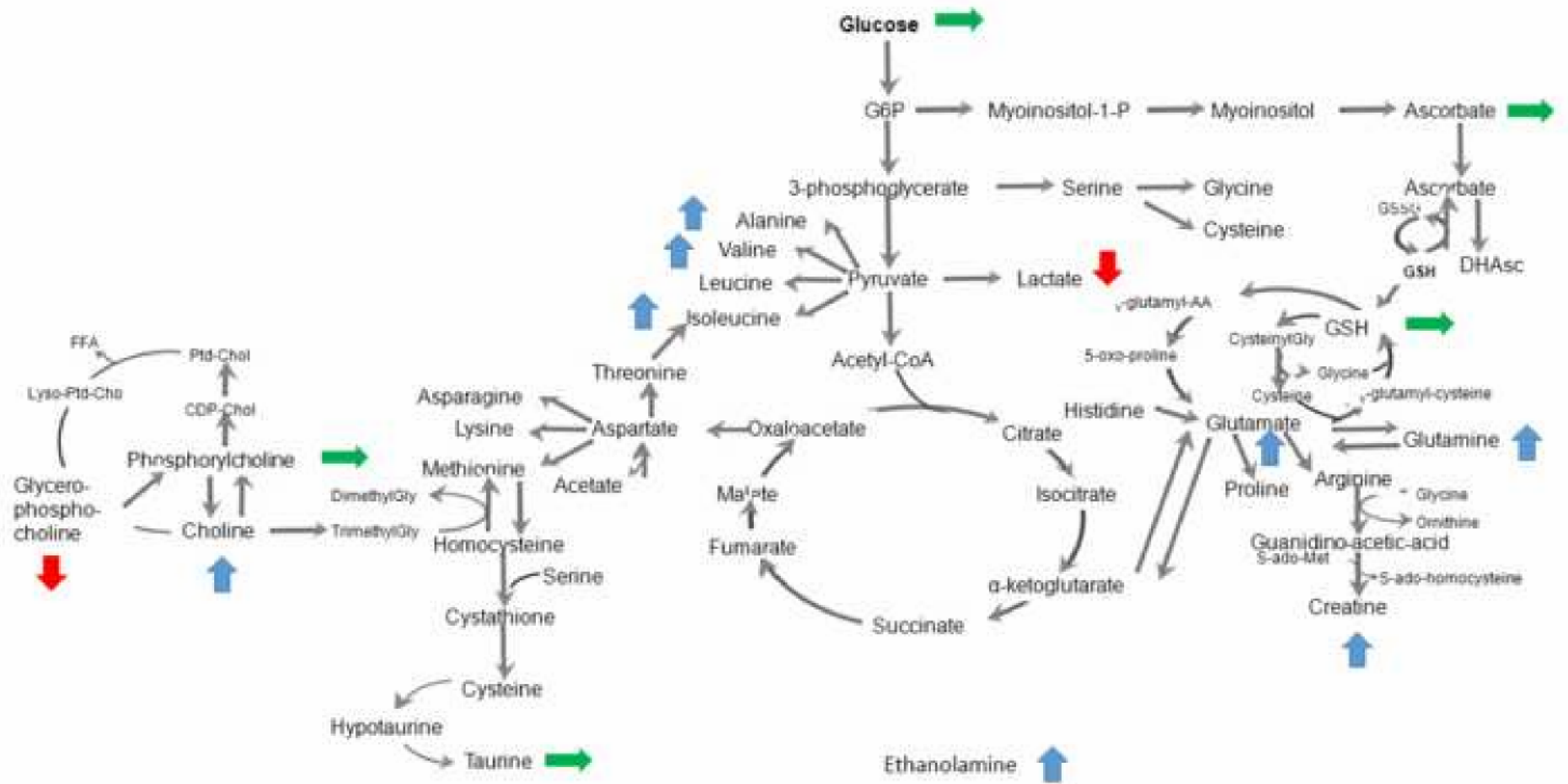


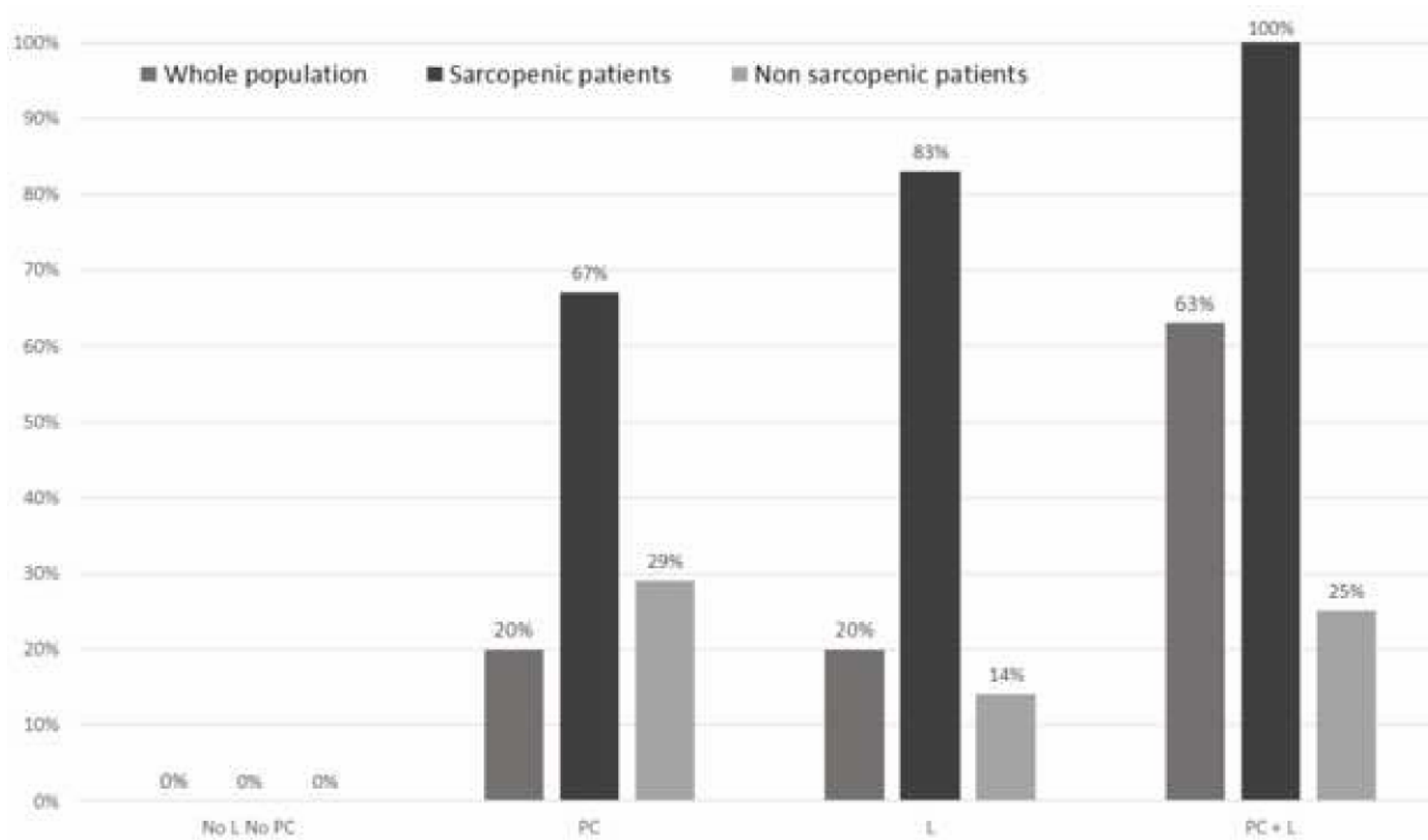
Lactates > 8.4mmol/g
Ss 100% Spé 80%
AUROC 0,906 (IC95% 0.813 – 0.999)



Phosphocholine > 0.646 mmol/g
Ss 86% Spé 80%
AUROC 0,816 (IC95% 0.679 – 0.954)

Figure 4





Annexe 2

Liver metabolomics after major hepatectomy: a further step in understanding liver failure

François Faitot MD^{1,2}, Elisa Ruhland PhD², Constantin Oncioiu MD¹, Camille Besch MD¹, Pietro F Addeo MD¹, Stéphanie Battini PhD², Philippe Bachellier MD¹, Izzie-Jacques Namer MDPH^{2,3}

Mini-abstract: Metabolic profiling accurately predicts death from liver failure after hepatectomy and identifies alanine, valine and glycerophosphocholine as powerful biomarkers. Profiles at risk exert similarities with profiles from proliferating systems such as cancer.

¹ Hepatobiliopancreatic Surgery and Transplantation Department, Hopital de Hautepierre, CHU de Strasbourg, France

² Laboratoire ICube, UMR7357, University of Strasbourg, France

³ Nuclear Medicine Department, Hôpital de Hautepierre, CHU de Strasbourg, France

Corresponding author:

François Faitot

Hepato-Pancreato-Biliary Surgery and Liver Transplantation Department,

Hopitaux Universitaires de Strasbourg,

1, avenue Molière

67000 Strasbourg

Tel : +33388127285

Fax : +33388127286

ABSTRACT

Objective: the goal of the study was to evaluate real-time metabolomics as a tool to predict liver failure after hepatectomy and identify potential early metabolic biomarkers.

Summary Background data: liver metabolism has been scarcely evaluated as a tool to predict liver failure after hepatectomy. However many reports from animal models show significant derangements in the liver metabolism. The main limitation is represented by techniques used for global metabolism estimation that are not compatible with clinical time.

Methods: end-hepatectomy liver biopsies from 42 patients were analyzed using high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy (Bruker Advance III spectrometer). The metabolic profiles were compared between patients dying from liver failure and patients surviving major hepatectomy using PLS-DA. Metabolites significantly associated to fatal liver failure (FLF) were identified through network analysis and compared to metabolites predicting ACLF in an independent cohort of cirrhotic patients.

Results: metabolic profile significantly predicted FLF with an excellent accuracy ($Q^2=0.516$). Intrahepatic content in neoglucogenic amino acids (alanine, isoleucine, glutamine and valine; $p<0.05$) was significantly higher in patients experiencing FLF as well as low glycerophosphocholine (AUROC=0.856; IC95% 0.738-0.974) and high choline/glycerophosphocholine ratio ($p=0.011$). The metabolic changes identified in this population were different from those observed between compensated and decompensated cirrhosis. The changes are consistent with Warburg effect that is observed in multicellular proliferating systems.

Conclusion: HR-MAS-NMR is an attractive tool to predict liver failure after hepatectomy and is clinically relevant given its real-time application. The identified metabolic derangements should lead to evaluate metabolic intervention to prevent liver failure.

INTRODUCTION

Liver failure (PHLF) is the main cause of mortality after major hepatectomy.¹ It represents a major limitation to curative treatment of primary and secondary liver cancers.

Understanding the physiopathology of PHLF mainly comes from animal studies. In the models of major and extended hepatectomy, liver remnant volume has been identified as a major predictor of survival.² It has been confirmed in human studies and the clinical criteria for safe hepatectomy largely relies on the assumption that a too small remnant functional liver will not cope with the metabolic demand.^{3,4} Thresholds have been defined according to the patient's weight to remnant liver ratio in parallel to what had been previously shown in living donation liver transplantation and according to the quality of parenchyma.⁵ More recent works have focused on the predictive value of functional imaging such as ^{99m}Tc-mebrofenin scintigraphy.⁶ Neither the primum movens for PHLF nor the metabolic impact of major resections are clearly ascertained. Among the latest debate is the question whether PHLF is due to a lack or an excess of hepatocyte proliferation. Indeed animal models and volumetric studies in humans have shown that decreased liver regeneration was associated to higher mortality.^{7,8} On the other hand, more recent works have emphasized the negative impact of the asynchronism of proliferation between the different cell population within the liver.⁹ One study has also shown that slowing down hepatocyte proliferation may contribute to better outcome after very extended hepatectomy.¹⁰ During liver regeneration, there are significant cellular metabolic interplays as shown by the beneficial metabolic impact of mesenchymal stem cells.¹¹

Metabolomics is a new field of research looking at the entire set of metabolites from a given solid or liquid sample. In the field of liver regeneration some metabolomic data exist focusing on specific metabolic pathways that may be up or downregulated. More generally proliferating systems such as cancer cells¹² and its environment¹³, activated immune cells¹⁴ or reprogrammed progenitor cells¹⁵ have shown to be associated to specific metabolomic profiles among which are decreased oxidative phosphorylation, neoglucogenesis activation and lipid accumulation – with a more specifically increased liver triglycerides. Among the tools of metabolomics high-resolution magic-angle-spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS-NMR) is an interesting tool as it enables solid tissue analysis of the metabolome within a time compatible with the clinical situation of liver resection.

The goal of this study was to evaluate this clinically relevant metabolomic technique as a tool to predict liver failure after hepatectomy and to identify potential dysregulated metabolic pathways and biomarkers on which a metabolic intervention could provide safer but more extended resection.

MATERIAL AND METHOD

Over a 2 year period, patients undergoing hepatectomy for benign or malignant liver disease were included if they fulfilled the following criteria: signed informed consent for biological and genetic analysis in the setting of an authorized biobank (registration number 1970 390v0), liver biopsy performed at the end of hepatectomy and snap-frozen within less than 5 minutes after sample harvesting, first hepatectomy. Moreover only patients at high risk of PHLF were included ie major hepatectomy and/or injured liver (chemotherapy induced toxicity at histology, stage 3/4 fibrosis).

Patient selection and preparation for hepatectomy

Patients were selected for hepatectomy according to liver function tests and liver volumetry. Ascitis and portal hypertension were assessed by imaging and endoscopic examination whenever suspected. Portal hypertension was generally considered a contraindication except when the indocyanine clearance test was normal (retention at 15min <10%). Biliary drainage was performed in all cases of patients with biliary obstruction before hepatectomy. Portal vein embolization was indicated systematically in case of concomitant extrahepatic resection, histology proven cirrhosis or in case of bilobar lesions necessitating a resection leaving less than 30% remnant liver or <0.5% remnant liver to body weight ratio (LBWR).

Metabolomic study

Samples were prepared in a -20°C environment. 15 to 20mg of tissue were punched-biopsied from the specimen. Deuterium oxide (8 mL) with 0.75 weight percent 2,2,3,3-D₄-3-(trimethylsilyl) propionic acid was added for chemical shift reference for NMR spectrometer.

HRMAS analysis was achieved on a Bruker Avance III 500 spectrometer operating at a proton frequency of 500.13MHz and equipped with a 4mm triple resonance gradient HR-MAS probe. The analysis was conducted at -80°C after placing the insert in a 4mm ZrO₂ rotor.

A one-dimensional (1D) proton spectrum using Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence and 128 transients was acquired for each tissue sample. Free induction decay were multiplied by an exponential window function of 0.3Hz prior to Fourier transformation and were corrected for phase and baseline distortion using TopSpin 3.2 (Bruker GmbH, Germany). The chemical shift was calibrated to the peak of the methyl proton of L-lactate at 1.33ppm.

In order to confirm resonance assignments, two-dimensional (2D) heteronuclear experiments were recorded immediately after the end of 1D spectra acquisition for 4 representative samples. Spectra were referenced by setting lactate doublet chemical shift to 1.33ppm in proton dimension and

22.70ppm in carbon dimension. Metabolites were assigned using standard metabolites chemical shift tables available in the literature.

Metabolite quantification was performed using an external reference standard of lactate (3 μ mol), scanned under the same analytical conditions. Spectra were normalized according to sample weight. Peaks of interest were automatically defined by an in-house program using Matlab 7.0 (Mathwork, Natick, USA). Peak integration was then compared to the one obtained with the lactate reference and were corrected according to the number of protons. Only well-defined peaks with no overlapping in the 1D CPMG spectra were selected for quantification.

Statistical analysis for metabolomics study

The region between 4.68ppm and 2.34ppm of each 1D HR-MAS NMR spectra was automatically bucketed into integral regions of 0.01ppm using Amix 3.9.14 software (Bruker GmbH, Germany) in order to reduce the peak shift effect due to pH variations. This dataset was exported and analyzed in Simca P (version 13.0.3, Umetrics AB, Umea, Sweden). The detailed procedure has been previously reported.

PLDS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis) was employed to check for the validity of the model. The 2 measurements of model quality were R^2_y and Q^2 representing the accuracy of fit (ie data variation) and accuracy of prediction respectively. $Q^2 \geq 0.5$ was considered as a good predictor.

Network analysis

Algorithm to Determine Expected Metabolite Level Alterations Using Mutual Information (ADEMA) has been applied on metabolite quantification values. The network was constructed using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes and Selway's work. The following pathways were used for the analysis : glucose/lactate ; glucose/ascorbate/glutathione/glutamate ; glucose/alanine/valine/ isoleucine ; choline/glycerophosphocholine/phosphocholine/total choline.

Endpoint definition

Fatal liver failure (FLF) was defined as PHLF as defined by the 50-50 criteria or bilirubin > 119 μ mol/L during the first 5 days that led to death within the first 90 days.¹⁶

Acute-on-chronic liver failure (ACLF) was defined according to the CANONIC study group for the cirrhotic patients for whom a native liver biopsy was available.

Continuous variables are expressed as mean \pm standard deviation. Student t-test or Mann-Whitney U test were used to compare the means between groups as appropriate. Categorical variables are expressed as number and percentage. Chi-2 test was used to compare the distribution of categorical variables between groups. Spearman's test was performed to determine correlation between variables. These statistical analysis were performed using Statview software (USA)

Receiving Operating Characteristics (ROC) curves were constructed to evaluate the value of identified metabolic biomarkers and to identify the best cutoff for these variables. SPSS software was used for this analysis.

RESULTS

A total of 100 biopsies were available for analysis: 45 from patients undergoing hepatectomy fulfilling the inclusion criteria stated above, 8 biopsies from embolized livers, 36 from native livers of liver transplanted patients and 11 from minor hepatectomy on healthy livers.

In the study group, the main indication for hepatectomy was colorectal liver metastases (n=22) followed by hepatocellular carcinoma (n=5), endocrine tumor liver metastases (n=5) and hilar cholangiocarcinoma (n=5). The majority of patients (66%) underwent major hepatectomy. In patients with colorectal liver metastases, 95% of the patients (n=21) received neoadjuvant chemotherapy. Patients with hepatocellular carcinoma had advanced fibrosis (n=3) or Child A cirrhosis (n=2). The characteristics of the patients are reported in table 1.

In the cohort, the rate of PHLF was 16% among whom 6 eventually died.

Metabolomic profile at the end of hepatectomy predicts FLF

The PCA analysis showed clear distinctive metabolic profiles between patients dying from PHLF after hepatectomy and those who did not ($Q^2=0.516$; $R^2y=0.85$) (Figure 1). There was no significant difference in terms of metabolic profile according to the stage of PHLF.

Metabolomic profile at the end of hepatectomy for non selected population

An additional analysis was conducted on the whole series of 56 available biopsies after hepatectomy.

Among these 11 patients, 1 died from liver failure after portal thrombectomy on cirrhotic liver, the other 10 did not experience PHLF. One by one prediction of additional biopsies of patients showed that the model predicted fatal PHLF with a 100% positive predictive value and 100% specificity. Its negative predictive value was 70%.

The metabolomic profile was not significantly different at the end of major versus minor hepatectomy ($Q^2=0.0021$). Metabolic profile differed according to neither liver parenchyma quality ($Q^2=-0.21$), portal triad clamping ($Q^2=-0.579$), nor indication ($Q^2=0.013$). Chemotherapy administration was not associated to significant metabolic changes ($Q^2=-0.21$) (Supplemental figure 1).

The metabolomic profile from PHLF livers exerts similarities with proliferating systems

Network analysis (Figure 2) exerted a more precise view by analyzing correlations between metabolites within one sample. It showed that FLF livers were richer in glucose, lactate, isoleucine, glutamine and glutamate regarding energy metabolism. There was a significantly lower level of anti-oxidant such as ascorbate and glutathione. Choline metabolism was significantly altered with higher choline level and lower glycerophosphocholine level.

Neoglucogenic amino acids and choline-derived metabolites predict PHLF with the highest accuracy.

When analyzing quantification of the identified metabolites, valine and alanine were significantly higher in livers exerting fatal PHLF (AUROC=0.806 and 0.802 respectively). The most powerful metabolite predicting PHLF was low glycerophosphocholine. ROC curve identified a 1.16mmol/g threshold which predicted fatal PHLF with a 73% sensitivity and a 100% specificity (AUROC=0.856; IC95% 0.738-0.974). (Figure 3)

When further analyzing choline metabolism, there was a significant difference in choline/glycerophosphocholine and phosphocholine/glycerophosphocholine ratio.

Metabolic derangements are not similar between compensated / decompensated cirrhosis and failing / non failing livers

Whereas the analysis of metabolic profile as a whole showed no significant difference between neither compensated cirrhosis and non failing liver nor between decompensated cirrhosis and failing livers, network analysis showed significant differences in the altered metabolic pathways between decompensated cirrhosis with ACLF and post-hepatectomy failing livers. Failing livers after hepatectomy showed higher level of alanine, glutathione, choline and glycerophosphocholine but lower level of glutamine, creatine and taurine. There was no significant difference in terms of lactate, glucose or other neoglucogenic amino acids (Figure 4).

An additional network analysis was conducted to compare metabolomic profile among cirrhotic patients between ACLF and non ACLF. The differentially expressed metabolites were not similar to those observed between failing and non failing livers as demonstrated by lower glucose and ascorbate levels in ACLF group. (Figure 5)

DISCUSSION

This is the first in man study showing the value of HR-MAS-NMR metabolomics to predict post-hepatectomy liver failure. There are significant metabolic derangements after hepatectomy specifically in case of subsequent liver failure. The most striking finding is that these metabolic derangements are similar to those observed in rapidly proliferating systems such as cancer or activated immune cells. The early timing of these metabolic derangements may precede many of the reported mechanisms leading to overt regeneration and then liver failure.

The metabolic derangements may be associated to significant cellular modifications. During the first stages of liver regeneration, ultrastructural modifications within the hepatocytes are observed that may be associated to metabolic impairments. Hepatocyte hypertrophy without cell division seems to be the first step before actual cell division. Cell division does not necessarily occur and polyploid hepatocytes are observed after minor and major hepatectomy. In this view, DNA synthesis - and thus markers of DNA synthesis - may not be the optimal marker to evaluate cell state. Hepatocyte hypertrophy is described in autophagy deficient mice linking autophagy to liver regeneration through maintenance of energy supply.¹⁷ In this case, energy supply may be represented by alternatives to glycolysis to fuel the tricarboxylic acid cycle (TCA). Neoglucogenic amino acids and fatty acids may represent such alternative fuels. Therefore the identification of these neoglucogenic amino acids as highly predictive of liver failure by HR-MAS-NMR are in line with the literature.

Cell size is linked to metabolic adaptation. It was first suggested that increased amino acids uptake - particularly alanine and glycine - induced cell swelling through cotransport with sodium.¹⁸ Indeed sodium-dependent system A amino acid transporters are upregulated early during liver regeneration.¹⁹ Glycolysis and glutaminolysis (with subsequent increase in glutamate) have been described in models of cell hypertrophy. Together with inhibition of oxidative phosphorylation and repression of lipid biosynthesis, mitochondria play a central role in these size and metabolic modifications.²⁰

Significant mitochondrial changes are observed after hepatectomy.²¹ These modifications may be associated to the observed alterations in cell metabolism designated as mitochondrial dysfunction. Mitochondrial permeability transition (MPT) is observed after extended hepatectomy and its inhibition decreases injury and mortality.²² This is associated to the significant impairment of the TCA. Whether metabolic derangements induce mitochondrial changes with subsequent mitochondrial dysfunction or whether mitochondrial dysfunction leads to metabolic derangements remains unknown.

The metabolic profile of failing livers is compatible with that of proliferating systems reinforcing the hypothesis of a negative impact of early regenerative boost. Indeed the elevation of glucose and lactate with high levels of neoglucogenic amino acids is also described in cancer cells. Aerobic glycolysis known as the Warburg effect was first described in cancer cells. The metabolic profile of failing livers corresponds to this profile. iPS cells exert a significant metabolic shift comparable to that observed in other proliferating systems with reduction of oxidative metabolism and increased glycolysis and upregulation of the pentose phosphate shunt.²³ In this view, the data herein presented may validate the hypothesis of an over-stimulation of cell proliferation. Whether the metabolic profile is a cause or a consequence of liver failure is beyond the scope of this study. Moreover the metabolic analysis does not enable to precisely identify cell population leading to the metabolic derangements. Given that the hepatocytes represent the majority of liver mass and a very important proportion of the metabolic activity in the liver, one could be prompt to interpret these findings as signs of hepatocyte tolerance to ischemia.

Indeed ischemia may be a significant driver of liver regeneration. Whether the metabolic profiles leading to liver failure is due to ischemia or represents an adaptation to the modified milieu cannot be answered yet. HIF-1 α has shown to be implicated in metabolic pathways and modulation of mTOR through HIF1- α may greatly impact the neoangiogenesis after hepatectomy.²⁴ It has been recently hypothesized that hypoxia accelerated liver regeneration.²⁵ This result well explains the metabolic profile of proliferating systems observed in this study.

Lactate increase may be a sign of hepatectomy-induced ischemia. However, as shown by the metabolite quantification and ROC analysis, lactate was not well associated to the outcome after hepatectomy. Although this result is in apparent contradiction with data recently published,²⁶ one should keep in mind that metabolomics measure intrahepatic content of lactate. Lactate may be used by parenchymal and non parenchymal cells before actually leaving the liver, arterial lactate being a marker of the general status of the patients or reflect intraoperative complications.

Another field of great interest is the impact of endoplasmic reticulum stress (ERS). ERS is intensively studied in the field of hepatology. In this study, we show that the ratio of choline-derived metabolites are highly predictive of PHLF. Although it may not be exclusively linked to ERS, increased choline/phosphocholine, choline /GPC and phosphocholine/GPC indicates a significant impairment in choline handling by ER. In animal models, ER homeostasis is disrupted by high fat diet and the subsequent inflammatory state.²⁷ After extended hepatectomy, ER stress initiates apoptosis particularly in case of Pringle maneuver. An interesting study showed that preoperative

chemotherapy induced a similar state of stress while preconditioning ER to stress by inducing anti-apoptotic chaperones in short-term model of chemotherapy-induced ER stress.²⁸

Apart from ERS, the alteration in choline metabolism may be seen as stigmata of lipid metabolism derangements during liver regeneration. Lipid droplets accumulation is well described in the early stages of the process. The characterization of differential lipid constitution of this postoperative steatosis may be an important aspect for future studies.²⁹ As shown by Alonso et al., patients with non alcoholic fatty liver disease may be differentiated according to lipid profile.³⁰ Further distinction in lipidic profile may provide targets for intervention but the technique does not enable lipidomic analysis.

This study has limitation mainly given its retrospective aspect. A first limitation of this study may be the selection biases leading to the observed rate of PHLF which is higher than in current published data. First it should be underlined that, in order to focus on high risk patients, the study only included patients with injured livers or major hepatectomy. This may explain the 14% rate of fatal PHLF. Second, rapid congelation of the samples was not always possible. Whereas all patients who suffered fatal PHLF during the study period could actually be included, many other patients undergoing major hepatectomy without major complications could not be included because of the delay in sample management. The value of end-hepatectomy biopsy could be discussed in terms of clinical value. Indeed, the clinical impact of the timing of the biopsy may seem poor at first view.

The earliness of metabolic derangements observed may be considered as the sign of altered liver parenchyma that should lead to decline hepatectomy. Indeed higher level of bilirubin and resection on cirrhotic livers were significantly associated to liver failure. However the analysis of native cirrhotic livers from transplanted patients showed that the metabolic profiles are not similar between failing livers and decompensated cirrhotic livers and compensated livers do not exert significantly different metabolic profile. Therefore the origin of the difference in metabolic profile should be looked for elsewhere. If preoperative parenchymal state predicted liver failure alone, there would be no or little impact of the extent of hepatectomy. Tolerance to hepatectomy should therefore be evaluated at the end of the hepatectomy. A last limitation could be the sensibility of HR-MAS-NMR limits the capacity to identify and quantify metabolites that are present in very small quantity. This inability to quantify metabolites present in very low concentration limits a full understanding of the metabolic pathways involved in the pathophysiology of liver failure after hepatectomy.

On the other hand, the sensibility of HR-MAS-NMR may be also seen as an advantage as it detects only clinically relevant metabolites for intervention. The main advantage of HR-MAS-NMR is its relevance in the operative theater as the metabolic profile and metabolite quantifications can be achieved in 30 minutes. The identification of the metabolites involved in the process could lead to metabolic intervention to ameliorate the outcomes after major resections on diseased liver.

Metabolic intervention may be an elegant way of research for the prevention of liver failure. Metabolic intervention is under investigation in many domains of medical research. Prevention or treatment of hepatocellular carcinoma by the use of metformin is being studied since a decade and the results of randomized trials will help better delineate the place of this therapy. Metformin is much used as an AMP kinase inhibitor. In rodent models, it has shown: preventive effect on allograft rejection by targeting T cell metabolism³¹, beneficial impact on the outcome in severely burned patients associated to antilipolytic action.³²

Another metabolic intervention would regard the endoplasmic reticulum stress. As demonstrated by the data shown here, ER stress may be a significant target for treatment of liver failure after hepatectomy. Intermittent selective clamping as recently been shown to improve ER stress.³³ Drugs affecting locoregional perfusion have also shown beneficial impact on ER stress after hepatectomy. Coadministration of prostaglandin E1 and somatostatin seem to alleviate the inflammatory response and ER stress. In large animal model, portal flow modulation was achieved by using intraoperative somatostatin infusion.³⁴ The effect of octreotide on metabolomic profile after hepatectomy showed significant modifications in the methionine cycle with concomitant inhibition of early hepatocyte regeneration after massive hepatectomy. Methylthioadenosine was found to increase survival after hepatectomy.³⁵ Further studies should be conducted to evaluate the metabolic advantage of mechanical portal inflow modulation such as vascular ring which demonstrated significant benefit in terms of microarchitecture preservation.³⁶

In conclusion, HR-MAS-NMR metabolomics allows accurate and early prediction of fatal liver failure after hepatectomy. Although there is currently no efficient treatment for PHLF, metabolic intervention may be a future way of research particularly in the field of prevention of ER stress. Most interestingly, metabolic profile of failing livers tend to reinforce the hypothesis of over-stimulation of cell proliferation in the pathophysiology of liver failure as shown by the similarities of metabolic profile between failing livers and cancer cells known as the Warburg effect.

REFERENCES

- ¹ Mise Y, Vauthey JN, Zimmitti G, Parker NH, Conrad C, Aloia TA et al. Ninety-day postoperative mortality is a legitimate measure of hepatopancreatobiliary surgical quality. *Ann Surg.* 2015;262(6):1071-8
- ² Madrahimov N, Dirsch O, Broeschl C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Ann Surg.* 2006;244(1):89-98
- ³ Narita M, Oussoultzoglou E, Fuchshuber P, Pessaux P, Chenard MP, Rosso E et al. What is the safe future liver remnant size in patients undergoing major hepatectomy for colorectal liver metastases and treated by intensive preoperative chemotherapy? *Ann Oncol Surg.* 2012;19(8):2526-38
- ⁴ Kishi Y, Abdalla EK, Chun YS, Zorzi D, Madoff DC, Wallace MJ et al. Three hundred and one consecutive extended right hepatectomies: evaluation of outcome based on systematic liver volumetry. *Ann Surg.* 2009;250(4) :540-8
- ⁵ Truant S, Boleslawski E, Sergent G, Leteurtre E, Duhamel A, Hebbar M et al. Liver function following extended hepatectomy can be accurately predicted using remnant liver volume to body weight ratio. *World J Surg.* 2015;39(5):1193-201
- ⁶ Chapelle T, Op de Beeck B, Huyghe I, Francque S, Driessen A, Roeyen G et al. Future remnant liver function estimated by combining liver volumetry on magnetic resonance imaging with total liver function on (99m)Tc-mebrofenin hepatobiliary scintigraphy: can this tool predict post-hepatectomy liver failure? *HPB (Oxford);*18(6) :494-503
- ⁷ Pauta M, Rotllan N, Fernandez-Hernando A, Langhi C, Ribera J, Lu M et al. Akt-mediated foxo1 inhibition is required for liver regeneration. *Hepatology.* 2016 ;63(5) :1660-74
- ⁸ Margonis GA, Amini N, Buettner S, Besharati S, Kim Y, Sobhani F et al. Impact of early postoperative platelet count on volumetric liver gain and perioperative outcomes after major liver resection. *Br J Surg.* 2016;103(7):899-907
- ⁹ Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature.* 2010;468(7321):310-5
- ¹⁰ Ninomiya M, Shirabe K, Terashi T, Ijichi H, Yonemura Y, Harada N et al. Deceleration of regenerative response improves the outcome of rat with massive hepatectomy. *Am J Transplant.* 2010;10:1580-87
- ¹¹ Tautenhahn HM, Bruckner S, Baumann S, Winkler S, Otto W, von Bergen M et al. Attenuation of postoperative liver failure by mesenchymal stem cell treatment due to metabolic implications. *Ann Surg.* 2016;263(3):546-56
- ¹² Ochoa-Ruiz E, Diaz-Ruiz R. Anaplerosis in cancer : another step beyond the Warburg effect. *Am J Mol Biol.* 2012;2:291-303
- ¹³ Guido C, Whitaker-Menezes D, Capparelli C, Balliet R, Lin Z, Pestell RG et al. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF- β drives tumor growth. *Cell Cycle.* 2012;11:3019-35

- ¹⁴ Yang Z, Matteson EL, Goronzy JJ, Weyand CM. T-cell metabolism in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther*.2015;17:29;doi:10.1186/s13075-015-0542-4
- ¹⁵ Parks SJ, Lee SA, Prasain N, Bae D, Kang H, Ha T et al. Metabolome profiling of partial and fully reprogrammed induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*.2017;26(10):734-742
- ¹⁶ Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R, Brooke-Smith M, Crawford M, Adam R et al. Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery*.2011;149(5):713-24
- ¹⁷ Toshima T, Shirabe K, Fukuhara T, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y et al. Suppression of autophagy during liver regeneration impairs energy charge and hepatocyte senescence in mice. *Hepatology*.2014;60(1):290-300
- ¹⁸ Brand HS, Deutz NE, Meiter AJ, Joming GG, Chalumeau RA. In vivo amino acid fluxes in regenerating liver after two-thirds hepatectomy in the rat? *J Hepatol*. 1995;23(3):333-40
- ¹⁹ Fowler FC, Banks RK, Mailliard ME. Characterization of sodium-dependent amino acid transport activity during liver regeneration. *Hepatology*.1992;16(5):1187-94
- ²⁰ Miettinen TP, Pessa HK, Caldez MJ, Fuhrer T, Diril MK, Sauer U et al. Identification of transcriptional and metabolic programs related to mammalian cell size. *Curr Biol*.2014;24(6):598-608
- ²¹ Ferri D, Moro L, Mastrodonato M, Capuano F, Marra E, Liquori GE et al. Ultrastructural zonal heterogeneity of hepatocytes and mitochondria within the hepatic acinus during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biol Cell*.2005;97(4):277-88
-
- ²² Rehman H, Sun J, Shi D, Yuan B, Sun QJ, Jiao BH et al. NIM811 prevents mitochondrial dysfunction, attenuates liver injury and stimulates liver regeneration after massive hepatectomy. *Transplantation*.2011;91(4):406-12
- ²³ Folmes CD, Arrell DK, Zlatkovic-Lindor J, Martinez-Fernandez A, Perez-Terzic C, Nelson TJ et al. Metabolome and metaboproteome remodeling in nuclear reprogramming. *Cell Cycle*.2013;12(15):2355-65
- ²⁴ Kron P, Linecker M, Limani P, Schlegel A, Kambakamba P, Lehn JP et al. Hypoxia-driven Hif1a coordinates mouse liver regeneration by coupling parenchymal growth to vascular expansion. *Hepatology*.2016;64(6):2198-2209
- ²⁵ Schadde E, Tsatsaris C, Swiderska-Syn M, Breitenstein S, Urner M, Schimmer R et al. Hypoxia of the growing liver accelerates regeneration. *Surgery*.2017;161(3):666-679
- ²⁶ Vibert E, Boleslawski E, Cosse C, Adam R, Castaing D, Cherqui D, et al. Arterial lactate concentration at the end of an elective hepatectomy is an early predictor of the postoperative course and a potential surrogate of intraoperative events. *Ann Surg*.2015;262(5):787-92
- ²⁷ Wires ES, Trychta KA, Back S, Sulima A, Rice KC, Harvey BK. High fat diet disrupts endoplasmic reticulum calcium homeostasis in the rat liver. *J Hepatol*, 2017;doi:10.1016/j.hep.2017.05.023
- ²⁸ Manekeller S, Seinsche A, Sioutis M, Hirner A. Extended liver resection after preoperative chemotherapy: influence on regeneration and endoplasmic reticulum stress response. *Langenbecks ArchSurg*.2009;394(4):681-8

- ²⁹ Garcia-Arcos I, Gonzalez-Kother P, Aspichueta P, Rueda Y, Ochoa B, Fresnedo O. Lipid analysis reveals quiescent and regenerating liver specific populations of lipid droplets. *Lipids*.2010;45(12):1101-8
- ³⁰ Alonso C, Fernandez-Ramos D, Varela-Rey M, Martinez-Arranz I, Navasa N, Van Liempd SM et al. Metabolomic identification of subtypes of non alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*.2017;152(6):1449-61
- ³¹ Lee CF, Lo YC, Cheng CH, Furtmüller GJ, Oh B, Andrade-Oliveira V et al. Preventing allograft rejection by targeting immune metabolism. *Cell Rep*.2015;13(4):760-70
- ³² Jeschke MG, Abdullahi A, Burnett M, Rehou S, Stanojcic M. Glucose control in severely burned patients using metformin: an interim safety and efficacy analysis of a phase II randomized controlled trial. *Ann Surg*.2016;264(3):518-27
- ³³ Ben Mosbah I, Duval H, Mbatchi SF, Ribault C, Grandadam S, Pajaud J et al. Intermittent selective clamping improves rat liver regeneration by attenuating oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Dis*.2014;doi:10.1038/cddis.2014.65
- ³⁴ Mokham K, Darnis B, Schimtt Z, Duperret S, Ducerf C, Mabrut Y. Successful modulation of portal inflow by somatostatin in a porcine model of small-for-size syndrome. *Am J Surg*.2016;212(2):321-6
- ³⁵ Zhenggui D, Yongjie Z, Xufeng L, Lei L, Changli L, Li L et al. Octreotide prevents liver failure through upregulating 5'-methylthioadenosine in extended hepatectomized rats. *Liver Int*.2016;36:212-222
- ³⁶ Bucur PO, Bekheit M, Audebert C, Othman A, Hammad S, Sebah M et al. Modulating portal hemodynamics with vascular ring allows efficient regeneration after partial hepatectomy in a porcine model. *Ann Surg*.2017doi/10.1097/SLA.0000000000002146

Figure 1: 3D PLS-DA analysis of profiles of failing and non failing livers of 45 included patients. The analysis shows a clear distinction of the metabolic profiles between failing (black spheres) and non failing livers (white spheres).

Figure 2: Network analysis comparing metabolism of fatal and non fatal liver failure. ADEMA analysis shows a significant increase in neoglucogenic amino acid as well as increased lactate. Decrease in anti-oxidant metabolites is also observed. Significant impairment in the metabolism of choline derivatives is consistent with endoplasmic reticulum stress.

Figure 3: ROC curves for the most significant metabolites predicting fatal PHLF. Alanine and valine show fair predictive value for fatal PHLF. Low glycerophosphocholine is associated to a significant risk of mortality after hepatectomy with a good AU ROC of 0.856.

Figure 4: Network analysis comparing fatal PHLF and ACLF shows that the altered metabolic pathways between the two entities differ from the metabolic pathways differentiating fatal and non fatal PHLF. Decreased glutamine and creatine are a distinctive pattern of fatal PHLF compared to ACLF.

Figure 5: Network analysis comparing ACLF and non ACLF cirrhotic livers. Although the main differences observed between fatal and non fatal PHLF, low glucose and elevated lactate are consistent with the data demonstrating metabolic shift in decompensated cirrhosis. Low ascorbate level is an additional metabolic characteristic not exerted in failing livers after hepatectomy.

Supplemental figure 1: PLS-DA analysis of metabolic profiles according to the extension of hepatectomy and preoperative chemotherapy administration. No significant difference in the overall metabolic profile could be demonstrated even after increasing sensibility of the analysis using OPLS-DA.

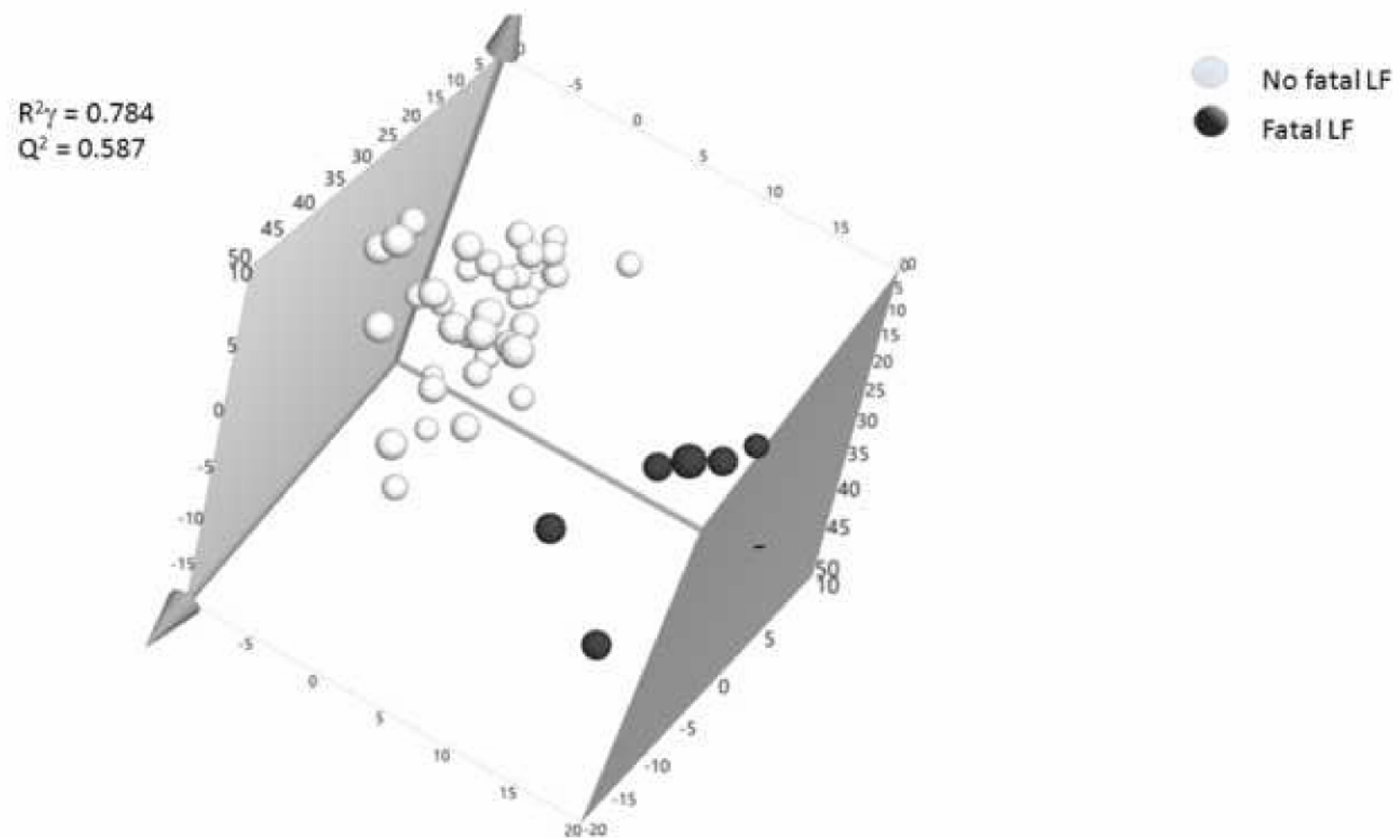
Table 1: demographic and operative characteristics of the 45 included patients

	Whole population	Fatal PHLF n=6	No fatal PHLF n=39	p value
Age	63 ±12	69 ±6	62 ±12	0.243
Male gender	20	4 (20%)	16 (80%)	0.239
Indication				
CRLM HCC	22	2 (9%)	20 (81%)	0.413
/ IHCC	7	3 (43%)	4 (57%)	0.012
Hilar cholangiocarcinoma	5	1 (20%)	4 (80%)	0.642
Benign tumor		0	4 (80%)	0.352
BMI	25 ±4	26 ±4	25 ±4	0.624
Obesity	6	1 (17%)	5 (83%)	0.245
Diabetes	8	3 (38%)	5 (62%)	0.027
Insulin treatment	1	0	1 (100%)	0.043
Arterial hypertension	18	3 (17%)	15 (83%)	0.591
Statin use	5	1 (20%)	4 (80%)	0.642
Metabolic syndrome	9	1 (11%)	8 (89%)	0.826
Major hepatectomy	30	6 (20%)	24 (80%)	0.063
Portal vein embolization	10	2 (20%)	8 (80%)	0.079
Portal triad clamping	17	4 (24%)	13 (76%)	0.608
Parenchymal injury				
Steatosis	22	1 (5%)	21 (95%)	0.09
Fibrosis > F2	4	2 (50%)	2 (50%)	0.024
Preoperative bilirubin	20 ±7	82 ±46	10 ±8	0.02
Preoperative INR	1.04 ±0.1	1.17 ±0.2	1.06 ±0.2	0.349
Preoperative creatinine	67.2 ±18	64 ±14	68 ±19	0.657
Preoperative ASAT	52.7 ±11	173 ±165	24 ±23	0.001
Preoperative platelets	259 ±93	285 ±84	255 ±95	0.423
Preoperative NLR	3.19 ±2	4.65 ±2	2.97 ±2	0.105
Preoperative ICG clearance	10.1 ±7	15 ±10	9 ±6	0.312
Preoperative MELD score	7 ±5	9 ±4	7 ±3	0.463
Preoperative APRI score	0.41 ±0.1	0.42 ±0.2	0.41 ±0.5	0.245

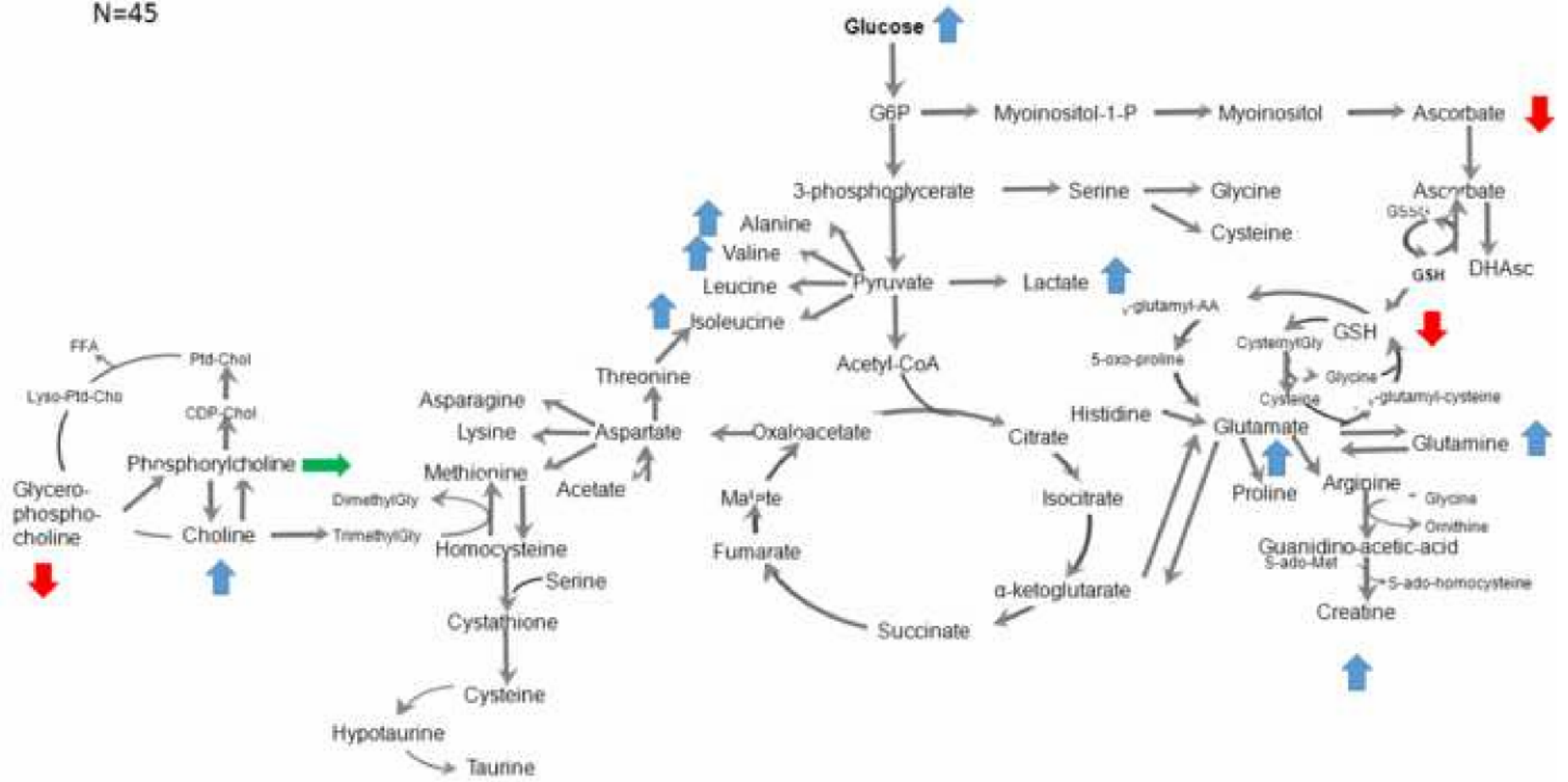
Table 2: metabolite quantification according to the occurrence of a fatal post-hepatectomy liver failure

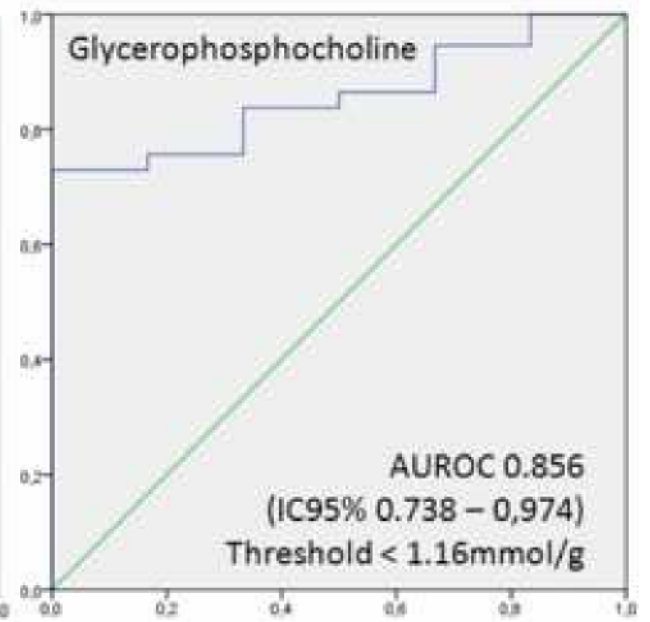
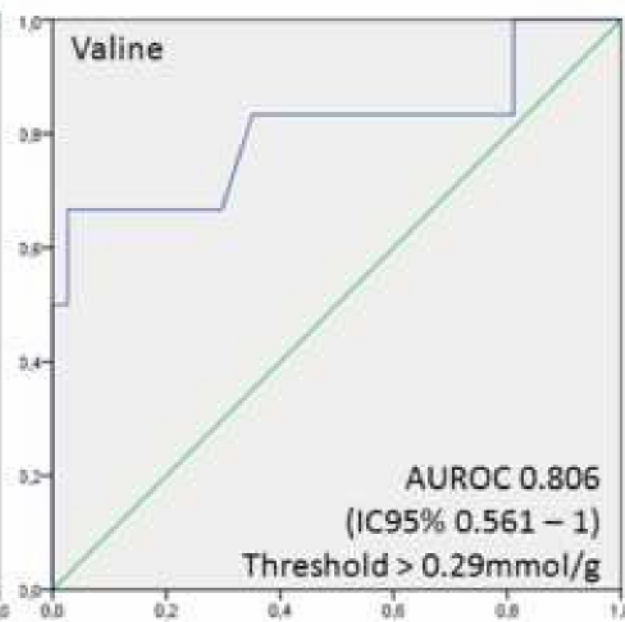
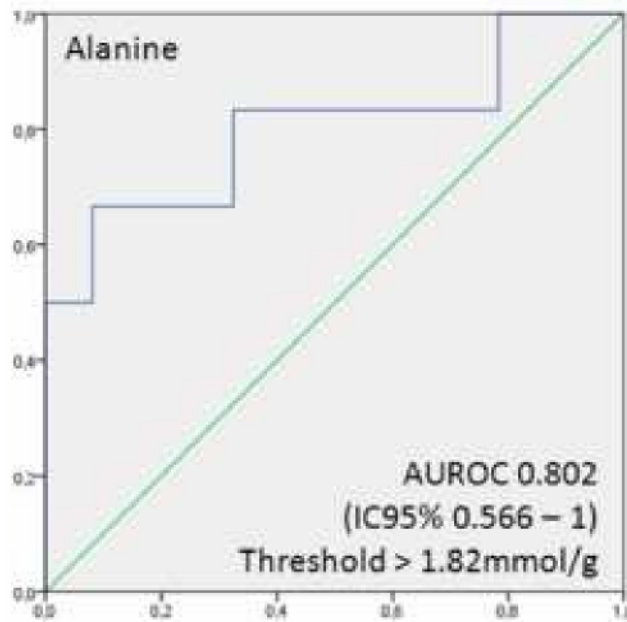
	No fatal PHLF	Fatal PHLF	p value
Glucose	5.357 ±4	6.38 ±4	0.564
Lactate	6.064 ±3	8.723 ±5	0.053
Alanine	1.06 ±0.5	3.14 ±2	<0.0001
Valine	0.125 ±0.1	0.475 ±0.4	<0.0001
Isoleucine	0.084 ±0.05	0.358 ±0.3	<0.0001
Glutamine	0.861 ±0.3	1.13 ±0.4	0.049
Glutamate	2.031 ±0.7	2.724 ±1	0.063
GABA	0.415 ±0.3	0.643 ±0.5	0.157
Ascorbate	0.23 ±0.1	0.15 ±0.1	0.120
GSH	0.728 ±0.4	0.425 ±0.3	0.092
Choline	0.825 ±0.5	1.101 ±0.7	0.255
Phosphocholine	0.631 ±0.4	0.397 ±0.2	0.06
Glycerophosphocholine	1.628 ±0.7	0.705 ±0.4	0.005
PC / GPC	0.486 ±0.3	4.42 ±4	0.011
Choline /GPC	0.775 ±0.2	4.84 ±3	0.006
Ethanolamine	0.377 ±0.3	0.672 ±0.5	0.072
Taurine	4.775 ±2	5.062 ±4	0.757

Figure 1

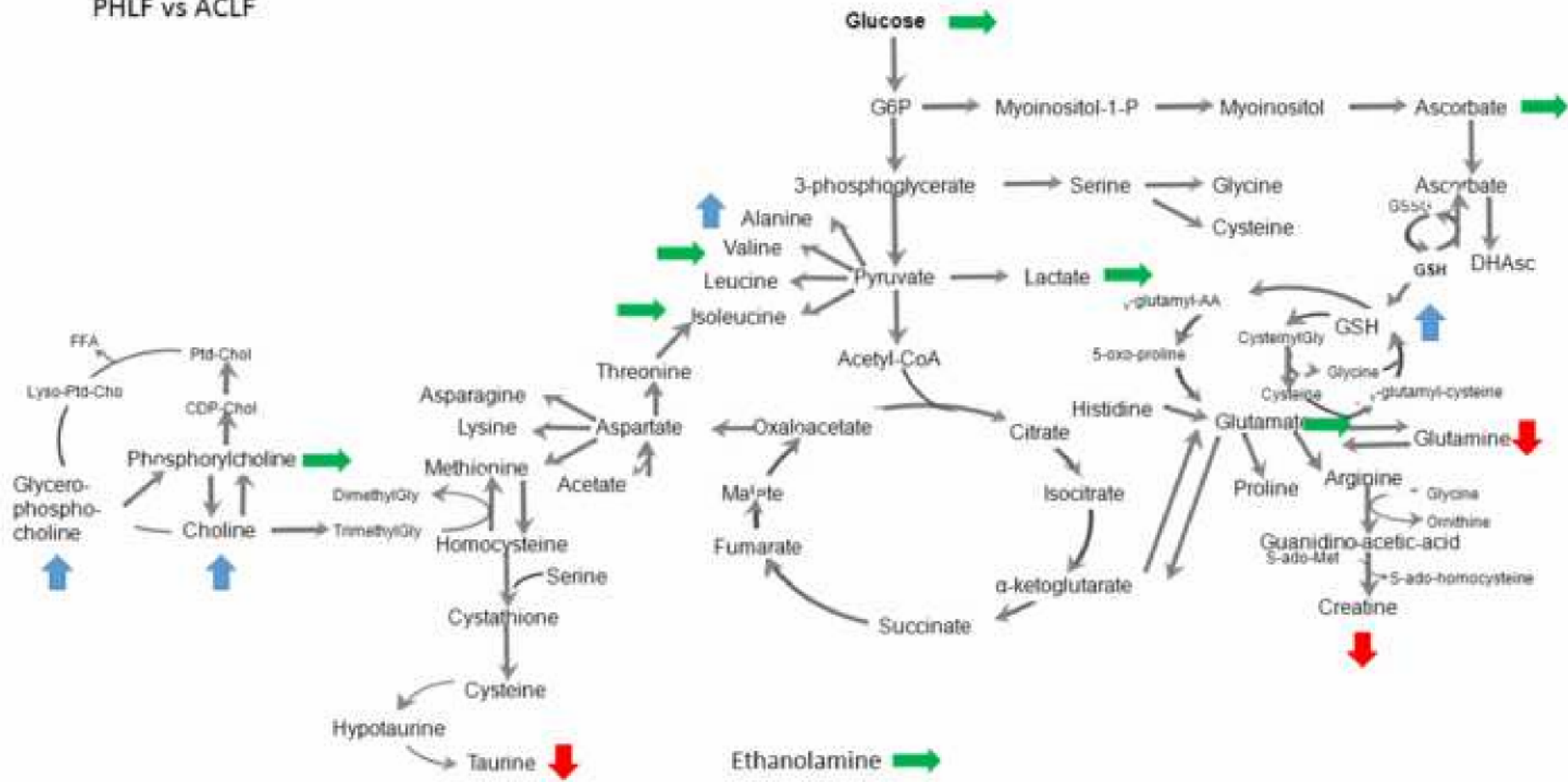


N=45

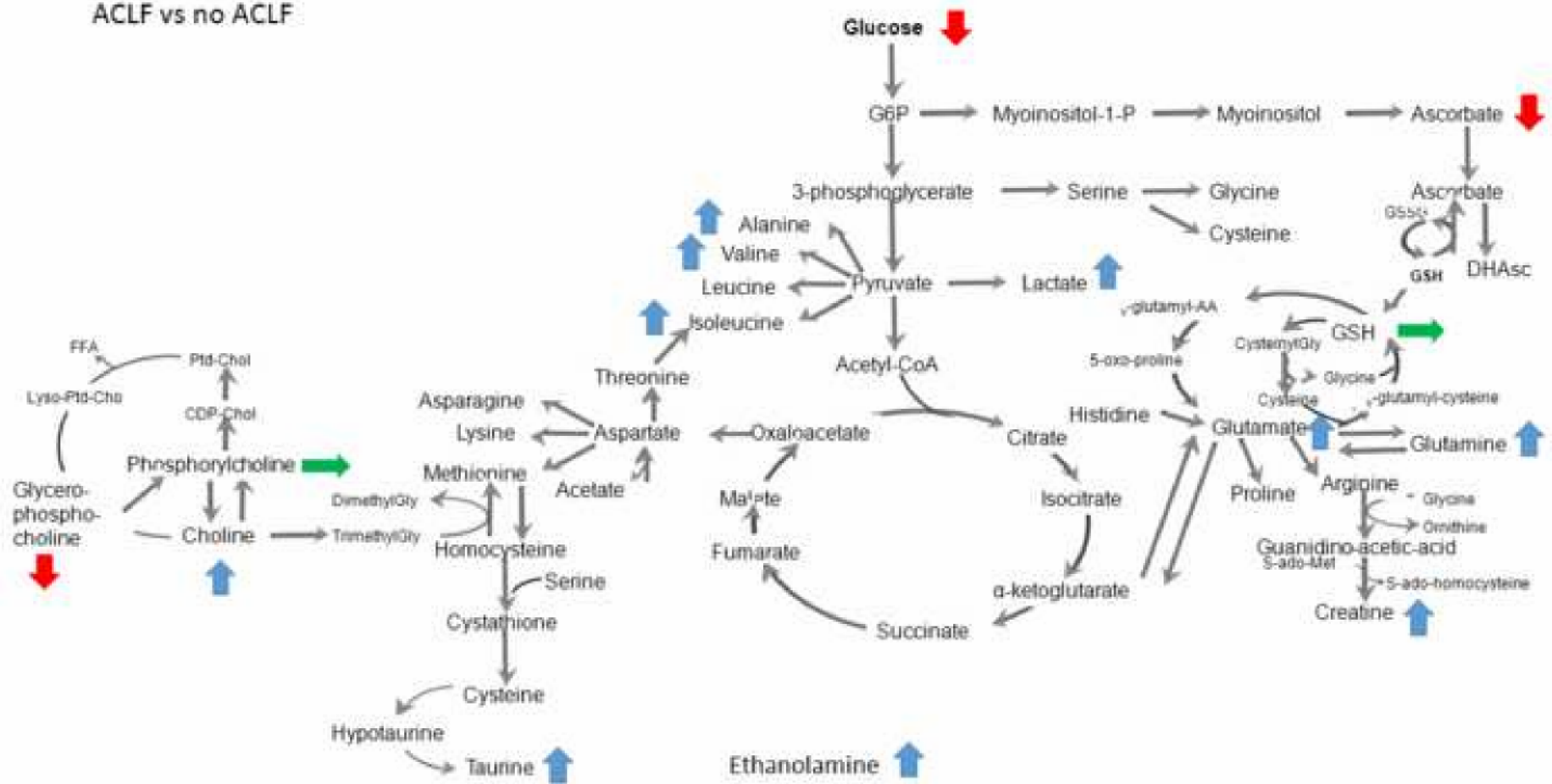




PHLF vs ACLF



ACLF vs no ACLF



Résumé

La principale limite en chirurgie hépatobiliaire est représentée par l'insuffisance hépatocellulaire post-hépatectomie ou la dysfonction du greffon après transplantation. Il existe de nombreux facteurs prédictifs dans la littérature mais peu d'études ont évalué le métabolisme du foie dans son ensemble pour évaluer ce risque, probablement du fait de l'absence de technique utilisable en pratique clinique. La métabolomique HR-MAS-RMN pourrait pallier à ce manque en donnant une image globale du métabolisme à un instant t en temps compatible avec la clinique. Le but de cette thèse était d'évaluer l'apport de cette technique en chirurgie hépatobiliaire.

Dans une série rétrospective de 42 biopsies de greffons hépatiques prélevés lors de la préparation ex-vivo, le profil métabolique prédisait le risque de dysfonction du greffon et identifiait le lactate et la phosphocholine comme de puissants biomarqueurs. Un score de matching métabolique selon le profil du receveur améliorait encore la performance du test.

Dans une série rétrospective de 45 biopsies de foies après hépatectomie majeure, le profil métabolique prédisait la survenue d'un décès par insuffisance hépatocellulaire. Ce profil différait du profil des cirrhotiques en décompensation aiguë et était compatible avec celui de système cellulaire en prolifération. Une étude préliminaire montrait que le profil métabolique était associé au risque de récurrence de métastases après hépatectomie.

Au total, ce travail montre l'intérêt de la métabolomique par HR-MAS-RMN pour prédire l'issue d'une hépatectomie ou d'une transplantation dans un temps compatible avec la clinique. Les données retrouvées orientent vers la piste de l'intervention métabolique en chirurgie hépatique.

Mots-clés : métabolomique, RMN HRMAS, biomarqueurs, transplantation hépatique, hépatectomie

Abstract

One of the main limits in liver surgery is the risk of liver failure after hepatectomy or graft dysfunction after liver transplantation. Many predictive factors have been identified in the literature but their value is often discussed. Few studies have globally evaluated liver metabolism, probably due to the lack of clinically relevant techniques. HR-MAS-NMR metabolomics may fulfill this lack and the goal of this work was to evaluate its capacity to predict early outcomes after hepatectomy and liver transplantation.

In a retrospective series of 42 graft biopsies, harvested during back-table preparation, metabolic profile predicted early allograft dysfunction and identified lactate and phosphocholine as potent biomarkers. Metabolic matching between recipient and donor profiles enhanced the value of the test.

In a retrospective series of 45 biopsies harvested at the end of major hepatectomy, metabolic profile predicted liver failure (LF). The profile at risk of LF differed from that of decompensated cirrhosis but correlated to that of proliferative multicellular systems such as cancer. A preliminary study showed that the metabolic profile predicted the risk of liver metastases recurrence at 1 year.

Overall, this work underlines the potential value of HR-MAS-NMR metabolomics in the prediction of short-term outcomes in liver surgery in the clinical setting. It provides clues to be further investigated for future evaluation of metabolic intervention in the field of liver surgery.

Keywords : metabolomics, RMN HRMAS, biomarkers, liver transplantation, hepatectomy