



**HAL**  
open science

# Modulation de la biosynthèse de novo du NAD au cours de l'insuffisance rénale aiguë

Zahia Nadour

► **To cite this version:**

Zahia Nadour. Modulation de la biosynthèse de novo du NAD au cours de l'insuffisance rénale aiguë. Biologie moléculaire. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5271 . tel-04870614

**HAL Id: tel-04870614**

**<https://theses.hal.science/tel-04870614v1>**

Submitted on 7 Jan 2025

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

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

# Université Paris Cité

**École doctorale MTCI 563**

**Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries**

***Laboratoire INSERM 1138- CRC***

***Equipe Médecine personnalisée, Pharmacogénomique,  
Optimisation thérapeutique (MEPPOT)***

## **Modulation de la biosynthèse *de novo* du NAD au cours de l'insuffisance rénale aiguë**

**Par Zahia NADOUR**

**Thèse de doctorat de Biologie moléculaire**

**Dirigée par Nicolas PALLET**

Présentée et soutenue publiquement le 21 novembre 2023

Devant un jury composé de :

<b>Pierre GALICHON</b>	MCU-PH, Sorbonne Université	Président
<b>Sophie DE SEIGNEUX</b>	PU-PH, Université de Genève	Rapportrice
<b>Joost-Peter SCHANSTRA</b>	DR, Université Toulouse III	Rapporteur
<b>Alexandre HERTIG</b>	PU-PH, Sorbonne Université	Examineur
<b>Juliette HADCHOUEL</b>	DR, Sorbonne Université	Examinatrice
<b>Nicolas PALLET</b>	PU-PH, Université Paris Cité	Directeur de thèse

**Titre :** Modulation de la biosynthèse *de novo* du NAD au cours de l'insuffisance rénale aiguë

**Résumé :**

La voie des kynurénines est la principale voie de catabolisme du tryptophane (TRP) dans l'organisme et elle permet la production de kynurénines et la synthèse *de novo* du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Le NAD est un cofacteur essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire rénale. Au cours de l'insuffisance rénale aiguë (IRA), une diminution de la synthèse du NAD locale a été observée en lien avec la répression de la quinolinate phosphoribosyl transférase (QPRT), une enzyme clé dans la biosynthèse *de novo* du NAD.

Les mécanismes moléculaires régissant la réduction de l'expression de la QPRT dans l'IRA ischémique, ainsi que le rôle de l'altération de la biosynthèse du NAD dans l'évolution vers la maladie rénale chronique (MRC) sont peu connus. Il paraît donc essentiel de mieux comprendre les mécanismes de régulation du catabolisme du TRP afin de développer des biomarqueurs précoces pour ces pathologies et de rechercher des cibles thérapeutiques. Les cellules épithéliales tubulaires altérées sécrètent différents métabolites qui peuvent être détectés dans les urines : l'analyse des métabolites urinaires est particulièrement intéressante pour identifier des marqueurs de l'activité de la voie des kynurénines et de la synthèse *de novo* du NAD dans le rein et constitue une approche prometteuse pour identifier des marqueurs solubles de lésions rénales aiguës. Dans ce contexte, nous avons exploré les mécanismes de répression de la QPRT et la diminution de la synthèse du NAD dans le rein. Nous avons ensuite évalué la valeur diagnostique et pronostique des métabolites urinaires du TRP dans différents modèles de l'IRA. Ces travaux de thèse ont apporté des preuves que le facteur de stress cellulaire C/EBP homologous protein (CHOP) pouvait altérer la biosynthèse *de novo* du NAD en réprimant la transcription de QPRT. Nous avons également développé et validé une méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) visant à quantifier simultanément 9 des 14 métabolites de la voie des kynurénines dans le plasma et l'urine, et avons montré qu'un ratio urinaire quinolinate (QA)/TRP élevé était un biomarqueur prédictif précoce de la sévérité de l'IRA après une chirurgie cardiaque, et de la progression vers la MRC en transplantation rénale. Nous avons également montré que le ratio urinaire kynurénine (KYN)/TRP reflétait l'activité des lésions inflammatoires rénales.

En conclusion, ces travaux ont permis de montrer que l'altération de la biosynthèse *de novo* du NAD était un événement précoce dans l'IRA, lié à la réponse au stress du réticulum endoplasmique, et qu'une réduction persistante de l'expression de QPRT était associée à la progression de l'IRA vers la MRC. Enfin les ratios urinaires KYN/TRP et QA/TRP pourraient être proposés comme des biomarqueurs potentiels de la sévérité de différentes formes d'IRA.

**Mots clés :** Insuffisance rénale aiguë, stress du réticulum endoplasmique, nicotinamide adénine dinucléotide, voie des kynurénines, tryptophane, quinolinate, quinolinate phosphorybosyl transférase, spectrométrie de masse

**Title:** Modulation of *de novo* NAD biosynthesis in acute kidney injury

**Abstract:**

The kynurenine pathway is the primary pathway for tryptophan (TRP) catabolism and allows the production of kynurenines and *de novo* synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). NAD is an essential cofactor in the maintenance of renal cellular homeostasis. During acute kidney injury (AKI), a decrease in local NAD synthesis has been observed in connection with the repression of quinolinate phosphoribosyl transferase (QPRT), a key enzyme in *de novo* NAD biosynthesis.

The molecular mechanisms governing the reduction of QPRT expression in ischemic AKI, as well as the role of impaired NAD biosynthesis in the progression to chronic kidney disease (CKD) are poorly understood. It is therefore essential to better understand the regulatory mechanisms of TRP catabolism in order to develop early biomarkers for these pathologies and to search for therapeutic targets. The altered tubular epithelial cells secrete different metabolites which can be detected in the urine: the analysis of urinary metabolites is particularly interesting to identify markers of the activity of the kynurenine pathway and of the *de novo* NAD synthesis in the kidney and constitutes a promising approach to identify predictive markers of acute kidney injuries. In this context, we sought to understand the mechanisms of QPRT repression and the reduction in NAD synthesis in the kidney. We then studied the diagnostic and prognostic value of urinary TRP metabolites in different AKI models.

This thesis work provided evidence that the cellular stress factor C/EBP homologous protein (CHOP) could alter *de novo* NAD biosynthesis by repressing QPRT transcription. We also developed and validated a reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the simultaneous quantification of 9 of the 14 metabolites of the kynurenine pathway in plasma and urine, and showed that a high urinary quinolinate (QA)/TRP ratio was an early biomarker of AKI severity after cardiac surgery and predicted progression to CKD in kidney transplantation. We also showed that the urinary kynurenine (KYN)/TRP ratio reflected the activity of renal inflammatory lesions.

In conclusion, this work showed that the alteration of *de novo* NAD biosynthesis was an early event in AKI, linked to endoplasmic reticulum stress response, and that a persistent reduction in the expression of QPRT was associated with progression from AKI to CKD. Finally, the urinary KYN/TRP and QA/TRP ratios could be proposed as potential biomarkers for the severity of different forms of AKI.

**Keywords:** Acute kidney injury, endoplasmic reticulum stress, nicotinamide adenine dinucleotide, kynurenine pathway, tryptophan, quinolinate, quinolinate phosphorybosyl transferase, mass spectrometry

# Remerciements

## **A Monsieur le Professeur Nicolas PALLET,**

Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour tout l'accompagnement et les précieux conseils que vous m'avez prodigués au cours de mes trois années de thèse, mais aussi depuis que j'ai intégré votre équipe lors de mon master de recherche en 2019. Votre disponibilité inébranlable, votre gentillesse, et votre confiance m'ont permis de progresser et de m'épanouir pleinement. Votre méthode de travail exemplaire a toujours été une source d'inspiration pour moi, m'encourageant à viser l'excellence. Pour tout cela, je vous adresse un sincère et chaleureux merci.

## **A Monsieur le Docteur Pierre GALICHON,**

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour votre aimable participation en tant que président du jury de ma thèse. Votre implication remarquable dans ce projet passionnant a été précieuse, et je suis honoré que vous ayez fait partie de mon comité de suivi de thèse pendant ces trois années.

## **A Monsieur le Docteur Joost-Peter SCHANSTRA,**

Pour l'honneur que vous me faites de juger cette thèse et pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

## **A Madame le Professeur Sophie DE SEIGNEUX,**

Merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'être rapportrice de ma thèse, c'est un grand honneur pour moi.

## **A Monsieur le Professeur Alexandre HERTIG,**

Sincères remerciements pour avoir accepté d'évaluer mon travail et de siéger en tant que membre du jury.

## **A Madame le Docteur Juliette HADCHOUEL,**

Merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse, et d'évaluer ce travail.

## **A Monsieur le Professeur Olivier LAPREVOTE,**

Pour votre contribution à ma formation en spectrométrie de masse, pour vos précieux conseils et votre participation au sein de mon comité de suivi de thèse. C'est un grand honneur pour moi.

**A Madame le Professeur Marie-Anne LORIOT,**

De m'avoir accueillie dans votre service et pour m'avoir permis d'accomplir cette thèse grâce à votre soutien constant, vos encouragements et votre confiance inconditionnelle. Votre appui précieux a largement contribué à l'évolution de ma carrière professionnelle. Un grand merci pour cela.

**A Monsieur le Professeur Jean-Louis PAUL,**

Pour votre écoute, vos conseils, vos remarques pertinentes et surtout vos encouragements qui ont constamment nourri ma curiosité.

**A Madame le Docteur Virginie POINDESSOUS,**

Merci pour la formation sur les immunoblots, ton aide inestimable tout au long de mes années de thèse dans la réalisation des expérimentations et des dosages.

**A Monsieur le Dr Yohan BIGNON,**

De m'avoir formée en culture cellulaire et biologie moléculaire, et de m'avoir transmis ta rigueur et ta passion pour la recherche.

**A Monsieur Christophe SIMIAN,**

Pour ton aide précieuse dans le développement analytique que nous avons accompli sur la plateforme de spectrométrie de masse de l'HEGP. Travailler avec toi est un immense plaisir.

**A l'ensemble du personnel de l'équipe MEPPOT du centre de recherche des cordeliers, et du service de Biochimie de l'HEGP,** je tiens à vous témoigner ma gratitude pour votre immense travail tous les jours pour développer et améliorer la santé et la recherche.

**A mes parents, mes frères et sœurs,** pour m'avoir soutenue tout au long de ces années de thèse.

**A mon mari Amine,** pour ton amour constant, ton soutien indéfectible, tes précieux conseils et tes encouragements sans faille.

**A mon cher fils Anas,** ma joie de vivre. Tu es une source d'encouragement et de réconfort précieuse.

# Table des matières

Remerciements.....	1
Liste des principales abréviations.....	5
Liste des figures et des tableaux .....	8
Préambule.....	9
<b>PARTIE 1 : INTRODUCTION.....</b>	<b>10</b>
<b>I. Généralités sur l'insuffisance rénale aiguë (IRA).....</b>	<b>11</b>
1. Définition de l'IRA .....	11
2. Classification, épidémiologie et étiologies de l'IRA .....	11
2.1. Classification.....	11
2.2. Epidémiologie .....	13
2.3. Etiologies.....	14
2.3.1. IRA pré-rénale.....	14
2.3.2. IRA post-rénale .....	15
2.3.3. IRA intra-rénale.....	15
2.3.3.1. IRA avec atteinte glomérulaire .....	15
2.3.3.2. IRA avec atteinte tubulaire .....	15
3. Evolution de l'IRA et ses conséquences cliniques .....	17
<b>II. Implication du stress du réticulum endoplasmique (RE) dans la maladie rénale.....</b>	<b>19</b>
1. Voies du stress du RE .....	20
2. Facteurs inducteurs du stress du RE.....	22
3. Effets du facteur de transcription CHOP sur le rein.....	23
<b>III. Rôle de l'altération du métabolisme énergétique et de la biosynthèse du NAD dans la physiopathologie rénale.....</b>	<b>25</b>
1. Métabolisme du NAD.....	27
1.1. Production du NAD .....	28
1.1.1. Voie Preiss-Handler.....	29
1.1.2. Voies de récupération du NAD.....	29
1.1.3. Voie de biosynthèse <i>de novo</i> du NAD.....	29
1.2. Fonctions biologiques du NAD .....	31
1.2.1. Rôle du NAD comme cofacteur dans les réactions d'oxydoréduction.....	32
1.2.2. Rôle du NAD comme substrat enzymatique.....	35
2. Altérations du métabolisme rénal du NAD .....	38
2.1. Causes de la diminution du NAD dans le rein .....	39
2.1.1. Altération de la production du NAD .....	39

2.1.1.1.	Altération de la synthèse du NAD au cours de l'IRA.....	39
2.1.1.2.	Altération de la synthèse du NAD au cours de la MRC.....	41
2.1.2.	Accélération de la consommation du NAD.....	43
2.2.	Conséquences cellulaires d'une réduction du NAD.....	44
3.	Potentiel thérapeutique du NAD dans les maladies rénales.....	45
IV.	Catabolisme du TRP, activation de la voie des kynurénines en physiopathologie rénale.....	52
1.	Description de la voie des kynurénines.....	52
2.	Fonctions des catabolites de la voie des kynurénines dans le rein.....	52
3.	Activation de la voie des kynurénines en pathologie rénale.....	55
3.1.	Activation de la voie des kynurénines au cours de l'IRA.....	55
3.2.	Activation de la voie des kynurénines au cours de la MRC.....	56
4.	Suivi de l'IRA par les métabolites de la voie des kynurénines.....	58
4.1.	Intérêt du ratio urinaire QA/TRP.....	58
4.2.	Intérêt des autres métabolites de la voie des kynurénines.....	58
4.3.	Dosage des métabolites de la voie des kynurénines.....	59
4.3.1.	Méthodes d'analyse des métabolites du TRP.....	59
4.3.2.	Dosage des métabolites du TRP par LC-MS/MS.....	61
	<b>PARTIE 2 : OBJECTIFS ET PRESENTATION DES TRAVAUX.....</b>	<b>65</b>
	<b>OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>66</b>
	<b>PRESENTATION DES TRAVAUX.....</b>	<b>67</b>
	<b>AXE 1. Mécanisme de régulation de la voie de synthèse <i>de novo</i> de NAD au cours de l'IRA et de la transition de l'IRA vers la MRC.....</b>	<b>67</b>
	<b>Etude 1. Mécanisme et conséquences de la régulation de la voie de synthèse <i>de novo</i> de NAD par le stress du re dans le rein.....</b>	<b>67</b>
	<b>AXE 2. Suivi de l'IRA par les métabolites de la voie des kynurénines.....</b>	<b>111</b>
	<b>Etude 1. Mise au point et validation d'une technique de quantification des métabolites de la voie des kynurénines dans le plasma et l'urine par LC-MS/MS et suivi de l'activité de la voie lors d'IRA consécutive à une chirurgie cardiaque sous CEC.....</b>	<b>111</b>
	<b>Etude 2. Suivi de l'activité de la voie des kynurénines dans un modèle porcin de glomérulonéphrite aiguë extra-capillaire.....</b>	<b>140</b>
	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>169</b>
	<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>177</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>178</b>
	<b>Annexes.....</b>	<b>205</b>



# Liste des principales abréviations

<b>ACMS</b>	Acide 2-amino-3-carboxymuconique-6-sémialdéhyde
<b>ACMSD</b>	Aminocarboxymuconate-semialdéhyde décarboxylase
<b>ADQI</b>	Acute Disease Quality Initiative
<b>AGHI</b>	Acides gras hautement insaturés
<b>AGPI</b>	Acides gras polyinsaturés
<b>AhR</b>	Récepteur de l'hydrocarbure aromatique
<b>AKI</b>	Acute kidney injury
<b>AMPAR</b>	Récepteur de l' $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate
<b>AMS</b>	2-Aminomuconate semialdéhyde
<b>AMSD</b>	2-Aminomuconate-6-semialdehyde dehydrogenase
<b>ANCA</b>	Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies
<b>AOx</b>	Aldehyde oxidase
<b>ATF4</b>	Activating transcription factor 4
<b>ATF6</b>	Activating transcription factor-6
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BFA</b>	Bréféldine A
<b>BIP</b>	Immunoglobulin heavy chain binding protein
<b>CACT</b>	Carnitine acyl-carnitine translocase
<b>cADPRs</b>	Synthétases d'ADP-ribose cyclique
<b>CDs</b>	Cellules dendritiques
<b>C/EBP</b>	CCAAT/enhancer binding proteins
<b>CEC</b>	Circulation extracorporelle
<b>CHOP</b>	C/EBP homologous protein
<b>COVID-19</b>	SARS-CoV-2
<b>CPT1</b>	Carnitine palmitoyl transferase 1
<b>CPT2</b>	Carnitine palmitoyl transferase 2
<b>CTP</b>	Cellules tubulaires proximales
<b>DDIT3</b>	DNA damage inducible transcript 3
<b>DFG</b>	Débit de filtration glomérulaire
<b>DHAP</b>	Dihydroxyacétone phosphate
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>EER</b>	Épuration extra-rénale
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha
<b>EMA</b>	European Medicines Agency
<b>ERAD</b>	Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation
<b>ESRD</b>	End Stage Renal Disease (Insuffisance rénale terminale)
<b>FAD</b>	Flavine adénine dinucléotide
<b>FAO</b>	$\beta$ -Oxydation (Fatty acid oxydation)
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GADD153</b>	Growth arrestand DNA damage-inducible gene 153
<b>G3P</b>	Glycéraldéhyde 3-phosphate
<b>GNC</b>	Glomérulonéphrite aiguë à croissants
<b>GPR35</b>	Récepteur couplé à la protéine G35
<b>GRP78</b>	Glucose-regulated protein 78
<b>HAAO</b>	3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase
<b>3-HANA</b>	Acide 3-hydroxyanthranilique
<b>HEK 293</b>	Human embryonic kidney 293
<b>HK-2</b>	Human kidney 2
<b>3-HK</b>	3-Hydroxykynurénine
<b>H2O2</b>	Peroxyde d'hydrogène

<b>HUFA</b>	Highly unsaturated fatty acid
<b>IDO</b>	Indoléamine 2,3-dioxygénase
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interféron- $\gamma$
<b>IR</b>	Ischémie-reperfusion
<b>IRA</b>	Insuffisance rénale aiguë
<b>IRE1</b>	Inositol-requiring enzyme 1
<b>KA</b>	Acide kynurénique
<b>KAT</b>	Kynurénine aminotransférase
<b>KDIGO</b>	Kidney Disease Improval Global Outcomes
<b>KIM-1</b>	Kidney Injury Molecule-1
<b>KMO</b>	Kynurénine 3-monooxygenase
<b>KYN</b>	Kynurénine
<b>KYNU</b>	Kynurénase
<b>LC</b>	Chromatographie liquide
<b>LC-MS/MS</b>	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides
<b>m/z</b>	Masse/Charge
<b>MNA</b>	1-Methylnicotinamide
<b>MRC</b>	Maladie rénale chronique
<b>NA</b>	Acide nicotinique
<b>NAAD</b>	Nicotinate adénosine diphosphate
<b>NAD</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>NADP</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NADS</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide synthétase
<b>NAM</b>	Nicotinamide
<b>NAMN</b>	Nicotinamide adénine mononucléotide
<b>NAMPT</b>	Nicotinamide phosphoribosyl transférase
<b>NAPRT</b>	Nicotinate phosphoribosyl transférase
<b>NGAL</b>	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
<b>NIA</b>	Néphropathie interstitielle aiguë
<b>NMDAR</b>	Récepteurs du glutamate, récepteurs N-méthyl-D-aspartate
<b>N-Me-2PY</b>	N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide
<b>N-Me-4PY</b>	N-methyl-4-pyridone-3-carboxamide
<b>NMN</b>	Mononucléotide nicotinamide
<b>NMNAT</b>	Nicotinamide mononucléotide adénylyl transférase
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>NOX4</b>	NADPH oxydase rénale
<b>NR</b>	Nicotinamide riboside
<b>NRK</b>	Nicotinamide riboside kinase
<b>O2-</b>	Anion superoxyde
<b>OAT1</b>	Organic anion transporter 1
<b>OAT3</b>	Organic anion transporter 3
<b>OUU</b>	Obstruction unilatérale de l'urètre
<b>PARPi</b>	Inhibiteurs de PARPs
<b>PARPs</b>	Poly (adénosine diphosphate-ribose) polymérase
<b>PERK</b>	PKR-like ER-associated protein kinase
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha
<b>PIC</b>	Picolinate
<b>POD-ATTAC</b>	Podocytes- Apoptosis Through Targeted Activation of Caspase-8
<b>PUFA</b>	Polyunsaturated fatty acid
<b>QA</b>	Quinolate
<b>QPRT</b>	Quinolate phosphoribosyl transférase
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>ROS</b>	Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)
<b>SIRT6</b>	Sirtuines

<b>SRE</b>	Stress du réticulum endoplasmique
<b>STZ</b>	Streptozotocine
<b>TCA</b>	Acide tricarboxylique
<b>TDO</b>	Tryptophane 2,3 dioxygénase
<b>TEM</b>	Transition épithélio-mésenchymateuse
<b>Tg</b>	Thapsigargine
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor $\beta$
<b>TRP</b>	Tryptophane
<b>Tun</b>	Tunicamycine
<b>TUs</b>	Toxines urémiques
<b>UPR</b>	Unfolded Protein Response
<b>USI</b>	Unité de soins intensifs
<b>XA</b>	Acide xanthurénique
<b>XBP1</b>	X-Box Binding Protein 1

# Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Incidence de l'IRA en milieu hospitalier. ....	14
Figure 2 : Causes de l'IRA. ....	17
Figure 3 : Evolution et conséquences de l'IRA. ....	18
Figure 4 : L'interconnexion entre l'IRA et la MRC. ....	19
Figure 5 : Voies de signalisation du stress du RE. ....	21
Figure 6 : Structure du facteur de transcription CHOP. ....	23
Figure 7: Voies apoptotiques dépendantes de CHOP lors du stress du RE. ....	24
Figure 8 : Métabolisme énergétique dans le tubule proximal sain. ....	26
Figure 9 : Structure du NAD. ....	27
Figure 10 : Voies de synthèses du NAD. ....	28
Figure 11 : Catabolisme du tryptophane (TRP) via la voie des kynurénines. ....	30
Figure 12 : Rôles clés du NAD dans l'organisme. ....	31
Figure 13 : Réaction redox du couple NAD <sup>+</sup> /NADH. ....	32
Figure 14 : Métabolisme du NAD dans les différents compartiments cellulaires. ....	33
Figure 15 : Schémas de la chaîne respiratoire et de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative. ....	34
Figure 16 : Principales enzymes consommatrices du NAD. ....	35
Figure 17 : Régulation de l'expression génique par le NAD. ....	36
Figure 18 : Homéostasie du NAD dans le rein. ....	38
Figure 19 : Implication de PGC1 $\alpha$ dans la diminution du NAD au cours de l'IRA. ....	40
Figure 20 : Dérégulation du métabolisme du NAD au cours de la MRC. ....	43
Figure 21 : Effets immunomodulateurs de la voie des kynurénines au cours de l'inflammation. ....	53
Figure 22 : Effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires de l'acide kynurénique. ....	54
Figure 23 : Mécanisme de sécrétion des anions organiques par le tubule proximal. ....	57
Figure 24 : Comparaison des méthodes chromatographiques d'analyse des métabolites du TRP. ....	60
Figure 25 : Principales étapes d'analyse par spectrométrie de masse. ....	61
Figure 26 : Processus d'analyse en LC-MS/MS. ....	63
Figure 27 : Effet du stress du RE sur l'expression de PGC1 $\alpha$ dans les cellules HK-2. ....	171
Figure 28 : Effet de la down-régulation et de la surexpression de CHOP sur PGC1 $\alpha$ dans les cellules HK-2 en condition de stress de RE. ....	172
Tableau 1: Stades de l'IRA selon la classification KDIGO 2012. ....	12
Tableau 2 : Nouvelle classification de l'IRA proposée par le groupe international ADQI en 2020. ....	13
Tableau 3 : Synthèse des essais cliniques des précurseurs du NAD en lien avec l'IRA et la MRC. ....	49

# Préambule

Ce travail de thèse porte sur l'étude du rôle de l'activité de la voie catabolique du tryptophane (TRP) caractérisée par la production des kynurénines et aboutissant à la synthèse *de novo* du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) au cours de l'insuffisance rénale aiguë (IRA) et dans le développement des lésions rénales chroniques.

L'une des voies énergétiques essentielles au maintien de l'homéostasie rénale est la voie de synthèse *de novo* du NAD à partir du TRP et les causes de diminution du NAD sont peu connues en pathologie rénale. Ainsi, le premier objectif de cette thèse a été d'étudier les mécanismes de réduction de la biosynthèse du NAD au cours de l'IRA, et dans la progression de la maladie rénale chronique. Nous avons montré que le stress du réticulum endoplasmique jouait un rôle dans la diminution du contenu intracellulaire du NAD, et que le facteur de transcription C/EBP homologous protein (CHOP) était impliqué dans la répression de la quinolinate phosphoribosyl transférase (QPRT), une enzyme clé de la synthèse *de novo* du NAD dans les cellules tubulaires rénales.

Le deuxième objectif de la thèse a été de quantifier les métabolites de la voie des kynurénines par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) dans l'urine et/ou le plasma. Cette méthode a permis de décrire les modifications éventuelles de la voie des kynurénines dans deux modèles (humain et porcin) de l'IRA afin d'identifier des biomarqueurs lésionnels précoces. Le premier travail sur l'IRA ischémique post-chirurgie cardiaque sous circulation extracorporelle chez l'Homme a permis de montrer que le ratio urinaire quinolinate/TRP (QA/TRP) pourrait être proposé comme biomarqueur pronostique potentiel dans l'IRA post-chirurgie cardiaque. La deuxième étude expérimentale sur un modèle porcin de glomérulonéphrite aiguë à croissants (GNC) a montré que le ratio urinaire kynurénine/TRP (KYN/TRP) était indépendant de la protéinurie et pourrait refléter l'activité des lésions inflammatoires dans le rein atteint. Ces résultats suggèrent que des niveaux élevés du ratio KYN/TRP dans les urines des patients atteints de GNC sont le reflet d'une activité précoce de la maladie.

# **PARTIE 1 : INTRODUCTION**

## **I. Généralités sur l'insuffisance rénale aiguë (IRA)**

### **1. Définition de l'IRA**

L'insuffisance rénale aiguë (IRA), ou acute kidney injury (AKI), est un syndrome regroupant l'ensemble des conditions induisant une diminution rapide des fonctions d'épuration des solutés de rétention urémique et de maintien de la composition hydroélectrolytique de l'organisme, assurées par les reins. Elle est définie par une perte soudaine de la fonction rénale qui est déterminée sur la base d'une augmentation des taux de créatinine plasmatique, un marqueur de la fonction d'excrétion rénale, et d'une diminution du débit urinaire sur une période de moins de 7 jours [1].

### **2. Classification, épidémiologie et étiologies de l'IRA**

#### **2.1. Classification**

Malgré une définition théorique simple, trouver des critères diagnostiques clairs et sensibles de l'IRA s'avère complexe. Avant 2004, malgré l'utilisation des critères diagnostiques usuels basés sur des marqueurs plasmatiques de la filtration rénale et de la diurèse, plus de 30 définitions ont été utilisées dans la littérature créant beaucoup de confusion et rendant les comparaisons des travaux scientifiques sur l'IRA difficiles. La définition de l'IRA a évolué au fil des années à la recherche de critères de diagnostic et de stadification plus précis pour standardiser les pratiques cliniques et les travaux de recherche. L'objectif était de proposer des critères diagnostiques et cliniques simples à réaliser en routine, peu coûteux avec une haute sensibilité et spécificité pour détecter l'IRA et déterminer sa sévérité afin de proposer une approche thérapeutique adéquate. Ainsi, plusieurs définitions se sont succédées (RIFLE, AKIN) ces dernières années pour aboutir à la classification internationale actuelle issue des recommandations KDIGO (Kidney Disease Improval Global Outcomes) de 2012 qui se base sur les changements de la créatininémie et de la diurèse pour diagnostiquer l'IRA et évaluer sa gravité [1].

Actuellement, L'IRA est définie consensuellement sur la base de marqueurs fonctionnels qui sont le reflet de la fonction de filtration rénale (**Tableau 1**). Le diagnostic de l'IRA est posé si au moins un de ces quatre critères est présent :

- Augmentation de la créatininémie de  $26,5 \mu\text{mol/l}$  ou  $0,3 \text{ mg/dl}$  sur une période de 48 heures ;
- Augmentation de la créatininémie de 1,5 fois la valeur de base qui est connue ou présumée s'être produite au cours des 7 jours précédents ;
- Diminution de la diurèse horaire  $< 0,5 \text{ ml/kg/h}$  sur une durée minimale de 6 heures ;

- Nécessité de recours à l'épuration extra-rénale (EER).

Ces recommandations fournissent également une classification de l'IRA où sont définis trois stades croissants de sévérité, basés sur :

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

**Tableau 1: Stades de l'IRA selon la classification KDIGO 2012 [1].**

Stade	Créatininémie	Diurèse	EER
1	1,5 - 1,9 fois la créatininémie de base en $\leq 7$ jours Ou $\geq 0,3$ mg/dl ( $\leq 26,5$ $\mu$ mol/l) $\leq 48$ h	$< 0,5$ ml/kg/h pendant 6 - 12 h	NON
2	2,0 - 2,9 fois la créatininémie de base en $\leq 7$ jours	$< 0,5$ ml/kg/h pendant $\geq 12$ h	NON
3	$\geq 3,0$ fois la créatininémie de base en $\leq 7$ jours Ou $\geq 4,0$ mg/dl ( $\geq 353$ $\mu$ mol/l) Ou Chez patient $< 18$ ans, baisse du débit de filtration glomérulaire jusqu'à $< 35$ ml/min/1,73 m <sup>2</sup>	$< 0,3$ ml/kg/h pendant $\geq 24$ h Ou Anurie pendant $\geq 12$ h	OUI

*EER : épuration extra-rénale*

Il est à noter que la classification KDIGO présente de nombreuses limites : 1) le diagnostic est retardé de 24-48h par rapport à l'altération de la filtration rénale, 2) elle ne prend pas en compte le type et l'étendue des lésions rénales, et 3) ne fait pas de distinction en fonction de l'étiologie de l'IRA. Cette classification est amenée à évoluer avec les nouvelles connaissances et l'émergence de nouveaux biomarqueurs sanguins et urinaires de dommages rénaux tels que NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), ou KIM-1 (kidney injury molecule-1) [2]. Ces derniers, lorsqu'ils sont élevés, indiquent la présence de lésions rénales structurelles avant même la perte de la fonction rénale. Cette IRA subclinique, qui est considérée comme un facteur de risque d'évolution vers une IRA selon la définition KDIGO, est classée en stade 1S dans la nouvelle classification de l'IRA proposée en 2020 par le groupe international « Acute Disease Quality Initiative » (ADQI) (Tableau 2). Cette nouvelle classification ADQI propose une définition étendue de l'IRA, qui inclut en plus des biomarqueurs fonctionnels, les biomarqueurs de dommage rénal pour améliorer le diagnostic et la stadification de la sévérité de l'IRA [3]. Cependant, avant d'utiliser cette nouvelle définition dans la pratique clinique quotidienne, des recherches supplémentaires sur de larges cohortes de patients sont nécessaires pour évaluer si



l'élévation de ces nouveaux biomarqueurs est associée à une aggravation de l'atteinte rénale et de l'état de santé des patients indépendamment de toute modification de la diurèse ou de la créatininémie [4].

**Tableau 2 : Nouvelle classification de l'IRA proposée par le groupe international ADQI en 2020.** Extrait de la revue de Kellum, 2021.

Stade	Critères fonctionnels	Critères lésionnels (Biomarqueurs)
<b>1S</b>	< 1,5 fois la créatininémie de base en $\leq 7$ jours Et Augmentation de la créatininémie < 0,3 mg/dl Et Diurèse horaire $\geq 0,5$ ml/kg/h	+
<b>1A</b>	1,5 - 1,9 fois la créatininémie de base en $\leq 7$ jours Ou $\geq 0,3$ mg/dl ( $\geq 26,5$ $\mu\text{mol/l}$ ) $\leq 48$ h	-
<b>1B</b>	Ou Diurèse < 0,5 ml/kg/h pendant 6 - 12 h	+
<b>2A</b>	2,0-2,9 fois la créatininémie de base en $\leq 7$ jours Ou	-
<b>2B</b>	Diurèse < 0,5 ml/kg/h pendant $\geq 12$ h	+
<b>3A</b>	$\geq 3,0$ fois la créatininémie de base en $\leq 7$ jours Ou $\geq 4,0$ mg/dl ( $\geq 353$ $\mu\text{mol/l}$ ) Ou Chez patient < 18 ans, baisse du débit de filtration glomérulaire jusqu'à < 35 ml/min/1,73 m <sup>2</sup>	-
<b>3B</b>	Ou Diurèse < 0,3 ml/kg/h pendant $\geq 24$ h Ou Anurie pendant $\geq 12$ h Ou Recours à l'épuration extra-rénale	+

## 2.2. Epidémiologie

L'IRA est un problème de santé fréquemment rencontré chez les patients hospitalisés et son incidence est en augmentation, en particulier chez les personnes âgées et celles qui présentent d'autres comorbidités telles que la maladie rénale chronique (MRC) et l'hypertension artérielle [5].

Le taux de morbidité liée à l'IRA est élevé, avec une mortalité mondiale qui reste élevée au cours des 50 dernières années [4]. De nombreuses études ont été réalisées pour estimer l'incidence de l'IRA [4,6–8]. Cette incidence varie en fonction du type d'étude, du lieu de l'étude et de la durée de l'observation. De plus, l'utilisation de critères différents pour définir l'IRA ont rendu impossible la détermination précise de son épidémiologie. Depuis une dizaine d'années,

grâce à l'utilisation de critères standards internationaux (KDIGO 2012), il est maintenant plus facile d'estimer l'incidence et la prévalence de l'IRA et de comparer les résultats entre les centres [4,6] de façon plus objective. Selon une méta-analyse de 154 études ayant défini l'IRA selon la classification KDIGO, l'incidence de l'IRA est estimée entre 8,3 % et 31,7 %. La mortalité moyenne liée à l'IRA est de 23 %, mais atteint 49,4 % chez les patients nécessitant une EER [6]. Bien que l'IRA soit présente dans le monde entier, il existe des disparités géographiques importantes en ce qui concerne son incidence, ses causes et son pronostic (**Figure 1** : **Incidence de l'IRA en milieu hospitalier**. Extrait de la revue de Ronco et *al.*, 2019. ). Dans les pays à revenu élevé, l'IRA est principalement nosocomiale, associée notamment aux interventions post-chirurgicales et aux causes iatrogènes. En revanche, dans les pays à faible revenu, l'IRA d'origine communautaire est plus fréquente et peut résulter de facteurs tels que la septicémie, la déshydratation, les toxines (piqûres, remèdes) et la grossesse [4].



**Figure 1 : Incidence de l'IRA en milieu hospitalier.** Extrait de la revue de Ronco et *al.*, 2019.

### 2.3. Etiologies

L'IRA est un terme qui regroupe un ensemble de situations hétérogènes en termes d'étiologie, de mécanisme lésionnel, de degré de sévérité et d'altérations fonctionnelles qu'elles entraînent. Les principales causes de l'IRA sont divisées en trois catégories selon l'origine de la perturbation de la fonction rénale : pré-rénale, post-rénale, et intra-rénale [9].

#### 2.3.1. IRA pré-rénale

Les IRA pré-rénales sont d'origine fonctionnelle, sans lésions tissulaires associées, et souvent réversibles. Elles sont liées à une diminution de la perfusion du rein, et donc d'une chute du

débit de filtration glomérulaire (DFG) secondaire à une réduction du volume intravasculaire (hypovolémie). La diminution du débit sanguin rénal peut être causée par divers facteurs tels que la déshydratation ou les pertes hémorragiques (vraie hypovolémie), la vasodilatation périphérique, la baisse de la pression artérielle suite à un choc septique, la réduction du débit cardiaque en cas de dysfonctionnement cardiaque, la thrombose de l'artère rénale ou encore, la diminution de la pression oncotique sanguine, comme dans le cas d'un syndrome néphrotique.

### **2.3.2. IRA post-rénale**

Les IRA post-rénales sont causées par une obstruction des voies urinaires qui empêche l'écoulement normal de l'urine en aval des reins. Cette obstruction peut être située dans la vessie, en dessous ou au-dessus de celle-ci, et peut affecter un ou les deux reins. L'obstruction entraîne une accumulation d'urine en amont et une augmentation de la pression hydrostatique urinaire qui se propage jusqu'à la chambre urinaire, entravant ainsi la filtration glomérulaire. Les causes courantes incluent l'hypertrophie de la prostate, les calculs rénaux et les tumeurs de la vessie.

### **2.3.3. IRA intra-rénale**

Les IRA intra-rénales ou parenchymateuses sont classées selon la localisation histologique de la lésion, qui se trouve le plus souvent au niveau du glomérule ou du tubule rénal, mais qui peut également affecter les parties interstitielles ou vasculaires du rein. C'est cette classe d'IRA qui nous intéressera par la suite dans mes travaux de thèse.

#### **2.3.3.1. IRA avec atteinte glomérulaire**

Elles définissent essentiellement les syndromes de glomérulonéphrite rapidement progressive (GNRP) et les syndromes néphritiques aigus. Ce type d'IRA est caractérisé par des dommages structurels des glomérules, causés par une inflammation aiguë extra ou endo-capillaire. On retrouve les vascularites primitives des petits vaisseaux dont les vascularites à ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies), la maladie de Goodpasture par anticorps anti-membrane basale glomérulaire, et les maladies à dépôts de complexes immuns incluant le lupus érythémateux disséminé, le purpura rhumatoïde, la cryoglobulinémie et la glomérulonéphrite aiguë post-infectieuse.

#### **2.3.3.2. IRA avec atteinte tubulaire**

Elles sont la forme d'IRA la plus fréquente, et c'est en général celle sur laquelle se basent les classifications diagnostiques décrites plus haut [9]. Les lésions des cellules tubulaires rénales sont causées par une ischémie liée à une diminution prolongée et/ou sévère de la perfusion sanguine rénale ou par l'exposition à des substances néphrotoxiques.

Les causes ischémiques comprennent des périodes prolongées et/ou sévères d'hypotension, d'hypovolémie ou d'hypoperfusion rénale. La déshydratation extra-cellulaire, le choc hémorragique, l'insuffisance cardiaque, le syndrome hépatorénal, la congestion veineuse ou la vasoconstriction réduisent de façon transitoire le DFG sans atteintes parenchymateuses, mais à mesure que l'ischémie persiste, peuvent apparaître des lésions tubulaires [4]. Toutes les IRA fonctionnelles précédemment décrites, lorsqu'elles sont sévères ou prolongées, peuvent évoluer vers une atteinte lésionnelle de ce type.

Les médicaments néphrotoxiques (aminosides, cisplatine, ciclosporine par exemple) et les produits de contraste iodés sont également des causes d'IRA par toxicité directe [10]. Les lésions rénales liées aux médicaments surviennent par différents mécanismes. Les quatre principaux types de lésions tubulo-interstitielles sont :

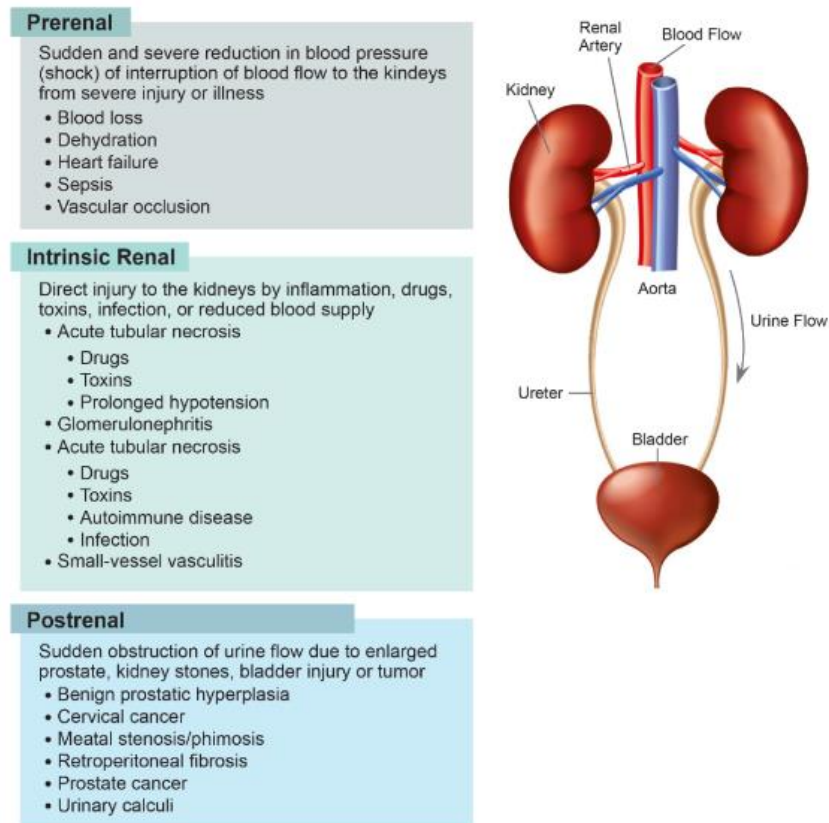
a) La nécrose tubulaire aiguë qui survient suite à une néphrotoxicité chimique directe en raison de l'exposition à certains médicaments tels que les chimiothérapies comme le cisplatine, les antimicrobiens comme les aminosides ou l'amphotéricine, et les antiviraux comme le tenofovir. Ces substances sont toxiques pour diverses fonctions cellulaires en particulier la fonction mitochondriale, et leurs voies d'excrétion et de réabsorption à travers les tubules proximaux contribuent à la survenue de l'IRA [10,11].

b) La néphropathie interstitielle aiguë (NIA) est une néphrotoxicité immuno-allergique induite suite à une inflammation dans le tubulo-interstitium et qui peut être causée par plusieurs médicaments tels que les bêta-lactamines, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens, les dérivés de sulfamide et les immunothérapies [10]. Ce type de médicaments déclenche une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T, favorisant le développement de la NIA qui conduit à l'IRA [4,10,12]. La NIA liée aux inhibiteurs de pompe à protons est de plus en plus fréquente, en particulier chez les personnes âgées [13]. De plus, les infections peuvent être à l'origine d'une NIA dans 5 % à 10 % des cas [13,14].

c) La nécrose tubulaire aiguë ischémique qui survient suite à une baisse substantielle et persistante de la perfusion rénale peut être observée avec certains médicaments, notamment les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les inhibiteurs des récepteurs de l'angiotensine, ou les inhibiteurs de la calcineurine [4,10,15].

d) La néphropathie cristalline résulte de l'insolubilité de certains médicaments (méthotrexate, sulfadiazine, inhibiteurs de protéases par exemple) dans l'urine, entraînant leur précipitation sous forme de cristaux dans les lumières tubulaires distales [10]. Elle se caractérise

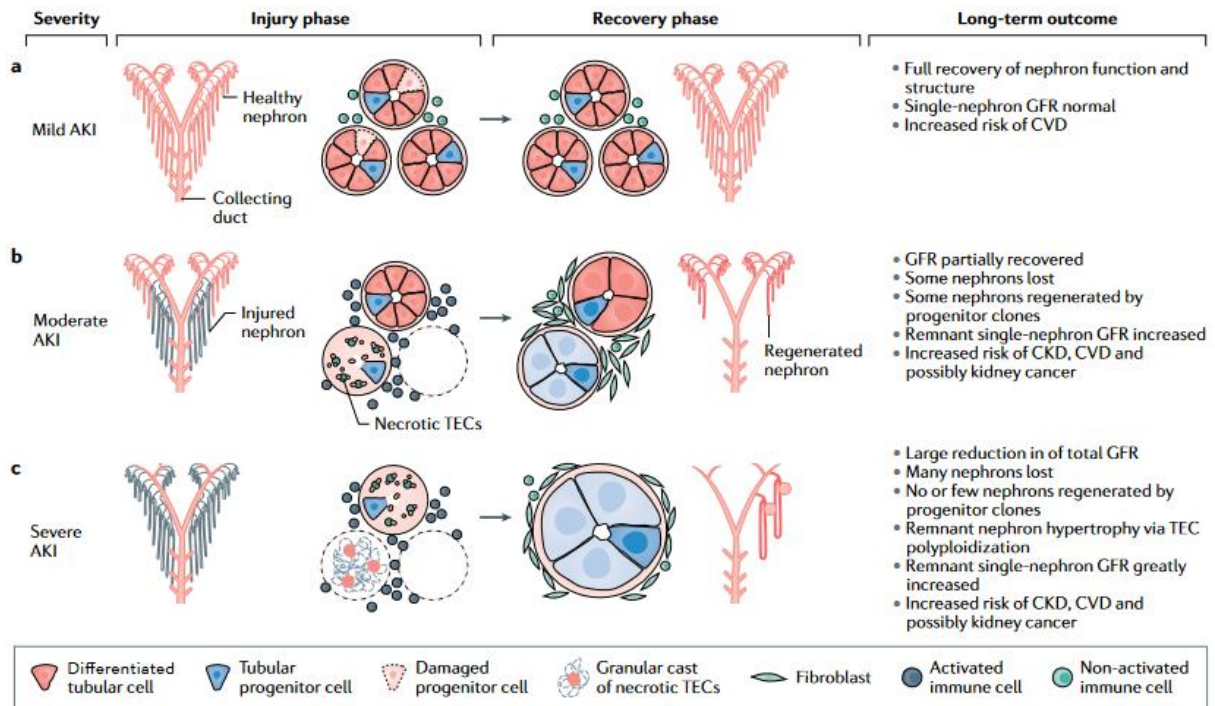
principalement par la présence histologique de dépôts de cristaux intra-tubulaires. L'obstruction intra-tubulaire et les lésions tubulaires toxiques et inflammatoires conduisent à l'IRA [4,10,16]. La **Figure 2** résumant cette classification étiologique de l'IRA montre bien l'extrême hétérogénéité de ce syndrome, et sert de base à la mise en place de stratégies diagnostiques et thérapeutiques.



**Figure 2 : Causes de l'IRA.** D'après Thongprayoon et *al.*, 2020.

### 3. Evolution de l'IRA et ses conséquences cliniques

Après un épisode d'IRA, la capacité de régénération de l'épithélium tubulaire dépend de la présence de cellules progénitrices dans les néphrons (**Figure 3**). La perte complète de ces cellules peut entraîner une perte irréversible du néphron. Le nombre de néphrons perdus lors d'un épisode d'IRA détermine le pronostic à long terme de la fonction rénale. Selon la gravité de l'IRA, un nombre limité, modéré, ou important de néphrons peut être irréversiblement détruit, ce qui entraîne une MRC et une réduction de la durée de vie des reins [4].

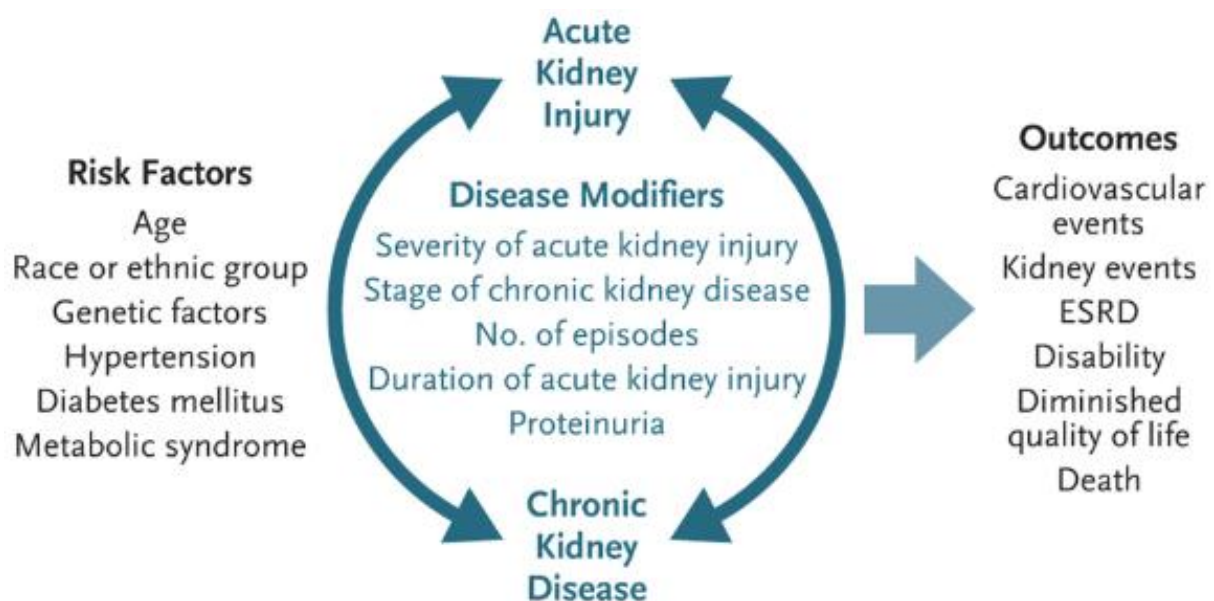


**Figure 3 : Evolution et conséquences de l'IRA.** D'après Kellum et *al.*, 2021.

La MRC est le résultat d'une détérioration irréversible des structures rénales - atrophie tubulaire, glomérulosclérose et artériosclérose – accompagnée d'une fibrose interstitielle, qui aboutissent à la perte de fonction du rein [17]. Elle est définie comme une anomalie de la structure ou de la fonction rénale diagnostiquée par un DFG anormal ( $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ ) ou une protéinurie persistante pendant plus de 3 mois. Les causes de la MRC les plus courantes sont la néphropathie diabétique, la néphroangiosclérose hypertensive, et les séquelles des glomérulonéphrites. Indépendamment de l'étiologie, une grande proportion de patients atteints de MRC peut éventuellement évoluer vers une insuffisance rénale terminale (ESRD, pour end stage renal disease), nécessitant la dialyse ou la transplantation rénale.

Depuis 2008, les études indiquent que l'IRA et la MRC sont fortement liées, avec des facteurs de risque et des conséquences similaires (**Figure 4**). La préexistence d'une MRC augmente d'un facteur 10 le risque de survenue d'une IRA. De même, les atteintes rénales aiguës qui se traduisent par une altération aiguë du parenchyme rénal [18] participent au développement ultérieur d'une MRC [19,20]. Des études observationnelles ont montré que l'IRA pouvait conduire à une nouvelle MRC, à la progression de la maladie existante, et à un risque accru d'insuffisance rénale terminale et de mortalité [4,21]. De plus, les survivants d'un épisode d'IRA peuvent avoir comme séquelle une hypertension artérielle, qui est alors considérée comme un signe d'une MRC subclinique. Une cohorte rétrospective a identifié, après ajustement sur des

facteurs démographiques, du statut de santé antérieur et des facteurs de risque cardiovasculaire, une augmentation de 22 % du risque d'hypertension artérielle (> 140/90 mmHg) chez les personnes ayant eu une IRA [22]. L'IRA est également associée à un risque accru à long terme de morbidité et de mortalité cardiovasculaires [4,23–25]. Une méta-analyse incluant 254 408 adultes (55 150 ayant eu une IRA) a montré que l'IRA augmentait le risque de développer une insuffisance cardiaque congestive de 58 %, un infarctus aigu du myocarde de 40 %, et un accident cardiovasculaire de 15 % [26]. Néanmoins, il n'est pas clair si cette augmentation de risque est liée à un effet sur le système cardiovasculaire pendant l'épisode d'IRA, ou à la MRC post-IRA [4].



**Figure 4 : L'interconnexion entre l'IRA et la MRC.** D'après Chawla *et al.*, 2014.

## II. Implication du stress du réticulum endoplasmique (RE) dans la maladie rénale

Les mécanismes cellulaires et moléculaires en jeu dans l'IRA, la transition de l'IRA vers la MRC et la progression de la MRC sont nombreux et complexes, et il n'est pas possible d'en faire la synthèse ici. Nous avons néanmoins tenu à décrire les grandes lignes d'un processus spécifique, le stress du réticulum endoplasmique (RE) car il s'agit d'une thématique de recherche de mon laboratoire d'accueil, et que le premier travail de thèse est centré dessus. De nombreuses maladies rénales, qu'elles soient aiguës ou chroniques, voient leur développement et leur progression liés au stress du RE [27–32]. En effet, le RE joue un rôle crucial dans le repliement et la maturation des protéines, et lorsque ce processus est perturbé, il peut entraîner l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE, induisant ainsi le stress du RE.

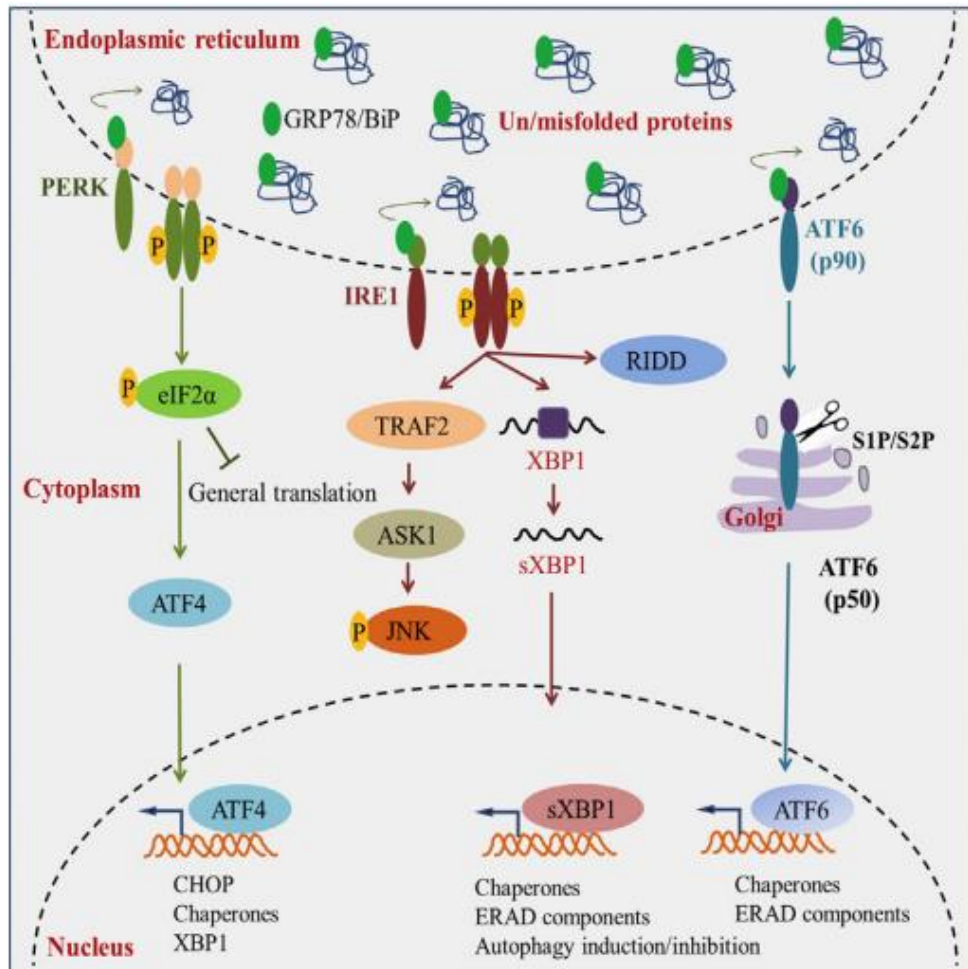
## 1. Voies du stress du RE

Le RE joue un rôle fondamental dans la maturation des protéines après leur traduction, grâce aux modifications post-traductionnelles qu'elles subissent dans la lumière du RE, telles que la glycosylation et l'acquisition d'une conformation tridimensionnelle spécifique. Les protéines mal conformées sont éliminées du RE et dégradées après ubiquitinylation par le système de dégradation associé au RE, appelé ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation) [33]. Cependant, dans certaines conditions (voir infra), la production de protéines mal conformées dans la lumière du RE peut excéder les capacités de dégradation basales par le protéasome via le système ERAD, et induire un stress au niveau du RE. En réaction à cette situation de stress, un mécanisme d'adaptation appelé la réponse UPR (Unfolded Protein Response) est activée [33]. La réponse UPR est une réponse dynamique au cours de laquelle des voies d'adaptation favorisant la survie cellulaire sont activées en parallèle des voies régulant la mort cellulaire programmée (apoptose). Selon l'intensité et la durée du stress du RE, la réponse UPR conduira à la survie ou à la mort cellulaire [33]. La réponse UPR comporte trois voies de signalisation, la voie IRE1-XBP1 (Inositol-requiring enzyme 1-X-Box Binding Protein 1), la voie ATF6 (activating transcription factor-6), et la voie PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 (PKR-like ER-associated protein kinase - eukaryotic translation initiation factor 2 alpha - Activating Transcription Factor 4) [33] (**Figure 5**). L'accumulation de protéines mal conformées dans le RE est détectée par trois protéines transmembranaires « senseurs » résidentes du RE : IRE1, ATF6 et PERK. A l'état basal, ces trois « senseurs » sont associés à la protéine chaperonne, immunoglobulin heavy chain binding protein (BIP), également connue sous le nom de GRP78 (glucose-regulated protein 78), qui les maintient dans un état inactif dans la membrane du RE. L'arrivée accrue de protéines mal conformées dans la lumière du RE déplace BIP des senseurs permettant ainsi l'activation de la réponse UPR [34].

Dans la Voie IRE1-XBP1, la dissociation de BIP de IRE1 induit la dimérisation et la transphosphorylation de IRE1. La protéine IRE1 activée provoque l'épissage de l'ARNm du facteur de transcription XBP-1 et sa traduction. La protéine sXBP1 (spliced XBP1) ainsi traduite migre dans le noyau et peut alors réguler positivement la transcription de gènes codant pour la réponse UPR, notamment les protéines chaperonnes et celles impliquées dans la maturation des protéines, ou encore dans la dégradation des protéines mal conformées par le système ERAD. L'activité endonucléasique d'IRE1 permet également une dégradation de certains ARNm par un mécanisme appelé RIDD (regulated IRE1-dependent RNA decay).



Dans la voie ATF6, La libération de ATF6 de BIP, lui permet de s'engager dans les vésicules COPII pour être transloqué vers l'appareil de golgi où il subit un double clivage protéolytique par SP1 (site 1 protease) et SP2 (site 2 protease) [35]. Le domaine amino-terminal d'ATF6 ainsi libéré, migre vers le noyau pour activer la transcription de gènes codant pour la réponse UPR comme la protéine chaperonne BIP/GRP78 et des protéines impliquées dans le repliement des protéines dans le RE et dans le système de dégradation ERAD. ATF6 peut également activer le facteur de transcription C/EBP homologue Protéine (CHOP) [36].



**Figure 5 : Voies de signalisation du stress du RE.** D'après Bhattarai et al., 2020.

Dans la voie PERK–eIF2–ATF4, la libération de la protéine kinase PERK de BIP, entraîne sa dimérisation et sa transphosphorylation dans sa partie cytosolique, ce qui active son domaine kinase [37]. En conséquence, PERK phosphoryle et inhibe le facteur d'initiation de traduction eIF2α. eIF2α phosphorylé réduit la traduction globale, diminuant ainsi la synthèse des protéines dans la lumière du RE. Cependant, la phosphorylation d'eIF2α permet la traduction sélective du facteur de transcription ATF4 et l'augmentation de la production de protéines chaperonnes et des capacités redox de la cellule. De plus, un mécanisme de rétrocontrôle négatif impliquant

CHOP entraîne la transcription de la protéine GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible 34), qui à son tour, induit la transcription de la protéine phosphatase 1c (PP1c). PP1c provoque la déphosphorylation de eIF2 $\alpha$ , ce qui atténue la voie PERK [38].

## **2. Facteurs inducteurs du stress du RE**

Une variété de facteurs internes et externes peut entraîner une accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE, induisant ainsi un stress du RE au sein des cellules rénales [34]. Parmi ces facteurs, nous trouvons :

- L'hypoxie et la carence en nutriments (par exemple, privation en glucose), qui génèrent un stress énergétique en raison d'une faible disponibilité de l'adénosine triphosphate (ATP).
- Les agents réducteurs tels que le dithiothréitol (DTT) et le 2-mercaptoéthanol, qui inhibent la formation des ponts disulfures, perturbant ainsi l'équilibre du statut redox.
- Les molécules interférant avec les enzymes de maturation protéique, telles que la tunicamycine (Tun), un inhibiteur de la N-glycosylation.
- Le déséquilibre de l'homéostasie calcique induit par la thapsigargine (Tg), un inhibiteur des canaux calciques SERCA (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase), entraînant une diminution de l'activité des chaperonnes dépendantes du calcium.
- Les inhibiteurs du transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi, comme la bréféldine A (BFA), qui provoquent une accumulation de protéines dans le RE.
- Les mutations touchant des résidus critiques dans la conformation tridimensionnelle des protéines, provoquant leur agrégation dans la lumière du RE.

Certaines maladies rénales héréditaires sont causées par la présence de protéines mutées mal conformées retenues dans la lumière du RE, induisant ainsi un stress du RE [39]. Dans les syndromes néphrotiques héréditaires, des mutations dans la néphrine (NPHS1), la podocine (NPHS2), la laminine  $\beta$ 2 (LAMB2) ou l'alpha actinine 4 (ACTN4) induisent un stress du RE dans les podocytes. Diverses mutations dans les chaînes  $\alpha$  du collagène IV (COL4A) ont été démontrées pour activer le stress du RE dans les néphropathies au collagène IV. Des mutations dans l'uromoduline (UMOD) ont été rapportées comme déclencheurs du stress du RE tubulaire dans la néphropathie tubulo-interstitielle autosomique dominante [40].

Dans le cas de l'IRA, le stress du RE est déclenché par des facteurs tels que l'exposition à des substances néphrotoxiques ou l'ischémie-reperfusion (IR) rénale [28,41,42].

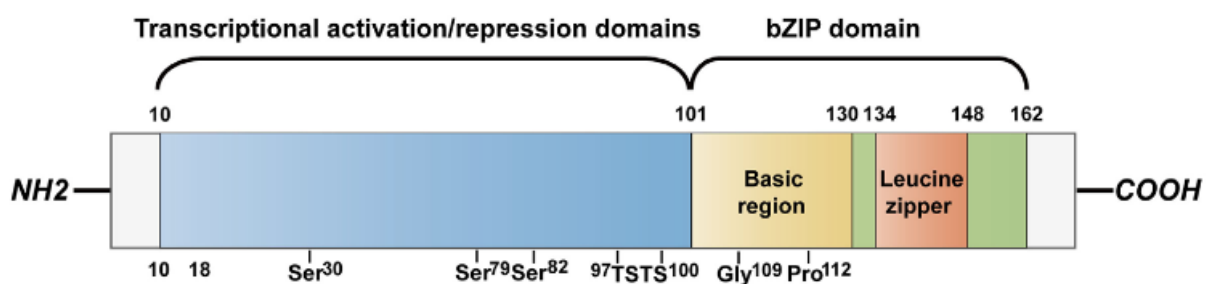
Les précédents travaux de notre équipe de recherche ont montré que des médicaments immunosuppresseurs comme la ciclosporine, induisaient une toxicité rénale en activant le stress du RE [43]. La ciclosporine provoque spécifiquement ce stress dans les cellules tubulaires

proximales, entraînant une mort cellulaire et des altérations évocatrices de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) pouvant contribuer à la fibrose rénale [43]. De plus, l'IR susceptible de se produire notamment lors d'une transplantation rénale ou d'une chirurgie cardiaque sous circulation extracorporelle (CEC) est un déclencheur majeur du stress du RE rénal. Cette situation crée une carence en oxygène et en éléments nutritifs essentiels, comme le glucose et les acides aminés, ce qui engendre le stress du RE [44].

### 3. Effets du facteur de transcription CHOP sur le rein

Lorsque le stress du RE atteint des niveaux élevés et chroniques, la réponse UPR apoptotique devient prédominante [33]. Dans le rein, l'apoptose induite par le stress du RE participe à la fois aux dommages histologiques aigus et chroniques par l'intermédiaire du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP [28–32].

Le facteur de transcription CHOP, codée par le gène *DDIT3* (DNA damage inducible transcript 3), est l'un des six membres identifiés de la famille des facteurs de transcription C/EBP (CCAAT/enhancer binding proteins) qui se lie au motif de boîte CCAAT présent dans plusieurs promoteurs. CHOP également connu sous le nom de GADD153 (growth arrestand DNA damage-inducible gene 153), *DDIT3* ou C/EBPzeta est une protéine de 29 kDa, composée de 169 acides aminés chez l'homme ou 168 acides aminés chez les rongeurs. CHOP contient deux domaines fonctionnels : un domaine d'activation/répression transcriptionnel à l'extrémité N-terminale et un domaine basic-leucine zipper (bZIP) à l'extrémité C-terminale. Le domaine bZIP est composé d'une région de liaison spécifique à l'ADN, riche en acides aminés basiques, suivie d'un motif de dimérisation en fermeture éclair à leucine [45,46] (**Figure 6**).

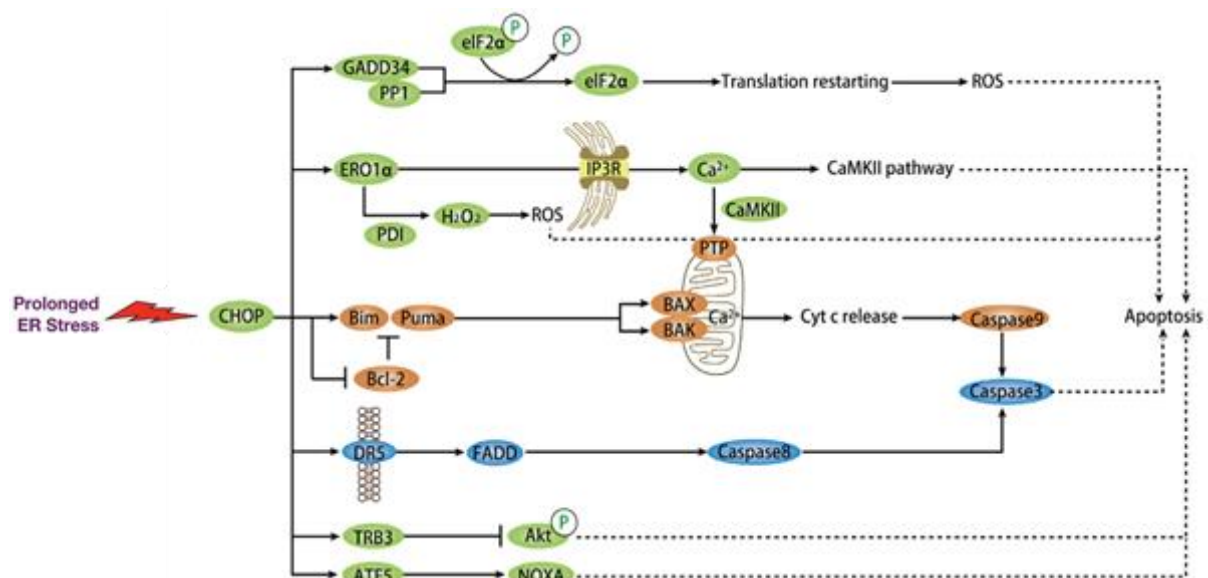


**Figure 6 : Structure du facteur de transcription CHOP.** D'après Yang et *al.*, 2017.

Le niveau d'expression de CHOP est faible à l'état basal, mais son expression augmente considérablement en réponse au stress du RE par une induction transcriptionnelle dépendante des trois voies UPR. En revanche, l'induction de CHOP sous l'action d'ATF4 est considérée comme jouant un rôle dominant en réponse au stress du RE [47]. ATF4 se lie au promoteur de CHOP sur le site C/EBP-ATF [48] et induit ainsi sa transcription [36].

CHOP peut jouer un double rôle, à la fois comme inhibiteur de la capacité des protéines C/EBP à activer certains gènes cibles [45,49,50], et comme activateur direct d'autres gènes [51,52]. Le mécanisme d'action de CHOP n'est pas clair. Plusieurs études ont montré que CHOP induit par le stress du RE exerçait son action en se liant aux promoteurs des gènes cibles sous forme d'hétérodimère qu'il forme avec ATF4 ou C/EBPβ [53].

CHOP a été rapporté pour la première fois en tant que molécule impliquée dans l'apoptose induite par le stress du RE [49,54]. L'apoptose dépendante de CHOP est déclenchée en modifiant l'expression de gènes favorisant ou inhibant l'apoptose, que ce soit directement ou indirectement [46] (**Figure 7**). Des expériences menées sur des souris déficientes en CHOP ont mis en évidence la pertinence de l'apoptose induite par CHOP dans les maladies rénales associées au stress du RE, avec des résultats montrant que l'inhibition de CHOP conduisait à l'atténuation des signes de l'IRA ischémique [55,56], ainsi que de la MRC [57,58].



**Figure 7: Voies apoptotiques dépendantes de CHOP lors du stress du RE.** D'après Yang et al., 2017.

CHOP déclenche la voie apoptotique intrinsèque en inhibant BCL-2 et en augmentant l'expression de protéines pro-apoptotiques, BIM et PUMA, qui régulent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale par BAX-BAK. Cela conduit à la libération de cytochrome C et à la cascade des caspases. CHOP induit également directement l'expression de DR5, ce qui favorise la médiation de la voie apoptotique extrinsèque via la cascade FADD et caspase8. De plus, CHOP induit la transcription de ERO1α qui oxyde PDI et augmente la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui jouent un rôle critique dans l'apoptose. La voie ERO1α-IP3R-Ca<sup>2+</sup>-CaMKII peut déclencher plusieurs voies apoptotiques, principalement l'apoptose mitochondriale dépendante du Ca<sup>2+</sup> via le PTP. CHOP induit la transcription de GADD34 qui s'associe à PP1 pour favoriser la déphosphorylation du eIF2α phosphorylé. Cet événement peut relancer la traduction des protéines et favoriser l'apoptose via les ROS. Une autre cible est TRB3, qui empêche la phosphorylation d'Akt dans cette voie apoptotique. ATF5, en aval de CHOP, facilite l'apoptose en activant certains gènes pro-apoptotiques, tels que NOXA.

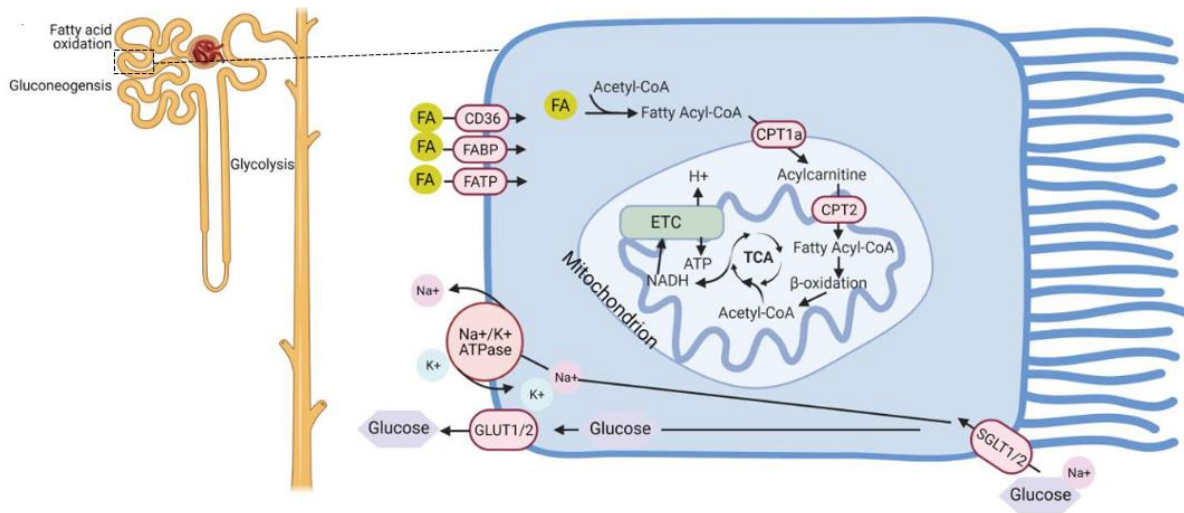
En plus de son rôle pro-apoptotique, CHOP agit en tant que facteur de transcription multifonctionnel dans la réponse au stress du RE [46,59]. Il intervient dans la régulation des gènes codant pour des protéines associées à la prolifération, la différenciation cellulaire, l'autophagie, l'inflammation et le métabolisme énergétique. La relation entre le stress du RE et le métabolisme énergétique cellulaire est complexe, et plusieurs voies semblent être à l'œuvre. Il a été décrit par exemple que CHOP réprimait l'expression du peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha (PGC1 $\alpha$ ), un régulateur essentiel de la biogenèse et de la fonction mitochondriale [60], en réduisant la liaison du facteur de transcription C/EBP $\beta$  au promoteur de PGC1 $\alpha$  [61].

De manière intrigante, l'IRA induite par une IR se caractérise par l'activation du stress du RE [34], ainsi que par une altération du métabolisme du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) dans les cellules rénales, avec une diminution du contenu en NAD rénal [62] (voir infra). La littérature offre peu d'informations sur les interactions potentielles entre le stress du RE et le métabolisme du NAD. La question de savoir si le stress du RE joue un rôle dans la réduction du niveau de NAD rénal lors de l'IRA n'a pas encore été explorée. Dans le cadre de cette thèse, notre attention s'est particulièrement portée sur cette interrogation afin d'apporter des éléments de réponse.

### **III. Rôle de l'altération du métabolisme énergétique et de la biosynthèse du NAD dans la physiopathologie rénale**

Le rein humain est un organe complexe avec environ 1 million de néphrons, chacun comprenant un glomérule suivi des segments tubulaires. Le compartiment tubulaire du rein comprend le tubule proximal (avec le segment S1 le plus proche du glomérule, S2 et S3), l'anse de Henlé, le tubule contourné distal, et le canal collecteur. La majeure partie (99 %) de l'eau et des solutés filtrés par le glomérule est réabsorbée par les tubules proximaux [63].

Les cellules des segments tubulaires ont des besoins élevés en oxygène et en acides gras pour produire de l'ATP via la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui les rend vulnérables aux lésions rénales. Le segment S3 du tubule proximal est particulièrement sensible aux lésions en raison de son emplacement profond dans le rein où l'oxygène est moins présent. Un métabolisme énergétique altéré est une caractéristique de l'IRA ischémique. Les aspects énergétiques et métaboliques à l'origine de l'IRA ischémique sont donc importants à comprendre pour développer de nouvelles stratégies de traitement.



**Figure 8 : Métabolisme énergétique dans le tubule proximal sain.** D'après Gewin, 2021.

Le transport de l'eau et des solutés lors de leur réabsorption, au niveau du tubule proximal, mobilise un grand nombre de transporteurs consommateurs d'énergie. Des mitochondries abondantes sont présentes dans les tubules proximaux pour générer l'ATP nécessaire. Le tubule proximal repose principalement sur l'oxydation des acides gras car cette source de carburant fournit 106 unités d'ATP contre 36 du métabolisme du glucose. Des études anciennes ont montré que les deux tiers de la consommation d'oxygène dans le rein humain provenaient de l'oxydation des acides gras [63,64].

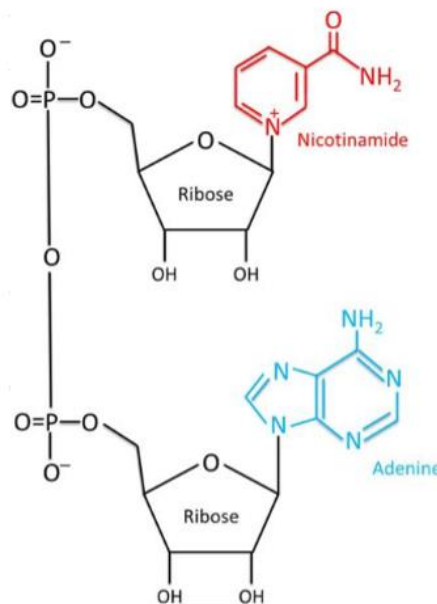
Les acides gras sont absorbés dans les tubules rénaux via des récepteurs membranaires tels que CD36, FABP et FATP (**Figure 8**). Les acides gras à longue chaîne, tels que le palmitate, activés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase (ACS) sont pris en charge par la navette carnitine pour être transportés vers la mitochondrie où ils seront oxydés pour produire de l'ATP. La navette carnitine est constituée de la CPT1 (carnitine palmitoyl transférase 1), de la CACT (carnitine acyl-carnitine translocase) et de la CPT2 (carnitine palmitoyl transférase 2). CPT1 convertit l'acyl-CoA en acylcarnitine à longue chaîne, permettant son mouvement dans la matrice mitochondriale via la CACT. CPT2 restitue alors l'acyl-CoA, qui subit une  $\beta$ -oxydation (FAO pour fatty acid oxydation) dans la mitochondrie [63]. L'acétyl-CoA résultant rejoint le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) ou cycle de Krebs, et s'oxyde entraînant la réduction du  $\text{NAD}^+$  et du flavine adénine dinucléotide ( $\text{FAD}^+$ ) en NADH et FADH, respectivement. Les NADH et FADH produits entrent ensuite dans la chaîne de transport d'électrons pour produire de l'ATP [63,65].

Le NAD est donc un cofacteur essentiel pour la production d'énergie cellulaire via des réactions d'oxydoréduction dans diverses voies métaboliques [66]. En outre, Le NAD agit comme un

cosubstrat pour les sirtuines (SIRT6) et les poly (adénosine diphosphate-ribose) polymérase (PARPs), qui régulent des aspects cruciaux de l'homéostasie mitochondriale et cellulaire (voir infra) [66]. Une dérégulation de son homéostasie aura donc des impacts critiques sur le fonctionnement de la cellule.

### 1. Métabolisme du NAD

Le NAD est constitué de deux ribose phosphate, une adénine et une base nicotinamide (**Figure 9**). Le NAD a une demi-vie de 1 à 2 heures dans le cytoplasme et le noyau et d'environ 8 heures dans les mitochondries [67,68]. Bien que le NAD soit constamment dégradé, des concentrations cellulaires stables sont maintenues grâce à un approvisionnement constant via la voie de recyclage du nicotinamide (NAM), et les voies de biosynthèse du NAD impliquant diverses sources alimentaires, telles que l'acide nicotinique (NA), le nicotinamide riboside (NR), et le tryptophane (TRP). Le rein est l'un des organes ayant les concentrations les plus élevées de NAD cellulaire [69,70].



**Figure 9 : Structure du NAD.** Extrait de Chini et *al.*, 2017.

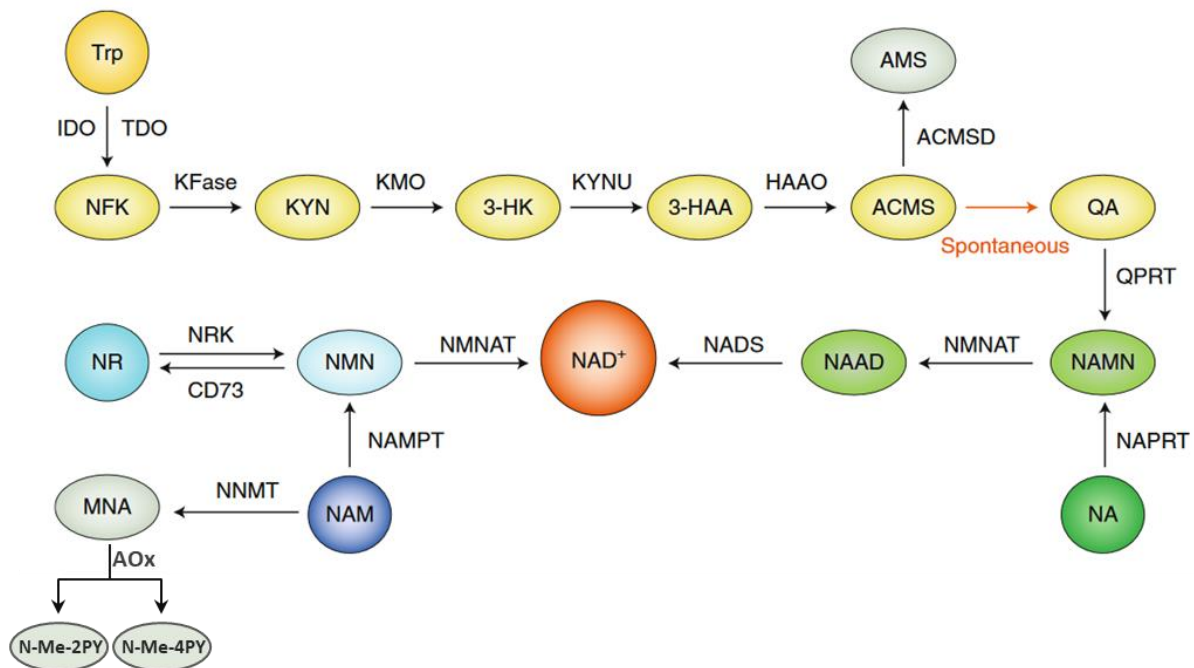
Des données expérimentales et cliniques ont démontré le rôle crucial de l'homéostasie du NAD dans le rein [62,71–73]. De ce fait, la régulation cellulaire du NAD est crucial pour maintenir l'homéostasie métabolique et bioénergétique du rein [66,74]. Les cellules tubulaires proximales (CTP) nécessitent un niveau d'énergie élevé pour la réabsorption du filtrat. Les mitochondries sont les centrales énergétiques de la cellule et sont essentielles pour le contrôle homéostatique

de la fonction rénale [75,76]. En effet, une quantité importante d'ATP est produite grâce à la consommation mitochondriale de NADH, qui est produit lors du cycle de TCA [66,77]. La survie des cellules tubulaires rénales et leur fonction dépendent de leur capacité à synchroniser leurs besoins énergétiques avec la régulation de la génération d'énergie, des réponses antioxydantes, et de la biogenèse mitochondriale qui dépendent toutes du NAD cytosolique et mitochondrial [72,78,79].

Une réduction de la voie de biosynthèse *de novo* du NAD qui passe entre autres par la diminution de l'activité enzymatique de la quinolinate phosphoribosyl transférase (QPRT), est impliquée dans la survenue d'une IRA [62]. Toutefois, les mécanismes moléculaires qui déterminent la réduction de la QPRT en cas d'IRA, ainsi que le rôle de la biosynthèse altérée du NAD dans la progression de la MRC, demeurent inconnus. Nous nous sommes intéressés à cette question dans ce projet de thèse.

### 1.1. Production du NAD

Chez les mammifères, le NAD peut être produit à partir de différentes formes de vitamine B3, telles que le NAM, le NA et le NR [72]. Toutes ces molécules sont des précurseurs du NAD. Le NAD est produit via la voie de Preiss-Handler à partir du NA, ou via les voies de récupération à partir du NAM ou du NR. Alternativement, le NAD peut être synthétisé *de novo* via la voie des kynurénines, à partir d'un acide aminé essentiel, le TRP (**Figure 10**).



**Figure 10 : Voies de synthèses du NAD.** Adapté de Katsyuba et *al.*, 2020.



Les pools du NAD cytosolique, nucléaire et mitochondrial sont interchangeables [80]. Concernant la synthèse *de novo* de NAD, son site principal semble être le cytosol puisque toutes les enzymes de cette voie sont localisées à ce niveau-là [72]. Des différences spécifiques à chaque organe existent à la fois dans l'expression des différentes enzymes de biosynthèse de NAD et dans la préférence pour des précurseurs de NAD spécifiques [80]. Presque toutes les enzymes impliquées dans la biosynthèse de NAD sont fortement exprimées dans les reins, en particulier les enzymes responsables de la synthèse *de novo* à partir du TRP [72]. En utilisant des méthodes de traçage isotopique chez la souris, Liu et *al.* ont révélé que le foie et le rein produisaient du NAD, principalement à partir du TRP. En revanche, d'autres tissus dépendaient plutôt du NAM circulant excrété par le foie et les reins pour synthétiser du NAD [80].

### 1.1.1. Voie Preiss-Handler

La voie Preiss-Handler produit du NAD à partir du NA en trois étapes. Dans la première étape, le NA est converti en nicotinamide adénine mononucléotide (NAMN) par la nicotinate phosphoribosyl transférase (NAPRT). Le NAMN est ensuite converti en nicotinate adénosine diphosphate (NAAD) par l'enzyme limitante de cette voie, la nicotinamide mononucléotide adénylyl transférase (NMNAT) [81]. Dans la dernière réaction, le NAAD est converti en NAD par la NAD synthétase (NADS). La voie Preiss-Handler est essentielle chez les mammifères, et une carence nutritionnelle en NA entraînerait une diminution significative du NAD tissulaire [82].

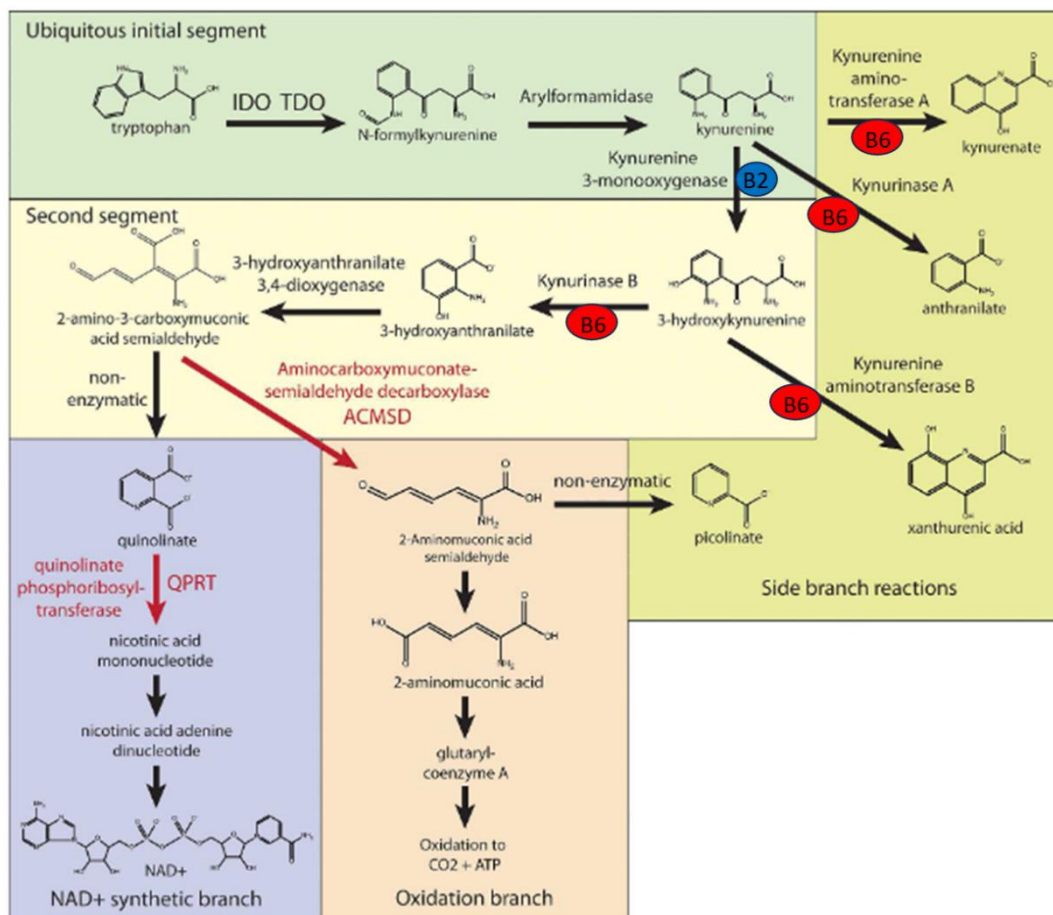
### 1.1.2. Voies de récupération du NAD

En plus d'être apportés par l'alimentation, le NAM et le NR sont des précurseurs endogènes du NAD [83]. La synthèse du NAD à partir de ces deux précurseurs se fait selon deux réactions enzymatiques. Les deux voies partagent un intermédiaire commun, le mononucléotide nicotinamide (NMN) qui peut être produit à partir du NR phosphorylé par l'enzyme nicotinamide riboside kinase (NRK), ou du NAM après l'ajout d'un groupement phosphoribosyle par la nicotinamide phosphoribosyl transférase (NAMPT). La NAMPT est considérée comme une enzyme limitante de la voie de récupération du NAD à partir du NAM [84]. En effet, les souris dépourvues de NAMPT ne sont pas viables [85]. L'étape commune et finale des deux voies de recyclage, catalysée par la NMNAT, est la conversion du NMN en NAD.

### 1.1.3. Voie de biosynthèse *de novo* du NAD

Le NAD peut être synthétisé à partir du TRP alimentaire via la voie de biosynthèse *de novo* du NAD, appelée également voie des kynurénines (**Figure 11**). La tryptophane 2,3-dioxygénase

(TDO) ou l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) catalysent la première étape limitante de cette voie en clivant le cycle pyrrole du TRP pour donner le N-formyl-kynurénine puis la kynurénine (KYN). Au niveau rénal, seule l'IDO est présente [72]. La KYN est métabolisée sous l'action de la kynurénine 3-monoxygénase (KMO) en 3-hydroxykynurénine (3-HK) en présence de la vitamine B2 comme coenzyme [86]. La 3-HK est ensuite convertie par la kynurénase (KYNU) en acide 3-hydroxyanthranilique (3-HANA) puis en un intermédiaire instable, l'acide 2-amino-3-carboxymuconique-6-semialdéhyde (ACMS) par la 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase (HAAO). Ce dernier peut être transformé spontanément en quinolinate (QA), qui sera converti sous l'action de la QPRT, en NAMN. Ce dernier peut ensuite être transformé en NAD via la voie Preiss-Handler. La QPRT est une enzyme limitante de la synthèse *de novo* du NAD [62,66,74]. Elle est abondamment présente dans le rein, notamment dans le tube proximal, le compartiment cellulaire le plus métaboliquement actif [87,88,62]. Mehr et *al.* ont montré l'importance essentielle de la QPRT dans l'homéostasie du NAD dans le rein, suggérant ainsi un rôle crucial dans la biosynthèse du NAD [62].

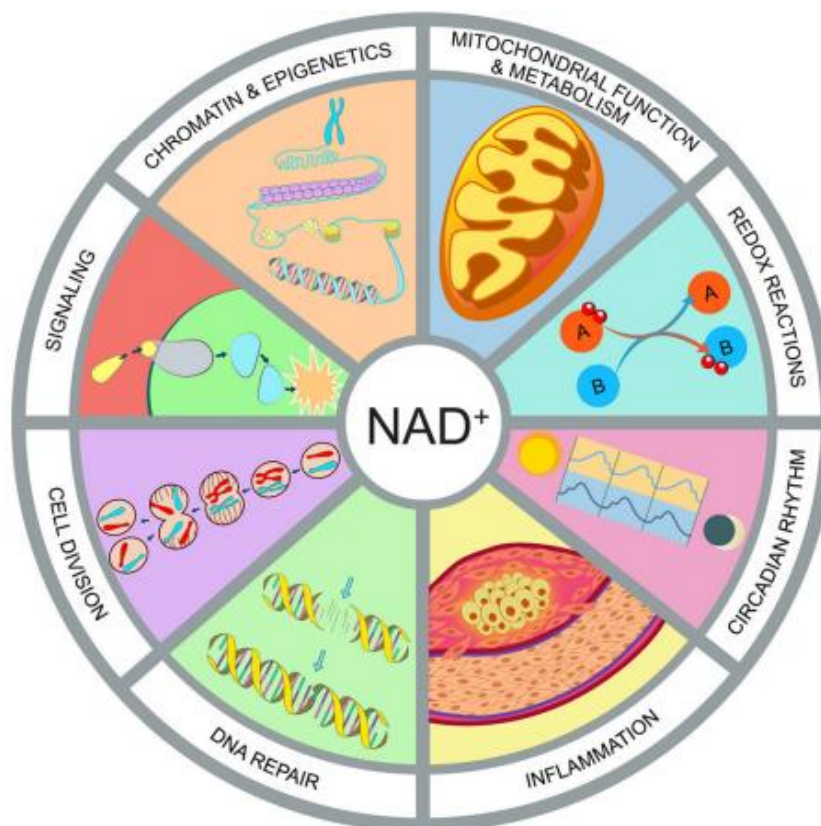


**Figure 11 : Catabolisme du tryptophane (TRP) via la voie des kynurénines.** Adapté de Moffett et *al.*, 2020.

En plus de la synthèse du NAD, le catabolisme du TRP par la voie des kynurénines bifurque vers d'autres sous branches (**Figure 11**). Sous l'action de kynurénine aminotransférases (KATs), l'acide kynurénique (KA) est produit à partir de la KYN et l'acide xanthurénique (XA) à partir de la 3-HK. Plusieurs enzymes de la voie des kynurénines notamment, les KATs et les KYNU, requièrent la présence de la vitamine B6 en tant que coenzyme [86]. De plus, l'ACMS peut être métabolisé par l'aminocarboxymuconate-semialdéhyde décarboxylase (ACMSD, appelée aussi picolinate carboxylase) en 2-aminomuconate semialdéhyde (AMS), qui se cyclise spontanément en picolinate (PIC) [66]. Enfin, l'enzyme 2-aminomuconate-6-semialdéhyde dehydrogenase (AMSD), présente dans le foie mais pas dans le rein, convertit le AMS en 2-aminomuconate, puis en glutaryl coenzyme A, afin de rejoindre le cycle de TCA pour la production d'énergie [89].

## 1.2. Fonctions biologiques du NAD

Le NAD tient un rôle central dans la production de l'énergie [90] et la réparation de l'ADN [66]. Présent dans toutes les cellules de l'organisme, de nombreux processus métaboliques et biologiques reposent sur la présence de cette molécule. La **Figure 12** ci-dessous résume les rôles clés du NAD dans l'organisme.

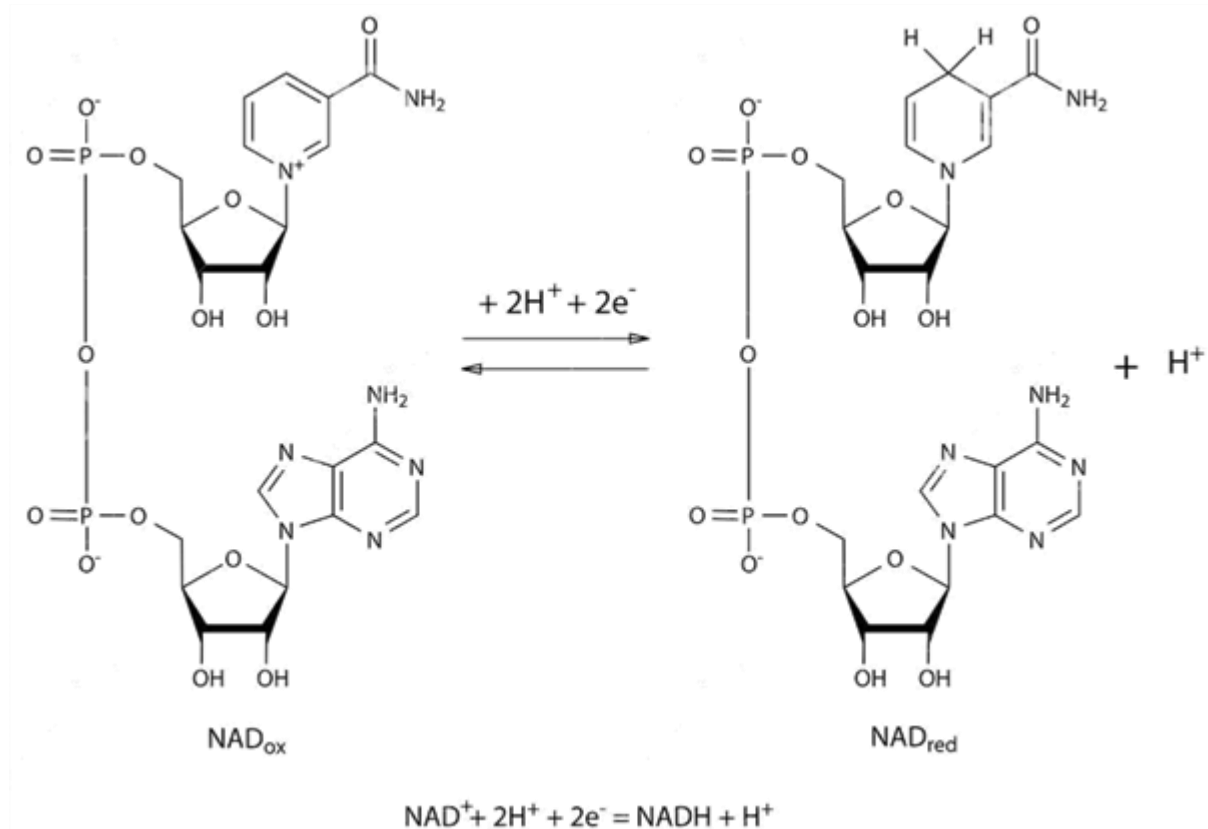


**Figure 12 : Rôles clés du NAD dans l'organisme.** D'après Rajman et *al.*, 2018.

### 1.2.1. Rôle du NAD comme cofacteur dans les réactions d'oxydoréduction

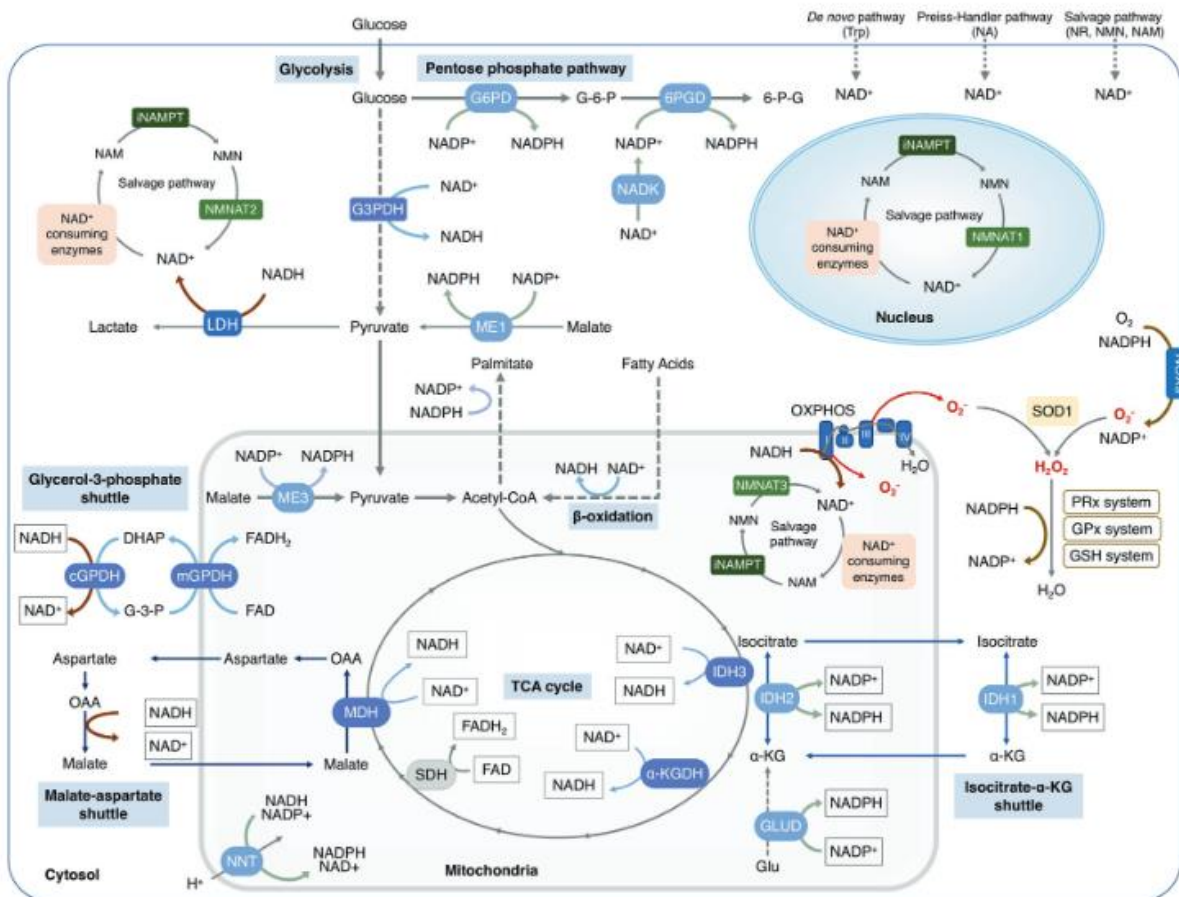
Le NAD joue un rôle essentiel dans de nombreuses réactions d'oxydoréduction, en agissant comme un intermédiaire pour le transfert d'électrons dans diverses voies métaboliques et la production d'ATP à travers la chaîne respiratoire mitochondriale [90].

Le couple redox  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  agit en tant que cofacteur dans les réactions d'oxydoréduction impliquant l'échange d'électrons (**Figure 13**). Dans ces réactions, la forme oxydée,  $\text{NAD}^+$ , agit comme un accepteur d'électrons, tandis que la forme réduite,  $\text{NADH}$ , agit comme donneur d'électrons. Dans les mitochondries, cette fonction permet d'établir un lien entre le cycle de TCA et la chaîne de transport des électrons (chaîne respiratoire), ce qui est essentiel pour une conversion efficace des nutriments en énergie. Dans les tissus mammifères sains, comme le rein, le rapport entre les concentrations intracellulaires du  $\text{NAD}^+$  et du  $\text{NADH}$  se situe entre 3 et 10, favorisant ainsi les réactions d'oxydation [91].



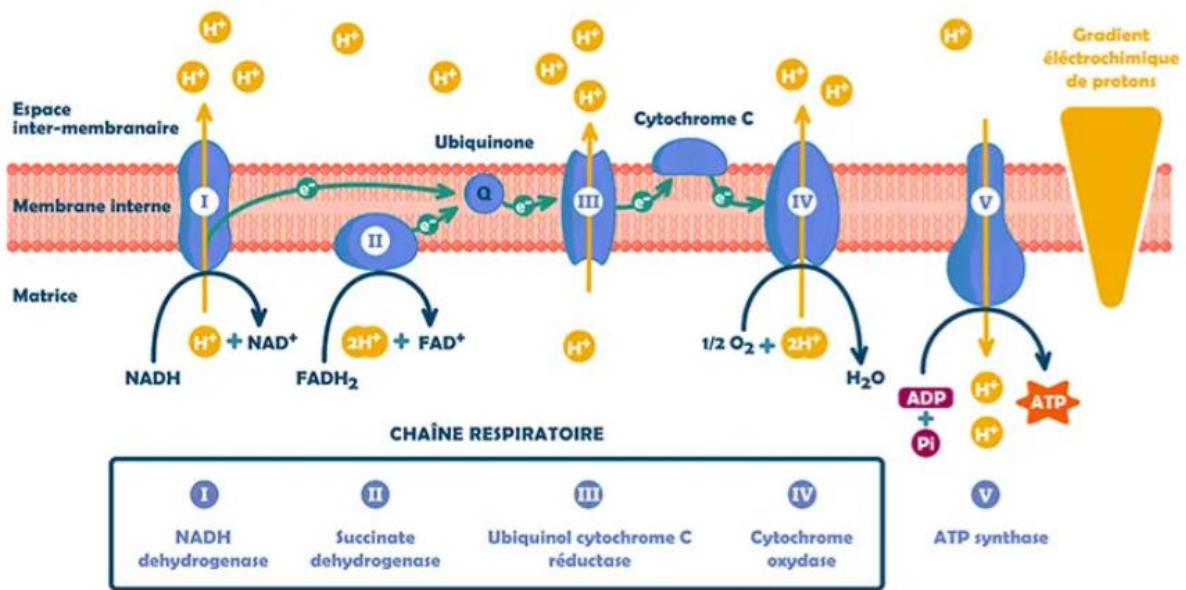
**Figure 13 : Réaction redox du couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ .**

Le rôle du NAD dans les processus d'oxydation cellulaire qui se produisent à la fois dans le cytosol et les mitochondries est essentiel pour la génération de l'énergie dans la cellule [66]. Les processus métaboliques impliquant le NAD incluent la glycolyse dans le cytosol, et la  $\beta$ -oxydation et le cycle de TCA dans la mitochondrie (**Figure 14**).



**Figure 14 : Métabolisme du NAD dans les différents compartiments cellulaires.** D'après Xie et al., 2020.

Les réactions impliquant l'oxydation du NADH cytosolique comprennent la conversion de l'oxaloacétate en malate via la navette malate-aspartate, et la conversion du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P) via la navette DHAP/G3P [72]. Ces deux navettes jouent un rôle crucial en permettant le transfert rapide et efficace des électrons issus du NADH produit lors de la glycolyse dans le cytosol vers la chaîne respiratoire dans la mitochondrie. Le NADH mitochondrial régénère le NAD<sup>+</sup> en cédant ses électrons au complexe I de la chaîne respiratoire, contribuant ainsi à la production d'ATP par phosphorylation oxydative (**Figure 15**).



**Figure 15 : Schémas de la chaîne respiratoire et de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative.**

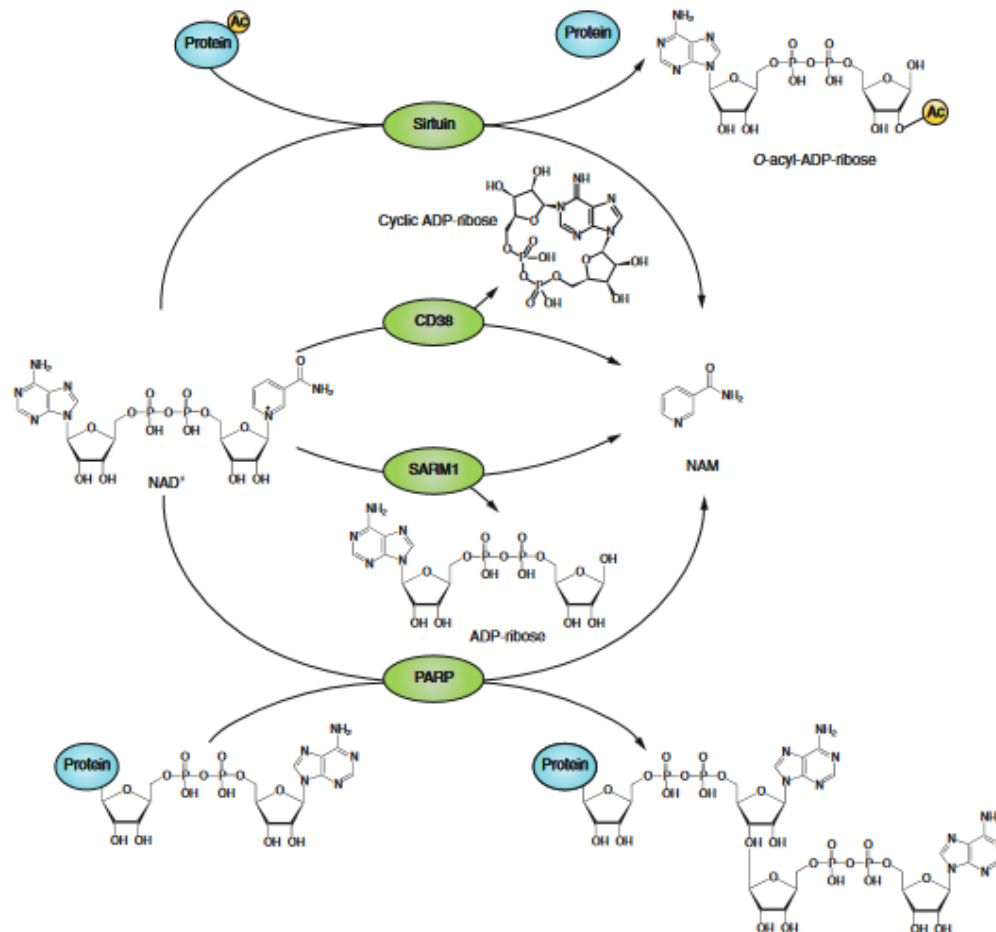
Dans des modèles expérimentaux d'IRA, il a été observé une réduction du fonctionnement de la chaîne respiratoire entraînant une baisse de la production d'ATP et de la régénération du  $\text{NAD}^+$  mitochondrial, ce qui a conduit à une défaillance de la  $\beta$ -oxydation [92]. Pour répondre aux besoins énergétiques, la glycolyse est accélérée, aggravant ainsi la diminution en  $\text{NAD}^+$  cytosolique. Dans de telles conditions, le recyclage du  $\text{NAD}^+$  cytosolique à partir du NADH est maintenu par la réduction du pyruvate en lactate, et la désaturation des acides gras polyinsaturés (AGPI, ou PUFA pour polyunsaturated fatty acid) en acides gras hautement insaturés (AGHI ou HUFA pour highly unsaturated fatty acid), ce qui entraîne une accumulation de lipides dans les cellules tubulaires rénales [66].

Le  $\text{NAD}^+$  sert de substrat pour la forme oxydée d'un autre couple rédox, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ( $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ), qui est synthétisé sous l'action de la NAD kinase (NADK) (**Figure 14**). Dans le rein, le rapport  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  est de l'ordre de 0,5, avec le  $\text{NADPH}$  comme forme dominante [93]. Le  $\text{NADPH}$  joue un rôle important dans la défense antioxydante, essentielle pour protéger le rein contre le stress oxydant [66]. La  $\text{NADPH}$  oxydase rénale (NOX4) réduit l'oxygène moléculaire en anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) puis en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [94–96]. Ce dernier est pris en charge par la glutathion peroxydase pour être neutralisé en deux molécules d'eau, en présence du glutathion réduit. L'oxydation du  $\text{NADPH}$  par le glutathion réductase permet la régénération de glutathion réduit. La régénération du  $\text{NADPH}$  est principalement assurée par la réduction du  $\text{NADP}^+$  dans la voie des pentoses phosphates (**Figure 14**). Enfin, le  $\text{NADPH}$  potentialise la protection vasculaire

rénale en favorisant la génération du vasodilatateur, le monoxyde d'azote (NO) par la NO synthétase [66].

### 1.2.2. Rôle du NAD comme substrat enzymatique

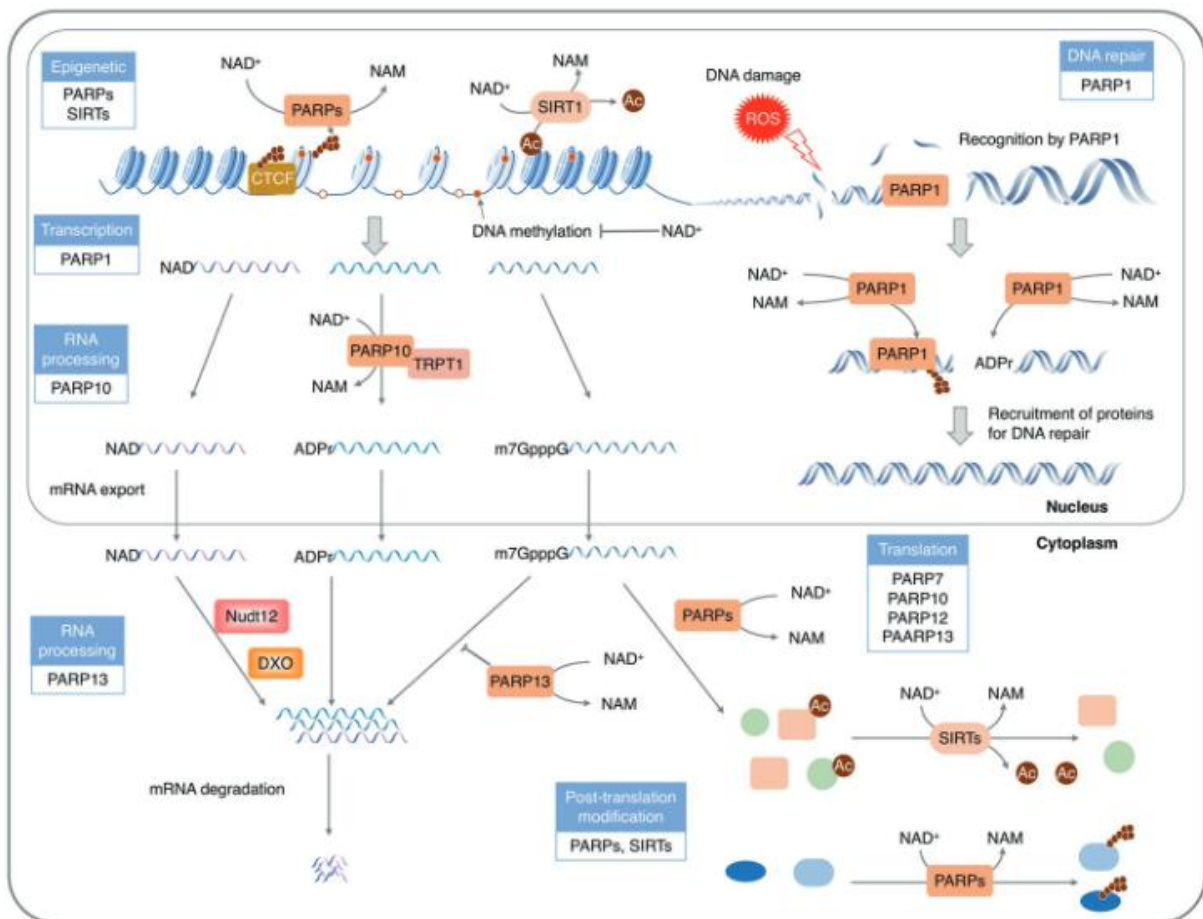
Le NAD est un substrat essentiel pour au moins trois classes d'enzymes : les PARPs, les SIRT6s et les synthétases d'ADP-ribose cyclique (cADPRs) [72] (**Figure 16**).



**Figure 16 : Principales enzymes consommatrices du NAD.** D'après Katsyuba et *al.*, 2020.

Les PARPs appartiennent à une famille connue sous le nom d'ADP-ribosyle transférases [97]. En utilisant le NAD comme donneur d'ADP-ribose, les PARPs médient l'ADP-ribosylation sur eux-mêmes ou sur diverses protéines nucléaires cibles telles que les topoisomérases, les ADN polymérases, les ADN ligases, les histones, et de nombreuses autres protéines de réparation de l'ADN [98–100]. Ces réactions médiées par les PARPs jouent un rôle essentiel dans la stabilité du génome et sa régulation épigénétique, la transcription de l'ARN et son devenir post-transcriptionnel (**Figure 17**). Il a été récemment découvert que le NAD pouvait s'incorporer sous forme d'une coiffe à l'extrémité 5' des ARNs de différents organismes, y compris chez

l'Homme, en tant que signal de dégradation permettant de réguler la quantité et la durée de vie des ARNs cibles [101]. Les PARPs sont ainsi impliquées dans la réponse cellulaire au stress et à l'ADN endommagé, et contribuent à la réparation de l'ADN [99,102]. Alors qu'une activité modérée des PARPs protège l'intégrité du génome cellulaire, leur activation excessive entraîne l'apoptose, secondaire à une déplétion en ATP [72,103].



**Figure 17 : Régulation de l'expression génique par le NAD.** D'après Xie et *al.*, 2020.

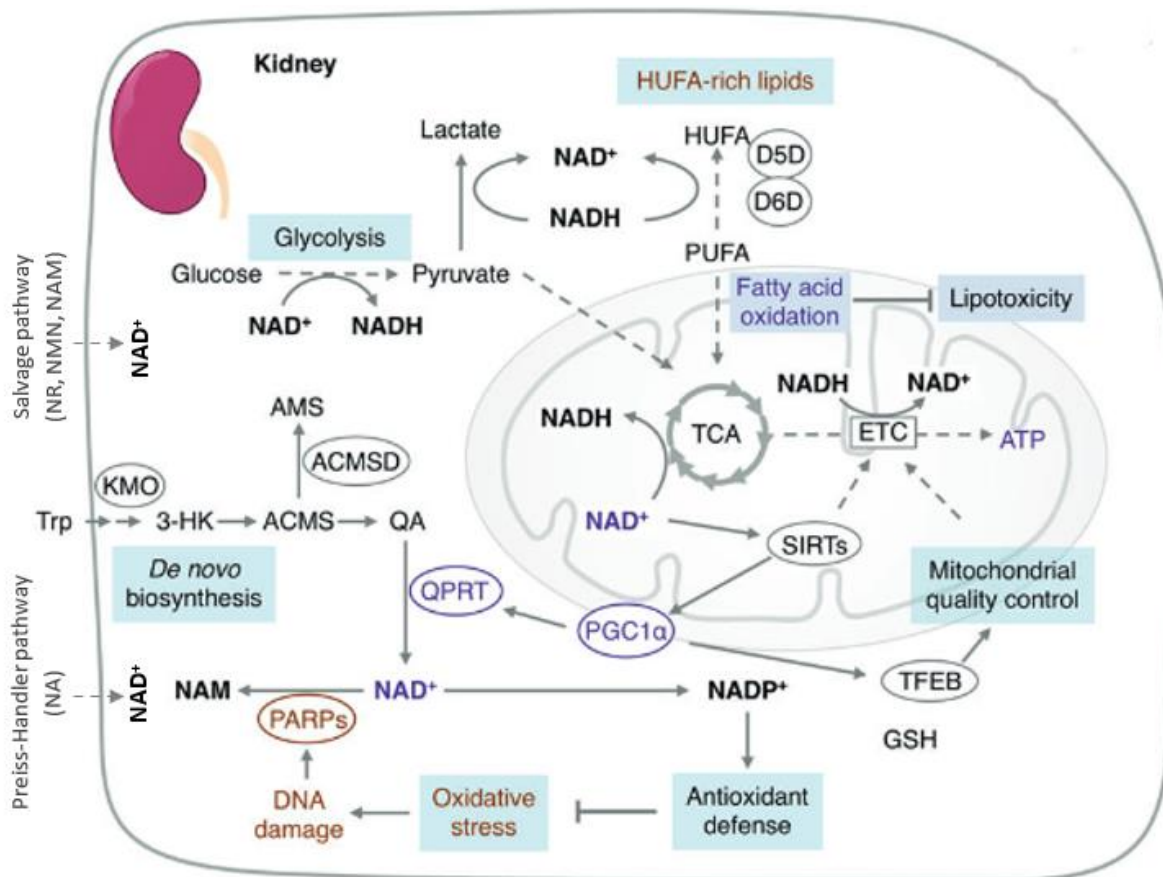
Les SIRT1s forment une famille de désacétylases dépendantes du NAD, appelées également mono-ADP-ribosyltransférases. Elles sont présentes dans le noyau (SIRT1s 1, 2, 6 et 7), les mitochondries (SIRT1s 3, 4 et 5) et le cytoplasme (SIRT1s 1 et 2) [104,105]. Les SIRT1s éliminent le groupement acyl sur les protéines cibles en utilisant le NAD et génèrent de l'O-acyl-ADP-ribose et du NAM (**Figure 16**). Toutes les SIRT1s partagent un domaine conservé de liaison au NAD, mais diffèrent dans leurs régions terminales aminées et carboxyliques, leur activité catalytique et leurs fonctions cellulaires [106,107]. Dans le rein, la SIRT1 la plus largement étudiée est la SIRT1 [108,109]. Au niveau nucléaire, les SIRT1s, en particulier la SIRT1, exercent leur activité sur de multiples coactivateurs de transcription ainsi que sur les histones,



entraînant une restructuration épigénétique (**Figure 17**). Cependant, la réduction de l'activité des SIRT6 suite à une diminution du niveau du NAD pourrait contribuer à l'hyperacétylation des histones et à une transcription génique aberrante. Par conséquent, le NAD joue un rôle pivot dans la régulation de l'expression génique par l'intermédiaire des SIRT6. Les SIRT1 et SIRT3 ont également des effets réno-protecteurs par plusieurs voies, en réduisant le stress oxydatif, l'apoptose cellulaire, l'inflammation et la fibrose [109,105,108,110]. De plus, la SIRT1 peut réguler indirectement la biogenèse mitochondriale en activant le PGC1 $\alpha$  [111]. Le PGC1 $\alpha$  est un coactivateur transcriptionnel impliqué dans la régulation de nombreux processus cellulaires, notamment le métabolisme énergétique et la biogenèse mitochondriale [111]. Une étude expérimentale a montré que la consommation du NAD par la PARP1 limitait sa disponibilité pour la SIRT1, ce qui signifie qu'une activation intense des PARPs est suffisante pour atténuer l'activité des SIRT6 en raison de la déplétion locale du NAD, et pourrait conduire à la mort cellulaire [112]. Une signalisation diminuée des SIRT6 a été observée au cours de l'IRA [113,114] et la MRC [108,115], notamment la néphropathie diabétique [116–119].

**Les synthétases de cADPR**, CD38 et CD157, régulent l'homéostasie du calcium en catalysant la production de cADPR à partir du NAD (**Figure 16**) [120,121]. Le cADPR entraîne la mobilisation du calcium à partir des réserves du RE, participant ainsi dans le rein à la régulation de la vasoconstriction rénale [122,123]. Au niveau rénal, le CD38 est présent dans les glomérules et les CTP, et le CD157 dans le tube collecteur [118,120,124]. L'hyperactivation du CD38 est impliquée dans l'aggravation de l'IRA et la néphropathie diabétique [125,126,124]. Le SARM1 est une autre enzyme qui utilise le NAD pour produire du ADPR et du NAM (**Figure 16**). Bien que le SARM1 est fortement exprimé dans le rein, son rôle reste inconnu [127,128]. Néanmoins, il a été décrit que l'activation du SARM1 induisait la mort cellulaire, en particulier dans les cellules mononucléées du sang, notamment les lymphocytes T [129].

La **Figure 18** illustre l'homéostasie du NAD dans le rein, un processus crucial pour maintenir l'équilibre métabolique et la fonction cellulaire dans cet organe vital. En tant que coenzyme, il joue un rôle essentiel dans les réactions cellulaires telles que la respiration cellulaire, la glycolyse et la dégradation des acides gras. De plus, le NAD exerce une influence sur la régulation de l'expression génique par l'intermédiaire des SIRT6 et des PARPs. Ces mécanismes complexes contribuent à maintenir le bon fonctionnement du rein, et sont d'une importance capitale pour la santé rénale et globale de l'organisme.



**Figure 18 : Homéostasie du NAD dans le rein.** Adapté de Xie et al., 2020.

## 2. Altérations du métabolisme rénal du NAD

Le premier lien entre les niveaux de NAD et la santé a été établi en 1937 lorsque la Pellagre, une maladie qui se manifeste par une dermatite, diarrhée et démence, a été découverte comme étant causée par une carence alimentaire en niacine (Vitamine B3) [130,131]. Depuis lors, de nombreuses études ont décrit une diminution des niveaux de NAD dans de nombreuses conditions pathologiques, notamment dans la maladie rénale [66,72]. Un bon nombre d'études chez l'animal mais aussi chez l'Homme ont montré que les niveaux du NAD sont significativement réduits dans le rein en cas d'IRA [62,71,74,132–135], mais aussi dans la MRC en particulier chez les personnes âgées et les diabétiques [136,137,134]. Bien que plus rare, la diminution du NAD a été également observée dans des maladies rénales monogéniques héréditaires [138]. Des mutations touchant deux gènes des enzymes de la voie de biosynthèse *de novo* du NAD, la HAAO et la KYNU B, sont associées à des malformations congénitales, y compris une dysplasie rénale avec une diminution du NAD plasmatique et intra-rénal [138]. Le maintien du niveau intracellulaire du NAD dans la cellule tubulaire rénale est donc primordial pour sa survie.

## 2.1. Causes de la diminution du NAD dans le rein

La baisse des niveaux de NAD dans le rein peut être une conséquence d'altération d'une ou de plusieurs voies de biosynthèse du NAD, et d'une consommation accrue du NAD par les enzymes qui l'utilisent, notamment les PARPs.

### 2.1.1. Altération de la production du NAD

#### 2.1.1.1. Altération de la synthèse du NAD au cours de l'IRA

La diminution de la synthèse *de novo* du NAD dans le rein a été observée lors de l'IRA, ischémique et toxique, dans plusieurs modèles expérimentaux, et également chez l'Homme [62,71,74,132,133,137].

Concernant le mécanisme de la diminution de la synthèse *de novo* de NAD dans le rein lors de l'IRA, des études de la dernière décennie ont démontré l'implications de la QPRT, et du PGC1 $\alpha$  qui joue un rôle crucial dans l'activation du gène *QPRT* (**Figure 18** et **Figure 19**). En 2016, Trai et *al.* ont montré sur un modèle murin d'IRA ischémique une baisse intra-rénale des concentrations du NAD, liée à une diminution de sa synthèse *de novo* à partir du TRP, avec une baisse de l'expression de la QPRT et de son activateur, PGC1 $\alpha$  [74].

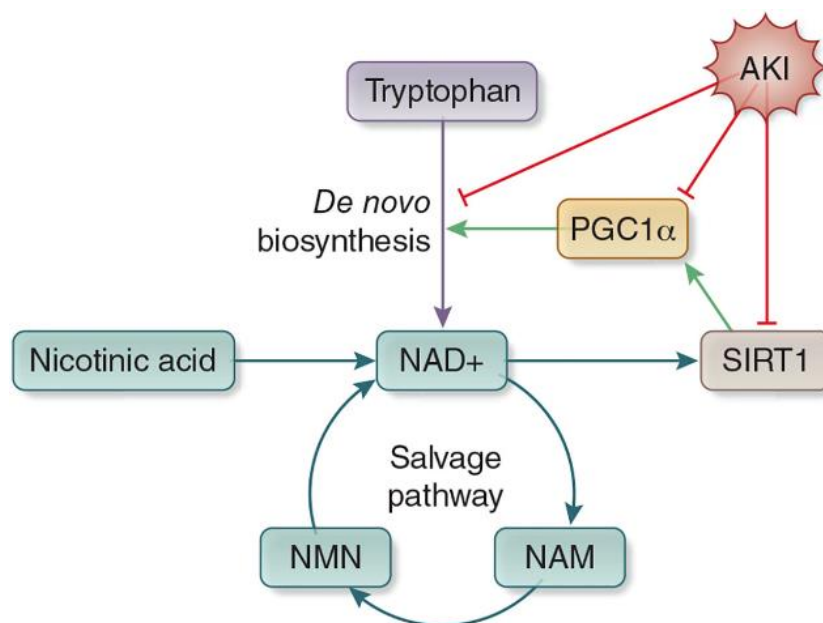
L'IRA expérimentale, induite par le choc septique, l'IR, le cisplatine ou l'acide folique, est associée voire aggravée par une diminution du NAD en raison d'une réduction de l'expression de la QPRT et de son activité révélée par une augmentation des taux du QA rénal et urinaire [74,62,133,137,135,139,140]. De plus, la suppression partielle du transcrit *QPRT* est associée à une susceptibilité plus élevée de développer une IRA ischémique ou toxique [62,139]. En revanche, la surexpression de *QPRT* dans le rein protégeait les souris contre l'IRA [139].

Poyan Mehr et *al.* ont retrouvé chez des patients avec une IRA, survenue suite à une chirurgie cardiaque sous CEC ou un séjour en unité de soins intensifs (USI), une accumulation du QA urinaire et une augmentation du ratio QA/TRP [62]. Ces perturbations métaboliques suggèrent une diminution de la synthèse *de novo* du NAD due à une réduction de l'activité de la QPRT [62]. Cependant, un ratio urinaire QA/TRP élevé pourrait également être observé lors d'une activation accrue de l'IDO dans un contexte inflammatoire, et la diminution de l'expression de la QPRT dans les reins des patients étudiés n'a pas été confirmée. En 2021, Faivre et *al.* ont pour la première fois montré la diminution de l'expression du gène *QPRT* lors d'une IRA ischémique post-transplantation rénale, dans les biopsies des greffons rénaux lors de leur reperfusion [137].

La compréhension de la régulation de la QPRT et de l'homéostasie du NAD peut jouer un rôle crucial dans l'élucidation de la physiologie de l'IRA et dans le développement de thérapies novatrices.

Des études récentes ont montré que la diminution de la QPRT pouvait passer par la réduction de l'expression de son activateur, PGC1 $\alpha$ . Ce dernier est retrouvé diminué dans le rein dans plusieurs modèles d'IRA [74,141–143,133]. De plus, la suppression de PGC1 $\alpha$  chez la souris a comme conséquence une expression plus réduite de la QPRT, une accumulation du QA, une diminution des niveaux du NAD, et une susceptibilité plus élevée à développer une IRA [74,141]. À l'inverse, la surexpression de PGC1 $\alpha$  augmentait l'expression de la QPRT et les niveaux du NAD, et atténuait la sévérité de l'IRA [74,141]. Il a été montré tout récemment, que l'activation transcriptionnelle de *QPRT* par PGC1 $\alpha$  passait par l'intermédiaire du facteur de transcription HNF4 $\alpha$  (Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha) [139].

Ces découvertes indiquent que PGC1 $\alpha$ , activé entre autres par les SIRT1 dépendantes du NAD [144], exerce ces effets protecteurs sur le rein en favorisant la biogénèse mitochondriale [111], mais également en augmentant la synthèse *de novo* du NAD qui passe par la régulation transcriptionnelle positive de la QPRT. Le NAD rénal, la QPRT, le PGC1 $\alpha$  et les SIRT1 forment donc un système interconnecté dans lequel le PGC1 $\alpha$  et le NAD se régulent mutuellement : le PGC1 $\alpha$  favorise la biosynthèse *de novo* du NAD via la voie dépendante de QPRT, et à son tour, le NAD permet l'activation de PGC1 $\alpha$  par désacétylation sous l'action des SIRT1 [145] (**Figure 19**).



**Figure 19 : Implication de PGC1 $\alpha$  dans la diminution du NAD au cours de l'IRA.**

D'après Clark et Parikh, 2021.

Des perturbations touchant les autres enzymes de la voie de synthèse *de novo* de NAD et celles des autres voies de synthèse du NAD ont été parfois observées lors de l'IRA. Par exemple, une diminution de l'expression de IDO, KMO, KYNU, HAAO, NAMPT, NMNAT et NAPRT a été observée dans plusieurs modèles d'IRA ischémique ou toxique [74,114,135,137,146]. Ces données indiquent que lors d'une IRA, plusieurs voies de synthèse du NAD pourraient être perturbées de manière simultanée, contribuant conjointement à la réduction du niveau intra-rénal de NAD.

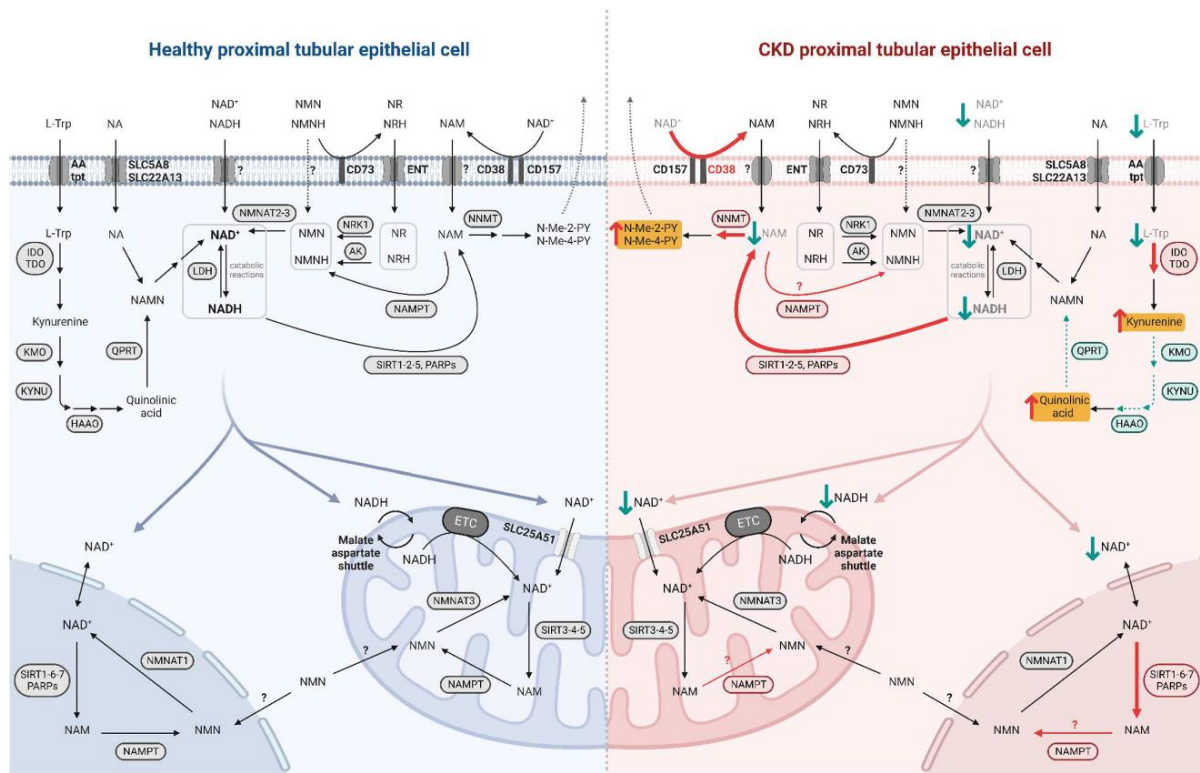
#### **2.1.1.2. Altération de la synthèse du NAD au cours de la MRC**

Une altération d'une ou plusieurs voies de synthèse du NAD a été observée dans différents modèles expérimentaux de la MRC (**Figure 20**). En 2000, Saito et *al.* ont montré une augmentation marquée de la KYN et du QA plasmatiques et urinaires chez des rats avec une MRC induite par néphrectomie unilatérale [147]. De plus, dans une autre étude sur le même modèle de MRC, la concentration plasmatique et le contenu rénal du TRP étaient réduits, tandis que les niveaux du QA rénal et plasmatique étaient augmentés [148]. Cependant, dans ces deux études, l'expression de la QPRT et les niveaux de NAD n'ont pas été quantifiés. Une baisse intra-rénale des niveaux du NAD, corrélée à la sévérité de la MRC, a été décrite dans deux modèles de MRC, induite par néphrectomie unilatérale et la néphropathie induite par l'adénine, chez le rat. L'expression de QPRT et NMNAT était diminuée dans les deux modèles, tandis que celle de NRK était seulement réduite dans la néphropathie induite par l'adénine [149]. Faivre et *al.* ont également observé une diminution des niveaux du NAD rénal dans deux modèles murins de MRC, le modèle d'obstruction unilatérale de l'urètre (OUU) et le modèle protéinurique POD-ATTAC (podocytes- apoptosis through targeted activation of caspase-8) [137]. De plus, plusieurs transcrits d'enzymes de la voie de synthèse *de novo* de NAD (KMO, KYNU, HAAO et QPRT) et des voies de récupération (NAMPT, NMNAT et NRK) étaient souvent réduits. Une autre étude sur le modèle murin d'OUU, a rapporté une diminution du NAD rénal et des transcrits de NAPRT, QPRT et ACMSD, associée à une augmentation de l'expression de NNMT qui dégrade le NAM en toxines urémiques (TUs), le N-méthyl-2-pyridone-5-carboxamide (N-Me-2PY) et le N-méthyl-4-pyridone-3-carboxamide (N-Me-4PY), au détriment de son recyclage en NAD [150] (**Figure 10** et **Figure 20**). En effet, la NNMT est considérée comme une enzyme consommatrice indirecte du NAD [150]. De plus, la suppression de NNMT permet d'améliorer les niveaux de NAD et d'atténuer l'inflammation et la fibrose rénale [150].

Dans un modèle murin de néphropathie diabétique induite par la streptozotocine (STZ), la diminution de l'expression de NAMPT au niveau des CTP était corrélée à l'albuminurie et à la fibrose rénale. De plus, la surexpression de NAMPT atténuait l'albuminurie [151]. Cependant, des études opposées ont révélé que l'expression de NAMPT était augmentée dans les cellules glomérulaires (cellules mésangiales et podocytes) ainsi que dans les CTP en cas de néphropathie diabétique chez le rat [152,136,153]. Bien que les niveaux du NAD ne soient pas quantifiés, une expression diminuée de la KMO était observée dans les glomérules rénaux de patients et souris avec néphropathie diabétique [154].

Quelques études ont été menées chez l'Homme concernant la modulation des voies de synthèse de NAD lors de la MRC. Par exemple, une augmentation des niveaux plasmatiques de la KYN et du QA a été observée chez des patients atteints de MRC terminale [147]. De plus, la diminution de l'expression transcriptionnelle rénale des enzymes de la voie de synthèse *de novo* de NAD (KMO, KYNU, HAAO et QPRT) était corrélée au stade de la MRC, tandis que les enzymes des voies de récupération restaient inchangées [137]. Enfin, il a été observé chez des patients atteints de MRC une augmentation de l'expression de NNMT corrélée au degré de la fibrose rénale. La diminution des concentrations plasmatiques des NAM et NMN, ainsi que l'augmentation des concentrations des TUs issues du NAM (N-Me-2PY et N-Me-4PY), étaient corrélées au stade de la MRC [150,155].

D'autres études ont également montré, dans des modèles de néphropathie diabétique et de fibrose tubulo-interstitielle chez la souris et l'Homme, une réduction intra-rénale de PGC1 $\alpha$  [156–159]. Ces résultats suggèrent que le lien physiopathologique connu dans l'IRA entre PGC1 $\alpha$  et la diminution de la synthèse *de novo* de NAD dépendante de QPRT, pourrait être également applicable sur la MRC.



**Figure 20 : Dérégulation du métabolisme du NAD au cours de la MRC.** D'après Chanvillard *et al.*, 2023.

### 2.1.2. Accélération de la consommation du NAD

Des études sur des modèles cellulaires [160,161] et animaux [162,132] de l'IRA ischémique, ont montré une diminution du NAD accompagnée d'une activation des enzymes consommatrices du NAD, les PARPs, en particulier PARP1 [163]. Chez l'Homme, l'expression de PARP1 dans les biopsies de greffes rénales était corrélée au temps de l'ischémie froide, à la nécrose tubulaire aiguë, et au délai de récupération de la fonction rénale après la transplantation rénale [164,165]. Bien que l'activité des PARPs est essentielle pour la réparation de l'ADN en cas de lésions légères, et peut induire l'apoptose pour préserver l'intégrité du génome, leur suractivation en cas de dommages importants de l'ADN entraîne une déplétion du NAD et une nécrose cellulaire [163,166].

L'inhibition des PARPs permet de restaurer le contenu en NAD et d'atténuer ces dommages. L'inhibition pharmacologique ou la suppression génétique de PARP1 dans des cellules rénales en culture exposées à un stress oxydatif augmentaient le contenu en NAD et l'activité mitochondriale, et diminuaient la mort cellulaire [112,160,161]. De même, chez l'animal, l'inhibition pharmacologique ou génétique des PARPs était associée à une augmentation du contenu rénal en NAD [132,162] et de la production d'ATP, ce qui a permis d'atténuer les

lésions rénales ischémiques [163,166]. Cependant, l'inhibition des PARPs peut entraver la réparation de l'ADN nécessaire à la récupération après une nécrose tubulaire aiguë [167]. Pour cette raison, la détermination du moment opportun pour l'inhibition des PARPs après une lésion rénale aiguë peut être un facteur crucial pour permettre l'utilisation des inhibiteurs de PARPs (PARPi) [167].

Une variation des niveaux du NAD rénal, dépendante du niveau d'expression de CD38 a été observée dans des cellules rénales en culture et chez la souris [168–170]. En revanche, à notre connaissance, aucune étude n'a exploré les effets de l'inhibition ou de la surexpression de CD38 sur les niveaux de NAD rénal au cours de l'IRA. Néanmoins, il a été montré dans un modèle murin d'IRA induite par les lipopolysaccharides (LPS), que l'expression de CD38 était nettement augmentée dans les macrophages rénaux, et que l'inhibition de CD38 atténuait l'inflammation et les lésions rénales [125].

Dans la MRC, une hyperactivation des PARPs et de CD38 est également retrouvée dans le rein (**Figure 20**). L'augmentation de l'activité des PARPs dans le rein en particulier dans les CTP, est retrouvée dans plusieurs modèles de MRC [131,163,171]. La suppression du gène *PARP* ou l'inhibition pharmacologique de PARP1 augmentaient le contenu rénal en NAD et l'activité des SIRT6 [119], et réduisaient l'inflammation, l'apoptose et les dommages sur le rein [172–175]. La surexpression rénale de CD38 dans la néphropathie diabétique est associée à une diminution des niveaux du NAD, tandis que l'inhibition pharmacologique du CD38 permet de restaurer le NAD rénal et l'activité des SIRT6, et d'atténuer l'inflammation et la fibrose rénale [118,124]. Actuellement, aucune observation clinique ne montre d'augmentation de l'activité de CD38 dans le cadre des maladies rénales aiguës ou chroniques [121,131]. Des études complémentaires seront nécessaires pour confirmer le rôle de cette voie de consommation de NAD dans la pathogenèse des maladies rénales chez l'Homme.

En conclusion, la réduction du NAD dans les tissus rénaux pathologiques est probablement le résultat d'une combinaison entre une consommation accélérée et une biosynthèse réduite du NAD [62,66,90,176–179]. Cependant, aucune des études précédentes n'a fourni de détails sur le mécanisme de la diminution des niveaux de NAD ni sur la répression de l'enzyme QPRT lors de la maladie rénale aiguë ou chronique.

## **2.2. Conséquences cellulaires d'une réduction du NAD**

Etant donné que le NAD est impliqué dans de nombreuses réactions d'oxydoréduction et qu'il fonctionne comme un cosubstrat dans de nombreuses réactions enzymatiques, il est difficile d'isoler une seule voie effectrice pathologique d'aval dans l'IRA. Au lieu de cela, l'IRA peut



être vue comme un état temporaire de déséquilibre de l'homéostasie du NAD avec des conséquences cellulaires délétères multiples.

De faibles concentrations de NAD et de SIRT1 entraînent des altérations fonctionnelles mitochondriales, qui conduisent à une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une diminution des défenses antioxydantes [133]. À faibles niveaux, les ROS régulent plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, la survie et la croissance cellulaire. Cependant, des niveaux élevés de ROS activent des voies de signalisation telles que la voie P53/P21 et la voie des MAPKinases, ce qui entraîne une activation de l'apoptose et de l'inflammation [180–182].

Plusieurs études ont montré qu'un faible niveau de NAD et une fonction mitochondriale compromise entraînaient une perturbation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras pendant l'IRA [74,183–185]. La  $\beta$ -oxydation défectueuse et l'augmentation de la désaturation des AGPI en AGHI due à la carence en NAD et à la fonction mitochondriale altérée, entraînaient l'accumulation de lipides dans les cellules tubulaires rénales [66,100]. Le dysfonctionnement de la  $\beta$ -oxydation est un facteur majeur de fibrose rénale [186]. Un défaut de la  $\beta$ -oxydation rénale et l'accumulation de lipides participent probablement à la TEM, augmentant ainsi le risque de développer une MRC à partir d'une IRA même transitoire [65,158,187,188]. Ce phénomène indique que le NAD joue un rôle significatif dans la progression de la fibrose rénale en régulant la  $\beta$ -oxydation. Dans ce travail de thèse, nous allons regarder l'implication de la diminution du NAD, en particulier la persistance de la réduction de la QPRT au niveau rénal, dans la transition de l'IRA vers la MRC.

### **3. Potentiel thérapeutique du NAD dans les maladies rénales**

Plusieurs thérapies potentielles qui favorisent la régénération du NAD ont été testées dans une variété de modèles précliniques et cliniques de maladies rénales aiguës et chroniques pour limiter les dommages rénaux et favoriser la récupération de la fonction rénale.

Le niveau de NAD peut être augmenté par (i) la supplémentation alimentaire contenant ses précurseurs, tels que le NA, le NAM, le NR et le NMN, (ii) l'inhibition de ses enzymes consommatrices, notamment PARP1, ou (iii) la régulation à la hausse d'enzymes impliquées dans sa biosynthèse [72].

De nombreuses études menées sur des organismes modèles (nématodes, rongeurs, etc.) ainsi que chez l'Homme ont montré les effets bénéfiques de l'augmentation du NAD dans diverses maladies rénales, qu'elles soient aiguës ou chroniques [66,72,189].

**Dans le contexte de l'IRA**, la restauration des niveaux de NAD par l'administration d'activateurs de SIRT6 [190], d'inhibiteurs de PARPs [132,162,167], d'inhibiteurs d'ACMSD [71], ou par la supplémentation en NMN [176,191,192], NR [137], NAM [62,74,141] et NA [193] protégeait contre les lésions rénales aiguës toxiques ou ischémiques.

La suractivation des PARPs entraîne des lésions rénales et une apoptose par diminution du métabolisme énergétique dans les tissus rénaux. L'utilisation de PARPi peut réduire significativement l'IRA septique ou ischémique en améliorant le métabolisme énergétique du rein et en inhibant la réponse inflammatoire [189,132,162,167]. Les PARPi tels que l'olaparib, émergent comme une nouvelle stratégie thérapeutique pour réguler les niveaux de NAD. Cependant, les PARPi doivent être utilisés avec prudence puisque les PARPs jouent un rôle essentiel dans la réparation de l'ADN, ce qui pourrait être important dans la phase de récupération de l'IRA [189,163]. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer l'efficacité des PARPi dans l'IRA clinique.

La fonction mitochondriale altérée peut être récupérée par des activateurs de SIRT6, tels que le SRT1720 [194]. Il a été montré dans l'IRA expérimentale que les activateurs de SIRT6 entraînaient la désacétylation et l'activation de PGC1 $\alpha$ , la récupération de la fonction et la biogenèse mitochondriales, et l'atténuation des lésions rénales [190,195,196].

Des travaux récents de Katsyuba et *al.* ont montré que l'inhibition pharmacologique de l'enzyme ACMSD dans des modèles rénaux *in vitro* et *in vivo* pouvait avoir des effets bénéfiques sur le rein en augmentant les niveaux de NAD [71]. Le traitement des cellules tubulaires rénales humaines, HK-2 (human kidney 2) avec le TES-1025, augmentait les niveaux de NAD et d'ATP, tout en réduisant l'apoptose induite par le cisplatine. De plus, l'inhibition pharmacologique de l'ACMSD augmentait efficacement les niveaux de NAD chez le ver *Caenorhabditis elegans*. Enfin, l'administration de TES-991 ou TES-1025 à des souris avec IRA induite par le cisplatine ou l'IR, boostait la synthèse *de novo* de NAD, décelée par une diminution du QA et une augmentation du NAD dans le rein, et protégeait la fonction rénale [71].

L'utilisation de précurseurs de NAD tels que le NAM est associée à une légère amélioration de l'IRA ischémique chez des modèles animaux et chez des patients [141,74,62]. Tran et *al.* ont montré que la stimulation de la biosynthèse du NAD via la voie de récupération, en utilisant du NAM exogène, améliorait l'IRA ischémique chez la souris [74]. Cependant, Piedrafita et *al.* ont constaté une absence d'augmentation du contenu en NAD rénal ou d'amélioration de la fonction rénale chez les souris avec IRA ischémique supplémentées en NAM [197]. Poyan Mehr et *al.* ont montré dans une étude clinique (NCT02701127, **Tableau 3**) que

l'administration orale de NAM la veille d'une chirurgie cardiaque, le jour même et le lendemain, semblait prévenir la survenue de l'IRA [62]. En revanche, afin de confirmer l'efficacité du NAM en tant que thérapie préventive peu coûteuse de l'IRA, des essais cliniques randomisés suffisamment puissants seront nécessaires ; certains sont en cours (**Tableau 3**).

L'apport de NR dans l'IRA toxique et ischémique chez la souris a permis d'améliorer la fonction rénale et les lésions tubulaires [137]. A l'inverse, une étude a rapporté que l'administration prophylactique de NR chez des rats soumis à une IRA ischémique n'atténuait pas les lésions tubulaires aiguës [133]. En revanche, un essai clinique (NCT03176628, **Tableau 3**) a montré que l'administration de NR associé au pterostilbène, un activateur puissant des SIRT6, par voie orale (capsule NRPT) augmentait les niveaux de NAD dans le sang et améliorait le DFG chez des patients avec une IRA de causes variées [198]. En vue de l'action réno-protectrice prometteuse de l'association NRPT, une étude de phase II est en cours chez des patients traités par réparation complexe d'anévrisme aortique et reconstruction de la crosse aortique (NCT04342975).

La supplémentation systémique en NMN chez la souris avec IRA toxique ou ischémique augmentait le contenu rénal en NAD et l'activité de la SIRT1, atténuait les lésions rénales aiguës et restaurait la fonction rénale [176,191]. Une étude récente de 2023, a montré que la supplémentation en NMN ou NR conférait des bénéfices comparables contre l'IRA induite par le cisplatine chez les souris [134]. Un essai clinique est actuellement en cours pour évaluer l'efficacité du MIB-626, une forme orale microcristalline de NMN, dans la protection rénale chez des adultes atteints de la COVID-19 (SARS-CoV-2) (**Tableau 3**).

L'utilisation de NA protège les rats contre les lésions rénales aiguës ischémiques [193]. Récemment, un essai clinique (NCT04893733) a évalué l'efficacité d'un complexe de vitamines B (B1, B6 et B12) administré par voie intraveineuse chez des patients hospitalisés atteints d'IRA de causes variées [199]. Les résultats ont montré une amélioration de la récupération rénale totale et une réduction du risque de développer une néphropathie chronique *de novo* ou de progression d'une néphropathie chronique préexistante mais aucun effet sur la survie à 3 mois [199]. Le mécanisme des effets bénéfiques de cette thérapie sur le contenu en NAD et le rein n'est pas encore complètement compris, bien que le rôle incontestable de la vitamine B6 en tant que coenzyme (**Figure 11**) de plusieurs enzymes de la voie *de novo* du NAD soit établi [200]. En conclusion, toutes ces études montrent donc que la supplémentation en précurseurs de NAD peut avoir un effet réno-protecteur; des études supplémentaires seraient nécessaires pour évaluer leur efficacité thérapeutique sur l'IRA et sa progression en MRC.

**Dans le contexte de la MRC**, les options de traitement spécifiques pour ralentir la progression de la maladie et prévenir ses complications sont limitées. La supplémentation en précurseurs de NAD présente le potentiel de cibler les complications métaboliques et cliniques associées à la MRC, telles que la dyslipidémie, la dysfonction musculaire squelettique, les altérations du métabolisme des acides aminés, et le stress oxydatif [66].

La supplémentation en NAM, NR et NA a été évaluée chez la souris et l'Homme atteints de MRC [72].

L'utilisation du NAM a permis de réduire l'inflammation et la fibrose rénale chez la souris avec MRC [201,202], d'augmenter la concentration plasmatique du NAD, et de lutter contre l'hyperphosphatémie chez des patients hémodialysés [203]. Cependant, l'efficacité de ce traitement dans la MRC reste controversée. Un essai clinique sur la MRC modérée à sévère avec un traitement combiné de NAM (NCT02258074) pendant une période de 12 mois (**Tableau 3**) n'a montré aucun effet bénéfique sur la fonction rénale ou sur sa progression [204,205]. Cela suggère que cette approche pourrait ne pas être bénéfique sur la MRC avancée étant donné que les dommages rénaux sont déjà sévères [163]. De plus, l'administration de NAM n'a pas toujours amélioré la MRC car, selon certaines études, le NAM exogène est dégradé en TUs, N-Me-2PY et N-Me-4PY, qui s'accumulent et aggravent la MRC [155,206].

La supplémentation prophylactique de souris en NR n'avait aucun effet bénéfique sur la fonction rénale ou la progression de la MRC chez la souris (modèle d'OOU et modèle protéinurique POD-ATTAC) [137]. L'administration combinée du NR avec la coenzyme Q10 (Q) (**Figure 15** et **Tableau 3**) pendant six semaines chez des patients avec MRC modérée à sévère a montré une légère amélioration des marqueurs du métabolisme mitochondrial et de la dyslipidémie, ce qui mérite d'être confirmé par des études de plus longue durée [207].

De même, l'administration de NA (niacine) chez la souris réduisait plusieurs complications de la MRC, notamment l'hypertension artérielle et la protéinurie, en atténuant le stress oxydatif et l'inflammation [208]. De plus, une amélioration de la fonction rénale et de la dyslipidémie a été observée chez les patients atteints de MRC supplémentés en NA [209,210]. Cependant, une autre étude de phase IV n'a montré aucun effet bénéfique de la supplémentation en NA sur la MRC (NCT00852969) [211].

**Tableau 3 : Synthèse des essais cliniques des précurseurs du NAD en lien avec l'IRA et la MRC [212].**

Condition / Maladie	Précurseur de NAD	Dose/Posologie /Voie d'administration	Durée de Traitement	Age (ans)/ Sexe	Population	Titre de l'étude	Phase	Statut	NCT/ Références
IRA	NAM	1 g ou 3 g par jour de NAM, (1 j en pré-chirurgie, en post-chirurgie et 24 h après), VO	3 jours	+18/ tous	Patients avec chirurgie cardiaque	Molecular effects of vitamin B3 (Niacinamide) in acute kidney injury	I	Complété	NCT02701127 [62]
IRA	NAM	3 g par jour NAM, VO	3 jours	+18/ tous	Patients avec chirurgie cardiaque	NAD <sup>+</sup> augmentation in cardiac surgery associated myocardial injury trial (NACAM)	II	En cours de recrutement	NCT04750616
IRA	NAM	NAM (500 mg mixé dans 50 ml d'eau saline), chaque 12 h, IV	3 jours	+18/ tous	Patients avec choc septique	Does high- dose vitamin B3 supplementation prevent major adverse kidney events during septic shock? (VITAKI)	III	En cours de recrutement	NCT04589546
IRA	NAM	1 g ou 3 g par jour de NAM (Immédiatement en pré-transplantation, puis en post-transplantation et 24 h après), VO	3 jours	+18/ tous	Transplantés rénaux	Graft Acute Kidney Injury: Vitamin B3 to facilitate renal recovery in the early life of a transplant	III	Pas de recrutement encore	NCT05513807
IRA	NR	2X capsule par jour (Chaque capsule	2 jours	+18/ tous	IRA induite par médicaments néphrotoxiques,	Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of basis	I	Complété	NCT03176628 [198]

Condition / Maladie	Précurseur de NAD	Dose/Posologie /Voie d'administration	Durée de Traitement	Age (ans)/ Sexe	Population	Titre de l'étude	Phase	Statut	NCT/ Références
		NR/Ptérostilbène : 250/50 mg, 500/100 mg, 750/150 mg ou 1000/200 mg), VO			produits de contraste, chirurgie cardiaque, hypotension	in acute kidney injury study (BAKIS)			
IRA	NR	4X capsule Basis™, 2X/J, (Chaque capsule : 125 mg de NR et 25 mg de Ptérostilbène), VO	8 semaines (2 semaines pré-chirurgie et 6 semaines post-chirurgie.	+18/ tous	Patients traités par réparation complexe d'anévrisme aortique et reconstruction de l'arc aortique	Protection from acute kidney injury (AKI) with Basis™ treatment	II	En cours de recrutement	NCT04342975
IRA	NR	2X capsule, 2XJ, (Chaque capsule : 250 mg de NR), VO	10 jours	+18/ tous	Patients atteints de la SARS-CoV-2 (COVID-19)	Nicotinamide riboside in SARS-CoV-2 (COVID-19) patients for renal protection (NIRVANA)	II	Pas de recrutement encore	NCT04818216
IRA	NMN	1 g MIB-626, 2XJ, VO	14 jours	+18/ tous	Patients atteints de la COVID-19	Phase 2a MIB-626 vs. placebo COVID-19	II	En cours de recrutement	NCT05038488
IRA	Vitamine B	1X complexe de vitamine B (vitamine B1, B6 et B12), 2XJ, IV	5 jours	18-100/tous	IRA de toutes causes confondues	Intravenous administration of vitamin B complex improves renal recovery in patients with AKI (VIBAKI)	IV	Complété	NCT04893733 [199]
MRC	NAM	1X capsule NAM de 750 mg 2XJ, et 2X capsule de 500 mg de carbonate	12 mois	18-85/ tous	Patients avec MRC avec DFG < 60 ml/min/1,73 m <sup>2</sup> sans dialyse	The COMBINE study: the CKD optimal management with	II	Complété	NCT02258074 [204,205]

Condition / Maladie	Précurseur de NAD	Dose/Posologie /Voie d'administration	Durée de Traitement	Age (ans)/ Sexe	Population	Titre de l'étude	Phase	Statut	NCT/ Références
		de lanthanum, 1XJ, VO				BInders and Nicotinamide (COMBINE)			
MRC	NR	1X capsule de 600 mg de NR et 2X capsule de 250 mg Coenzyme Q10, 2XJ, VO	6 semaines	30-79/ tous	Patients avec MRC avec DFG < 60 ml/min/1,73 m <sup>2</sup> sans dialyse	Trial of nicotinamide riboside and Co-enzyme Q10 in chronic kidney disease (CoNR)	II	Complété	NCT03579693 [207]
MRC	NR	500 mg NR, 2XJ, VO	3 mois	35-80/ tous	Patients avec MRC en stades 3-4 (DFG : 59-15 ml/min/1,73 m <sup>2</sup> ).	Nicotinamide riboside supplementation for treating arterial stiffness and elevated systolic blood pressure in patients with moderate to severe CKD	II	En cours de recrutement	NCT04040959
MRC	NMN	1 g MIB-626, 2XJ, VO	24 semaines	+60/tous	Patients atteints de néphropathie diabétique	NAD Augmentation in Diabetes Kidney Disease	II	En cours de recrutement	NCT05759468
MRC	NA	1000 mg par jour de NA, VO	14 semaines	21-80/ tous	Le stade 2 de la MRC (DFG > 60 ml/min/1,73 m <sup>2</sup> et microalbuminurie /protéinurie) et les stades 3-4 (DFG : 59-15 ml/min/1,73 m <sup>2</sup> ).	Niacin and endothelial function in early CKD	IV	Complété	NCT00852969 [211]

#### IV. Catabolisme du TRP, activation de la voie des kynurénines en physiopathologie rénale

Dans le rein, le catabolisme du TRP via la voie des kynurénines génère des métabolites biologiquement actifs qui jouent un rôle crucial dans la modulation de la réponse immunitaire et du métabolisme énergétique [89,213].

##### 1. Description de la voie des kynurénines

Dans le rein, la voie des kynurénines peut être subdivisée en trois branches distinctes comme le montre la **Figure 11**.

- La branche de la synthèse *de novo* de NAD où la KYN est convertie en 3-HK, 3-HANA puis en QA, pour finalement aboutir à la production de NAD, qui est le produit final privilégié de la voie des kynurénines [214].
- La branche du KA qui conduit à la production de KA et de XA, médiée par les KATs. Cependant, cette voie est mineure dans des conditions physiologiques, probablement en raison de la cinétique enzymatique qui la régit [214]. Cette voie se voit donc activée dans les conditions qui conduisent à une augmentation du niveau du TRP ou de la KYN, ou l'inhibition de la KMO [214].
- La branche du PIC, médiée par l'enzyme ACMSD, qui convertie l'ACMS en AMS puis en PIC par cyclisation non enzymatique. En physiologie normale, la voie des kynurénines est orientée principalement vers la production du NAD. Le PIC ne peut être formé en quantités plus importantes que lorsque l'ACMSD est saturée par son substrat, l'ACMS [214].

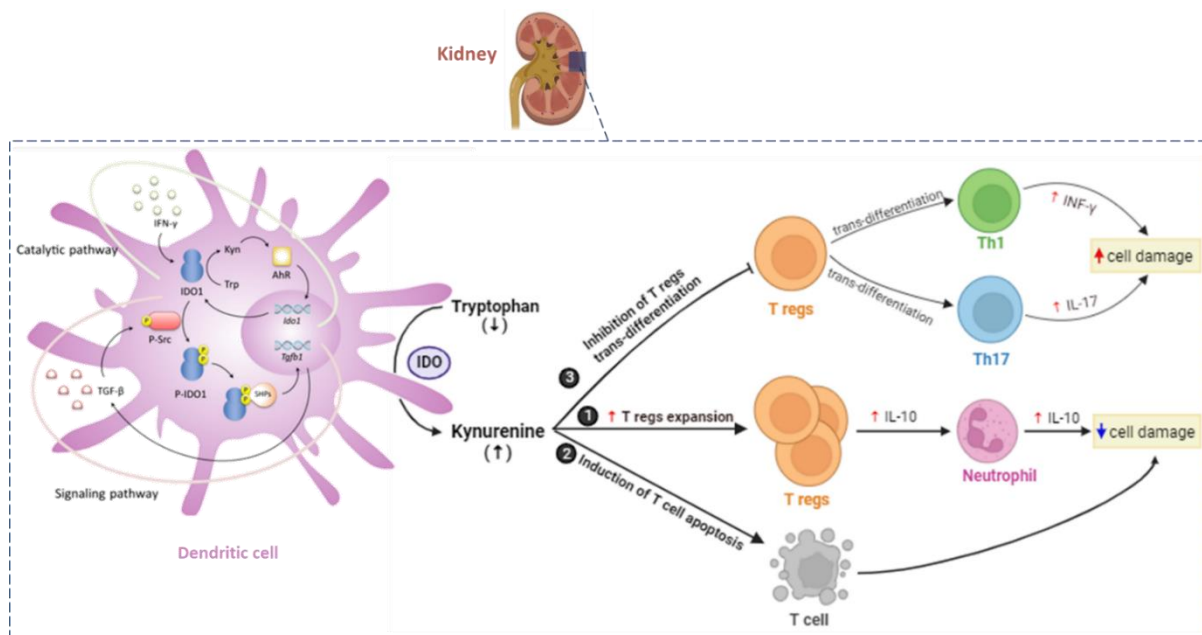
##### 2. Fonctions des catabolites de la voie des kynurénines dans le rein

Des preuves de plus en plus nombreuses soutiennent l'idée que l'inflammation joue un rôle clé dans l'activation de la voie des kynurénines et que, réciproquement, les métabolites de la voie des kynurénines agissent comme des modulateurs clés de la réponse inflammatoire [215]. La cytokine pro-inflammatoire interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) est un puissant activateur de l'IDO [216,217]. De plus, le facteur de croissance TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) favorise la phosphorylation de l'IDO, ce qui entraîne une production supplémentaire du TGF- $\beta$  et de l'IDO (**Figure 21**). Une sécrétion prolongée et soutenue de cette cytokine pro-fibrotique, TGF- $\beta$ , conduit à la fibrose post-IRA et à une dysfonction rénale chronique [216]. Des effets immunomodulateurs sur les cellules dendritiques (CDs) et les lymphocytes T ont été établis pour la plupart des métabolites de la voie des kynurénines, notamment la KYN, le KA, le 3-



HANA, le QA et le PIC [89,218–221]. Dans le rein, les CDs résident principalement dans les espaces interstitiels du cortex rénal [222].

La KYN produite suite à l'activation de l'IDO par l'IFN- $\gamma$ , agit comme un agoniste du récepteur de l'hydrocarbure aromatique (AhR) [220], qui, une fois activé, régule à son tour l'IDO, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif de l'IDO (**Figure 21**). La KYN est bénéfique pour le rein notamment en cas de lésions rénales aiguës. Produite par les CDs rénales, la KYN favorise l'expansion des lymphocytes T régulateurs (T regs) et la sécrétion de l'interleukine immunosuppressive, l'IL-10, par les polynucléaires neutrophiles, tout en inhibant la production des cytokines pro-inflammatoire, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-17, par les lymphocytes T (Th1 et Th17).

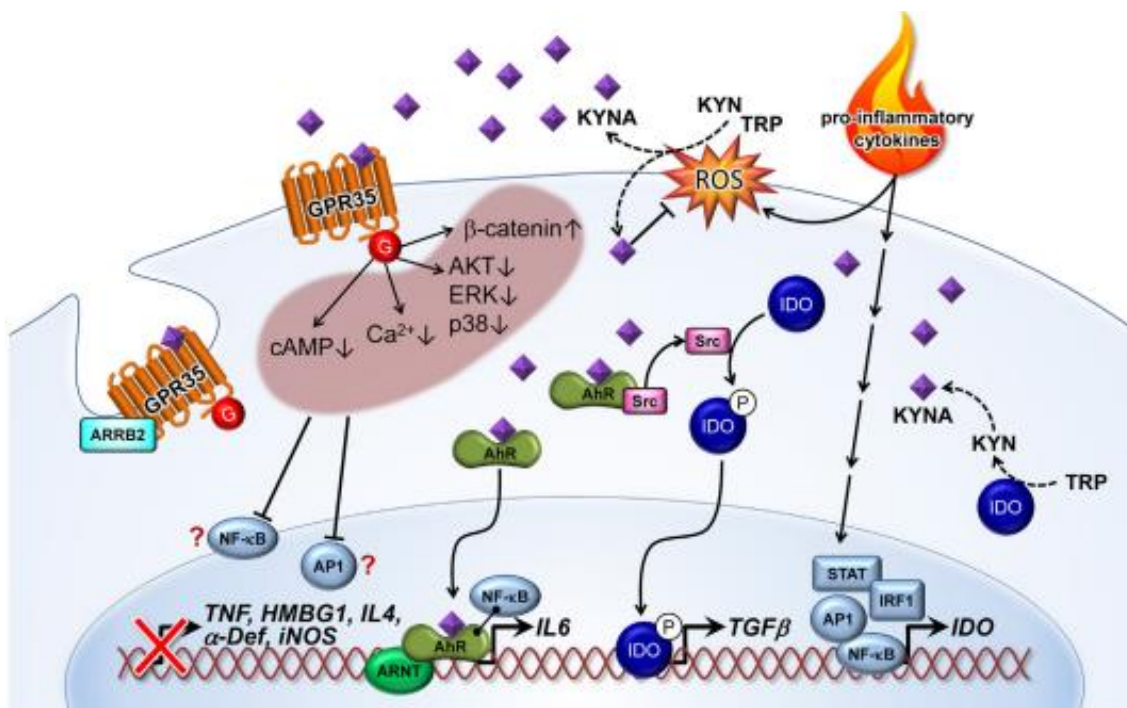


**Figure 21 : Effets immunomodulateurs de la voie des kynurénines au cours de l'inflammation.** Adapté de Proietti et *al.*, 2020.

L'expression de l'IDO dans les cellules dendritiques rénales est régulée à la hausse par l'IFN- $\gamma$ . L'IDO dégrade alors le tryptophane et produit de la kynurénine, un agoniste du récepteur de l'hydrocarbure aromatique (AhR). Le AhR, une fois activé, peut conduire à une régulation positive supplémentaire de l'IDO. La kynurénine induit (1) l'expansion des T regs et la sécrétion de l'IL-10 par les polynucléaires neutrophiles, (2 et 3) inhibe la production de l'IFN- $\gamma$  et l'IL-17 par les lymphocytes T et diminue les lésions rénales. Le TGF- $\beta$  favorise la phosphorylation de l'IDO dans ses motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) par les kinases Src. L'interaction de l'IDO phosphorylée avec les phosphatases SHPs, active à son tour la transcription de TGF- $\beta$ .

Comme illustré dans la **Figure 22**, le KA agit comme modulateur anti-inflammatoire, en activant le récepteur couplé à la protéine G35 (GPR35) et le AhR dans les cellules immunitaires et rénales [221,223]. De plus, le KA est un antagoniste non-compétitif des récepteurs du glutamate, le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) et le récepteur  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-

méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), présents dans le rein [221,224]. L'activation basale du NMDAR est essentielle pour le bon fonctionnement rénal, mais sa suractivation peut entraîner des altérations structurales et fonctionnelles du rein [224]. Les effets potentiels des agonistes et antagonistes du NMDAR sur ce récepteur ne sont pas encore entièrement compris [224]. Des études ont montré que l'inhibition du NMDAR, entre autres par le KA améliorerait l'IRA induite par l'IR, tandis que son activation atténuait la TEM et la fibrose rénale [225,226]. Des recherches futures seront nécessaires pour approfondir notre compréhension des interactions du KA avec ses récepteurs et leur implication dans la physiopathologie rénale.



**Figure 22 : Effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires de l'acide kynurénique.**

D'après Wirthgen et al., 2017.

Le 3-HANA, le QA et le PIC sont également décrits comme des immunosuppresseurs, mais leurs rôles dans la physiologie rénale ne sont pas clairs [227,228]. En plus d'être le catabolite de la voie des kynurénines qui favorise la synthèse du NAD, le QA agit comme un agoniste du NMDAR et semble jouer un rôle anti-inflammatoire. Il contribue à réduire l'activité des lymphocytes T CD8 cytotoxiques et favorise un équilibre en faveur des lymphocytes auxiliaires CD4 de type Th2 par rapport aux Th1 [229].

### 3. Activation de la voie des kynurénines en pathologie rénale

#### 3.1. Activation de la voie des kynurénines au cours de l'IRA

Une réduction du TRP, le substrat initial de la voie des kynurénines, est décrite dans l'IRA, qu'elle soit ischémique, septique ou toxique, et que ce soit dans un contexte expérimental ou clinique. Cette diminution, identifiée au niveau du rein [62], des urines [62,230,231] et du plasma [231–236], est un indicateur manifeste de l'activation de la voie des kynurénines. Exceptionnellement, dans l'IRA expérimentale induite par la gentamicine, qui inhibe spécifiquement l'activité de l'IDO [215,237], le taux de TRP ne diminuait pas [238,239].

Pendant l'IRA, l'inflammation causée par les lésions rénales initiales est entretenue par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$ , un puissant activateur de l'IDO [215–217,220]. Une augmentation de l'expression de l'IDO est retrouvée au cours de l'IRA ischémique ou toxique chez la souris, qu'il soit au niveau des CTP [240] ou des CDs de l'interstitium [241]. Cependant, l'étude transcriptomique sur le rein total n'a pas toujours confirmé cette hyperactivation de l'IDO dans l'IRA expérimentale ischémique ou toxique [74,137,135]. Chez l'Homme, une augmentation de l'expression transcriptionnelle et protéique de l'IDO est également observée dans les CTP de greffons après ischémie froide [137] ou rejet aigu [232]. De plus, une augmentation du ratio KYN/TRP, marqueur indirect de l'activation de l'IDO, a été observée chez des greffés rénaux, tant dans l'urine [232] que dans le plasma [231,232,242], lors des épisodes d'IRA [235] ou de rejet de greffe [231,232,242].

La suppression génétique ou pharmacologique de l'IDO dans l'IRA ischémique réduit l'infiltration lymphocytaire du rein, la nécrose tubulaire, et améliore la fonction rénale [240]. Cependant, l'effet inverse s'est produit dans un modèle murin d'IRA induite par le cisplatine, lorsque les souris avaient préalablement reçu une injection intraveineuse de CDs dans lesquelles l'IDO avait été inhibée [241]. Malgré ces divergences constatées, il est important de noter que les deux études ont été réalisées sur une espèce identique de souris, du même sexe, et ont fait appel au même traitement pharmacologique (1-méthyl-TRP) visant à entraver la production de la KYN par l'IDO. Les auteurs de la deuxième étude ont conclu que la KYN conférait un phénotype immunotolérant aux CDs qui la produisent, permettant l'expansion des lymphocytes T regs et la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 [241]. En revanche, en l'absence de KYN, suite à l'inhibition de l'IDO dans les CDs, les T reg se différenciaient plutôt en cellules Th1 et Th17 produisant l'INF- $\gamma$  et l'IL-17 qui sont néfastes pour le rein (**Figure 21**). Ces observations soulignent l'importance cruciale de l'activité immunosuppressive de l'IDO produite par les CDs pour la protection rénale.

La diminution du TRP, associée à la répression quasi systématique de la QPRT, l'enzyme clé de la synthèse *de novo* du NAD, au cours de l'IRA (voir supra), est en faveur d'une accumulation des métabolites en amont de celle-ci, et/ou d'une activation d'une ou plusieurs autres branches de la voie des kynurénines. Une activation de la branche de la voie des kynurénines conduisant à la synthèse du KA à partir de la KYN sous l'action de la KAT a été décrite dans l'IRA. Une augmentation du KA et/ou du ratio KA/TRP plasmatique a été observée dans l'IRA expérimentale, qu'elle soit ischémique, toxique ou septique [234,236,243]. Cette élévation du KA plasmatique était corrélée au degré de l'inflammation systémique [243]. De manière notable, des taux élevés du KA et/ou du ratio KA/TRP ont également été observés dans les urines de patients atteints d'IRA associée à la COVID-19, ou d'IRA d'origine multifactorielle [230,244].

### **3.2. Activation de la voie des kynurénines au cours de la MRC**

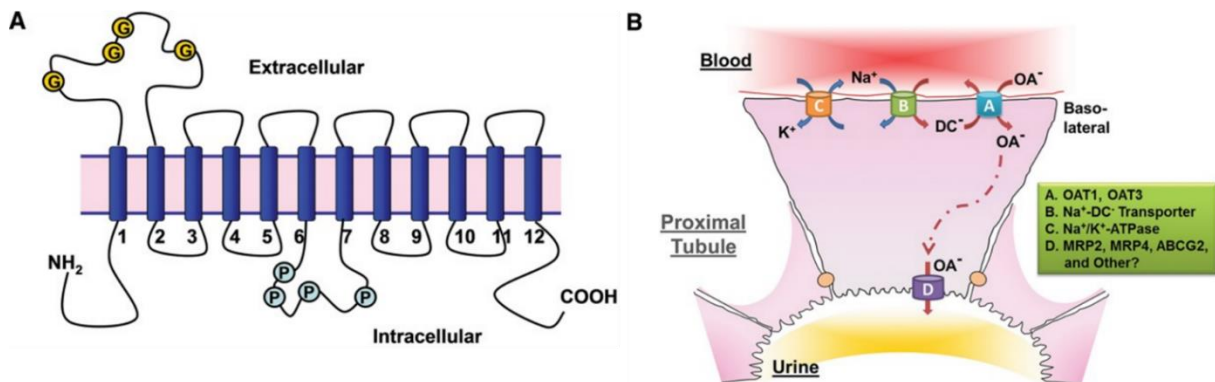
Bien que le rôle de l'IDO dans la MRC ne soit pas clairement établi, des études suggèrent que la corrélation entre la MRC et l'IDO pourrait être principalement due à l'inflammation chronique qui favorise l'activation de l'IDO [217]. Des recherches récentes ont montré que l'inhibition spécifique de l'IDO atténuait la fibrose rénale suite à la réduction de l'expression du TGF- $\beta$  dans le rein [245].

Une augmentation de l'expression rénale glomérulaire et tubulaire de l'IDO a été décrite dans des modèles expérimentaux de la MRC [246–249]. De même, plusieurs études réalisées sur des cohortes de patients atteints de MRC de différentes étiologies, ont montré une augmentation de l'activité de l'IDO [250–252,137], ainsi que des niveaux circulants réduits du TRP et une libération significative des métabolites de la voie des kynurénines notamment la KYN, le KA, le XA, la 3-HK et le QA [215,253–258]. Les ratios plasmatiques KYN/TRP et KA/TRP sont retrouvés plus élevés chez les patients atteints de MRC [253,259,260] et sont parfois corrélés au stade de la MRC [251,256,261,262].

Certains métabolites de la voie des kynurénines notamment la KYN (208 Da), le KA (189 Da), le QA (167 Da) sont considérés comme des TUs [263]. Ces dernières sont définies comme des résidus de composés organiques qui ne peuvent pas être éliminés par le rein. Au cours de la MRC, les TUs s'accumulent progressivement dans la circulation sanguine et favorisent la survenue de complications telles que les atteintes cardiovasculaires, la neurotoxicité et les atteintes osseuses regroupées sous le terme du « syndrome urémique » [263–265]. Classées en fonction de leur taille, leur capacité à se lier aux protéines plasmatiques et la facilité avec laquelle elles sont épurées lors des dialyses, les TUs sont subdivisées en trois catégories [266]

: (i) les petites molécules hydrosolubles de poids moléculaire inférieur à 500 Da comme l'urée, la créatinine et le NAM ; (ii) les molécules de poids moléculaire moyen supérieur à 500 Da difficilement dialysables telles que la cystatine C et (iii) les molécules liées aux protéines, non éliminées par dialyse comme la KYN, le KA et le QA.

D'un autre côté, la KYN, le KA, le XA et le QA ont été identifiés comme des substrats des transporteurs d'anions organiques (OAT1 et OAT3) exprimés sur les CTP [267–269] (**Figure 23**). Ainsi, l'élimination de ces métabolites du sang circulant, dépend à la fois de la filtration glomérulaire et de la sécrétion tubulaire. Leur élévation au niveau plasmatique pourrait indiquer un dysfonctionnement tubulo-interstitiel sous-jacent [253]. Ces métabolites pourraient servir de marqueurs potentiels de la fonction rénale indépendamment du DFG [215].



**Figure 23 : Mécanisme de sécrétion des anions organiques par le tubule proximal.** D'après Nigam et al., 2015.

**A :** Structure des transporteurs d'anions organiques (OAT). **B :** Mécanisme de la sécrétion tubulaire rénale des anions organiques tels que l'acide kynurénique, la kynurénine, l'acide xanthurénique et le quinolinate.

Des études longitudinales de cohorte de grande envergure ont révélé que l'augmentation plasmatique de la KYN, le KA et le ratio KYN/TRP était associée à l'apparition de la MRC [253,254,257]. Bien qu'une association entre les métabolites plasmatiques de la voie des kynurénines et le risque de progression de la MRC n'a pas été retrouvée à court terme (1 an) [270], il a été montré sur un suivi médian de 6 ans, qu'une clairance rénale du KA présentait une forte association avec la progression de la MRC [271]. Ces observations suggèrent que les métabolites de la voie des kynurénines pourraient avoir une valeur prédictive dans le développement de la MRC et sa progression.

#### **4. Suivi de l'IRA par les métabolites de la voie des kynurénines**

Les critères actuels de diagnostic clinique et de stadification de l'IRA sont basés sur les variations de la créatininémie et du débit urinaire. Cependant, la créatininémie est un biomarqueur de l'IRA peu sensible car son augmentation est souvent retardée après une lésion rénale [272]. Les métabolites de la voie des kynurénines pourraient constituer des biomarqueurs potentiellement pertinents sur le plan clinique pour évaluer les lésions rénales, à des fins diagnostiques, pronostiques et même thérapeutiques.

##### **4.1. Intérêt du ratio urinaire QA/TRP**

Des études récentes se sont intéressées à doser le QA urinaire dans différents modèles d'IRA, afin d'évaluer son potentiel en tant que marqueur pronostique précoce et non invasif de l'IRA [273]. Un ratio urinaire QA/TRP élevé était observé dans l'IRA, quelle que soit son origine [62,230,274]. Poyan Mehr et son équipe ont montré sur une cohorte de patients ayant subi une chirurgie cardiaque sous CEC que le ratio urinaire QA/TRP était fiable pour prédire l'apparition d'une IRA dès le premier jour après l'intervention [62]. Cette observation a été confirmée dans une autre étude portant sur 215 patients en USI ayant développé une IRA. Le ratio urinaire QA/TRP commençait à augmenter 2,5 jours avant l'apparition de l'IRA, et était associé à un risque plus élevé de morbidité et de mortalité hospitalière [62]. Contrairement au stress plus homogène provoqué par la chirurgie cardiaque, l'IRA survenant en USI est souvent due à une ischémie combinée à une néphrotoxicité et aux infections sévères [2].

Les travaux menés par Suhre et *al.* ont montré que le niveau de QA urinaire augmentait significativement en cas de rejet aigu d'allogreffe rénale [275,276]. Ce biomarqueur non invasif de l'état de l'allogreffe rénale représente une précieuse alternative pour réduire la dépendance aux biopsies rénales de routine. Son potentiel dans la prédiction du risque de rejet aigu de la greffe rénale et dans le suivi des transplantés rénaux nécessite toutefois des études transversales et longitudinales plus étendues.

En conclusion, le ratio QA/TRP dans l'urine a été proposé comme un marqueur diagnostique et pronostique potentiel dans l'IRA et la transplantation rénale, mais des études plus approfondies et à grande échelle seraient nécessaires pour valider sa pertinence en clinique.

##### **4.2. Intérêt des autres métabolites de la voie des kynurénines**

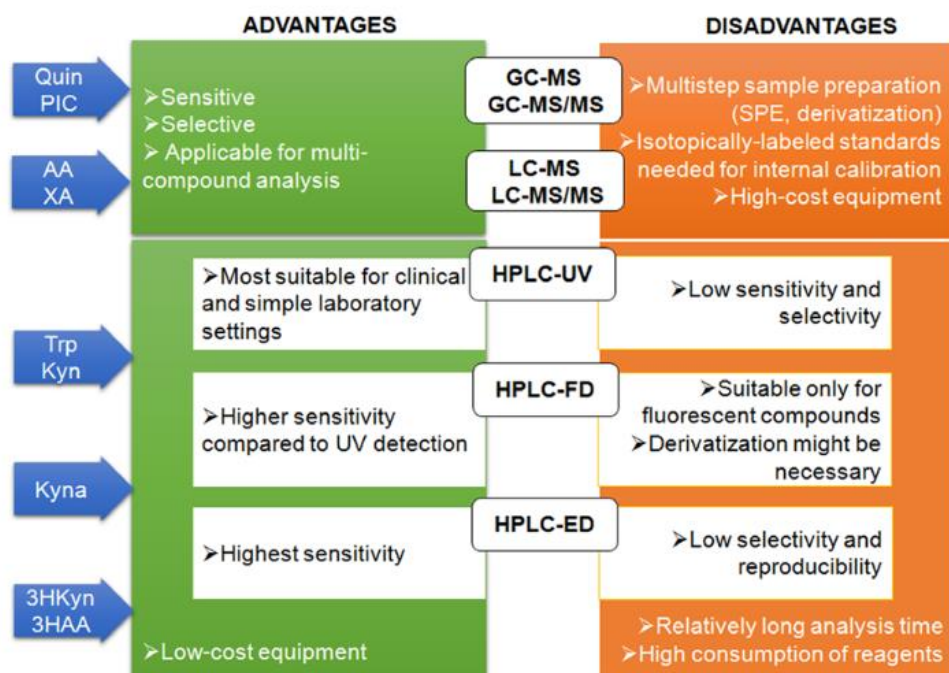
Dans un contexte d'IRA multifactorielle chez des patients suivis en USI, une augmentation du ratio urinaire KA/TRP était associée à une détérioration de la fonction rénale, un recours à la thérapie de remplacement rénal et une mortalité plus élevée à 30 jours [244]. Sur le même type de population d'étude, il a été montré qu'un ratio réduit de  $KA_{urinaire}/KA_{plasmatique}$  (qui renseigne

sur la filtration tubulaire) était associé à une IRA présentant un risque accru d'événements majeurs, à savoir un dédoublement de la créatininémie, une dépendance à la dialyse, ou un décès dans les 30 jours [277]. De plus, un taux élevé du KA plasmatique chez les patients souffrant d'IRA suite à un choc septique était prédictif du risque de mortalité à 30 jours [243]. Ainsi, le KA urinaire pourrait être un marqueur pronostique précoce de l'évolution de l'IRA. Dans le contexte de transplantation rénale, en raison de sa régulation par le système immunitaire, la voie des kynurénines présente un intérêt particulier pour la surveillance de la fonction du greffon après la transplantation rénale [278]. Des études longitudinales, ont montré que le taux du ratio urinaire KYN/TRP, deux semaines après transplantation, était corrélé à la fonction rénale du greffon après 2 ans de la greffe [279]. Cependant, le ratio urinaire KYN/TRP n'est probablement pas associé au risque de rejet de greffon ni à sa survie [280,281]. Au niveau plasmatique, l'augmentation des niveaux de la KYN après transplantation rénale prédit le risque de rejet aigu du greffon [242,281]. De plus, la 3-HK plasmatique est associée au rejet chronique de greffe et à la mortalité [281]. Des études plus approfondies sont nécessaires pour confirmer l'utilité clinique des métabolites de la voie des kynurénines dans la détection précoce du risque de rejet de greffe aigu et dans la surveillance à long terme de la fonction du greffon.

### **4.3. Dosage des métabolites de la voie des kynurénines**

#### **4.3.1. Méthodes d'analyse des métabolites du TRP**

Pour pouvoir adopter les métabolites de la voie des kynurénines comme biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques de l'IRA ou autres, il est essentiel de disposer de techniques de mesure sensibles, spécifiques et assez rapides. Actuellement, les méthodes analytiques les plus utilisées pour quantifier les métabolites du TRP dans les différentes matrices comprennent la chromatographie liquide (LC) ou gazeuse (GC) couplées à différents modes de détection tels que l'ultraviolet (UV), la fluorescence, et la spectrométrie de masse (MS) [282]. Dans de rares études, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) a également été employée [283]. Les avantages et les inconvénients de ces méthodes sont résumés dans la **Figure 24** ci-dessous



**Figure 24 : Comparaison des méthodes chromatographiques d'analyse des métabolites du TRP.** D'après Sadok et *al.*, 2017.

Les techniques utilisées pour doser les métabolites du TRP dans les principales études cliniques réalisées dans le cadre de l'IRA et la MRC sont résumées dans la revue de Wee et *al.* publiée en 2021 [215]. La détection par MS est largement plus sensible et sélective par rapport aux autres méthodes [282].

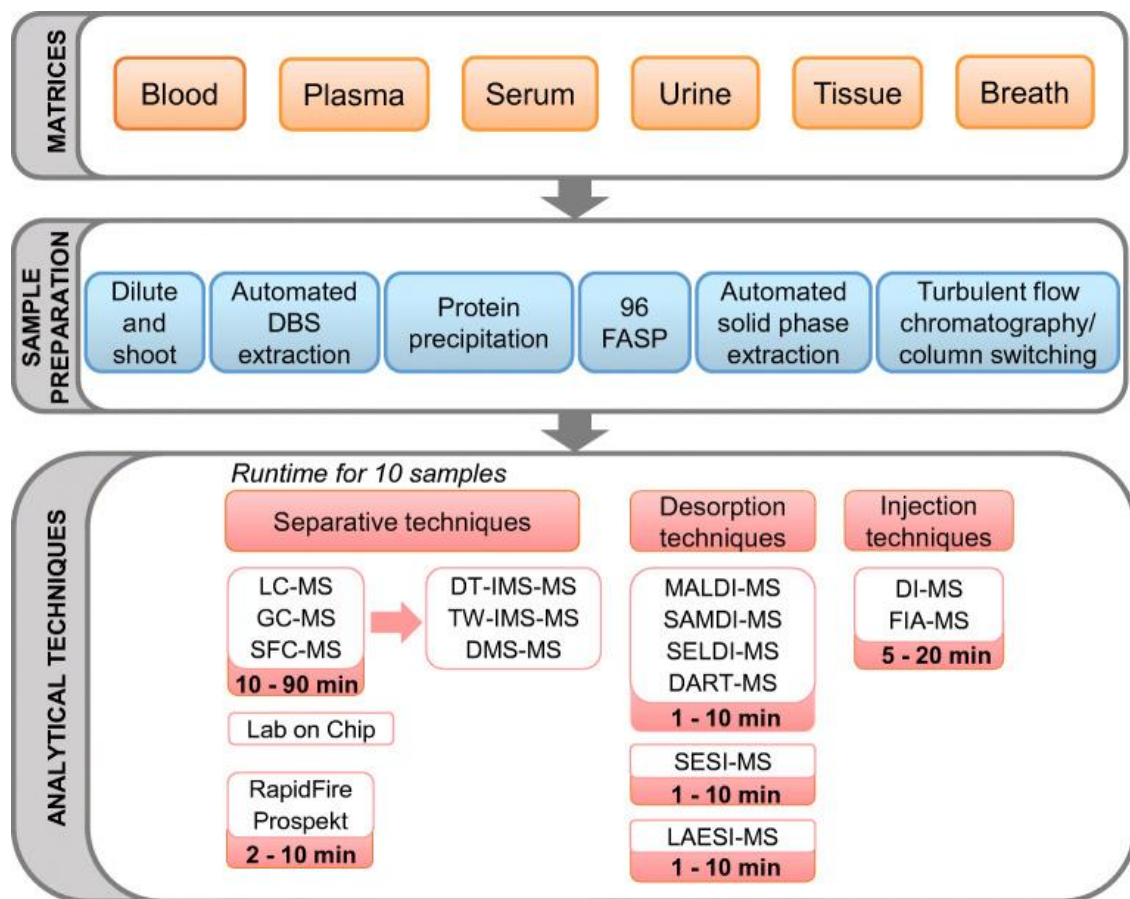
La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), demeure la méthode de référence pour doser les métabolites du TRP [284]. Toutefois, en raison de son coût élevé et de l'expertise approfondie requise pour le développement des protocoles et l'analyse des données, la LC-MS/MS n'est pas couramment utilisée en première ligne dans le diagnostic clinique. Des méthodes de dosage plus courantes telles que les techniques colorimétriques et enzymatiques, reconnues pour leur caractère économique, leur rapidité, leur besoin en faibles volumes d'échantillons et leur automatisation potentielle, ont été développées pour doser les métabolites du TRP [280,285]. Cependant, les résultats rendus par ces méthodes alternatives ne sont pas toujours concordants avec ceux obtenus avec la LC-MS/MS. Par exemple, une surestimation des taux de la KYN plasmatique a été observée avec la méthode enzymatique en comparaison à la LC-MS/MS [285]. Cette surestimation est attribuée à l'interférence des dérivés de la KYN tels que le KA et la 3-HK dans la méthode enzymatique. Ces interférences ne sont pas présentes dans la MS qui permet de discriminer de manière précise les différents métabolites entre eux.



Étant donné que le lien entre les métabolites du TRP et les maladies rénales n'est pas encore totalement compris, il est plus avisé et raisonnable de doser ces métabolites en utilisant la méthode de référence, la MS. Que ce soit dans les études translationnelles ou cliniques, cette technique prévient le risque de tirer des conclusions faussées en raison de méthodes analytiques insuffisamment spécifiques.

#### 4.3.2. Dosage des métabolites du TRP par LC-MS/MS

La LC-MS/MS fait partie d'un large panel de techniques d'analyse basées sur la MS [284]. Les grandes étapes d'analyse, comprenant la préparation des échantillons, l'analyse, et le traitement des données. Les techniques analytiques de dosage du TRP basées sur la MS sont résumées dans la **Figure 25**.



**Figure 25 : Principales étapes d'analyse par spectrométrie de masse.** D'après Bravo-Veyrat et Hopfgartner, 2022.

Différents échantillons biologiques comme le sang, l'urine, le liquide céphalorachidien, la salive et les tissus, mais aussi les cellules en culture, peuvent être analysées par LC-MS/MS.

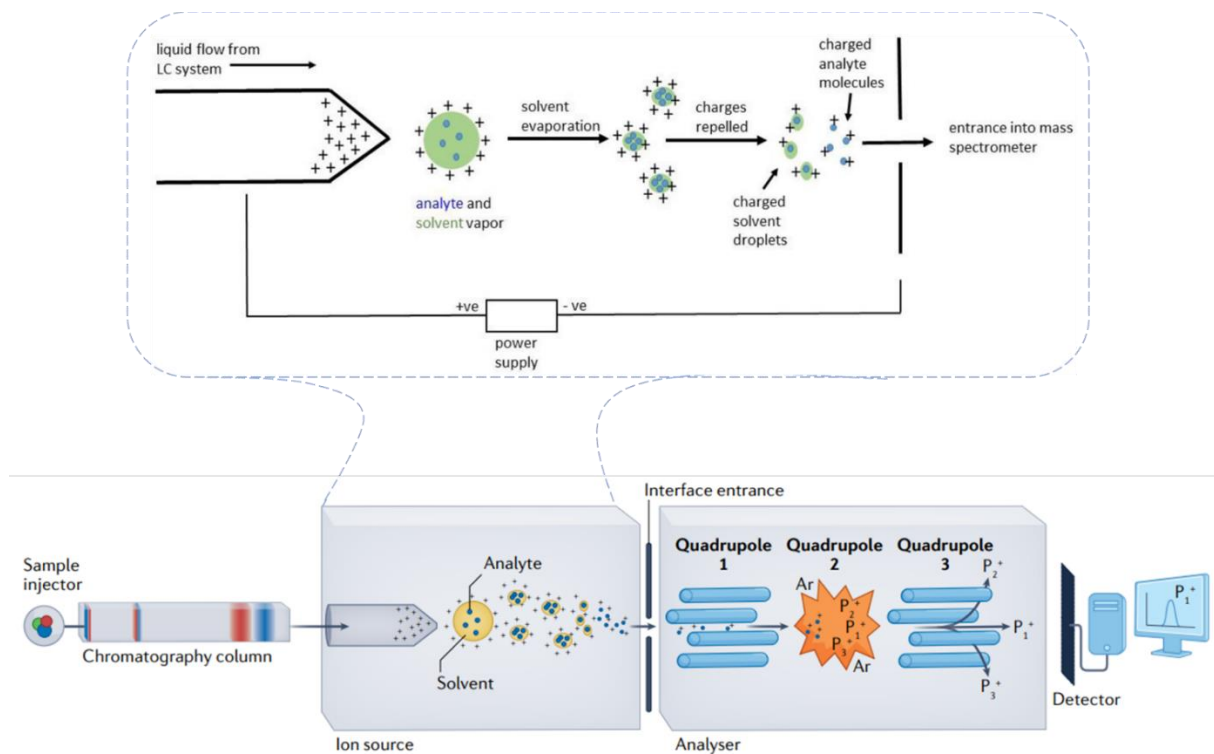
Le traitement des échantillons avant l'analyse chromatographique est une étape cruciale pour extraire et purifier les analytes d'intérêt à partir de la matrice biologique utilisée [286]. Il a pour intérêt de (i) éliminer les interférences et améliorer la sélectivité du dosage, (ii) concentrer l'analyte pour atteindre la limite de quantification requise, (iii) stabiliser l'analyte, et (iv) améliorer la robustesse du dosage. Le traitement pré-analytique de l'échantillon biologique fait souvent recours à des techniques d'extraction ou de précipitation des protéines utilisant différents solvants organiques et/ou inorganiques. Le choix de la méthode de traitement à adopter dépend du type de matrice étudiée et des analytes à quantifier [284]. La précipitation des protéines est une méthode largement utilisée pour le traitement d'échantillons plasmatiques et urinaires puisqu'elle nécessite moins d'étapes que les techniques d'extraction [284]. Les agents précipitants peuvent être d'origine organique tels que le méthanol, l'éthanol et l'acétonitrile, ou des sels en solution aqueuse tels que le sulfate de zinc [287]. Pour la quantification des kynurénines, les meilleurs agents précipitants semblent être le méthanol, l'éthanol et l'acétate d'ammonium mélangé avec du méthanol ou l'eau [282].

L'analyse des kynurénines est souvent réalisée en utilisant des échantillons enrichis en étalon interne. Cela permet de minimiser les interférences liées à la matrice biologique et d'améliorer la quantification des composés d'intérêt [282]. L'étalon interne peut être une molécule isotopique marquée avec des isotopes stables comme le carbone-13 ( $^{13}\text{C}$ ) et le deutérium ( $^2\text{H}$ ), ou un analogue structural de l'analyte à doser [282]. Les étalons internes isotopiques sont préférés aux analogues structuraux malgré leur coût élevé [282,288–293]. L'étalon interne isotopique a des propriétés chimiques identiques à celles de l'analyte cible ce qui permet de minimiser et de s'affranchir des contraintes de stabilité, d'effet matrice ou d'efficacité d'ionisation [294].

Le principe de la LC-MS/MS, résumé dans la **Figure 26**, est basé sur l'utilisation de la LC pour séparer les composés d'un échantillon, suivie de la MS en tandem pour identifier et quantifier les composés individuellement. La LC utilise une phase mobile liquide pour transporter l'échantillon à travers une colonne de séparation. Les composés sont séparés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et de l'équilibre différentiel entre la phase mobile et la phase stationnaire de la colonne chromatographique. Les composés séparés sont ensuite ionisés dans la source d'ionisation, puis fragmentés et analysés dans le spectromètre de masse.

La qualité de la séparation chromatographique impacte l'analyse simultanée de plusieurs métabolites. Les colonnes en silice octadécylée (ODS) sont privilégiées pour les métabolites du TRP en raison de leur forte interaction hydrophobe permettant une rétention efficace et une séparation optimale des métabolites [282]. De plus, l'acidification des phases mobiles favorise

les formes non ionisées de certains composés comme le QA et le PIC, améliorant ainsi leur affinité avec la colonne chromatographique. Ces ajustements permettent d'améliorer la résolution des pics chromatographiques des métabolites recherchés et leur quantification [295]. L'analyse par MS est basée sur la séparation des ions selon leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). Un spectromètre de masse est composé d'une source d'ionisation, d'un analyseur de masse et d'un détecteur (**Figure 26**). Il existe différentes approches pour générer des ions en phase gazeuse dans la source d'ionisation, notamment l'ionisation électronique, l'ionisation chimique et l'ionisation par électronebulisation [295].



**Figure 26 : Processus d'analyse en LC-MS/MS.** D'après Thomas et *al.*, 2022.

L'ionisation par électronebulisation appelée aussi ionisation par electrospray (ESI) (**Figure 26**) est basée sur la formation à pression atmosphérique, de molécules chargées issues d'un spray créé dans un champs électrique. Les ions générés sont ensuite filtrés par un analyseur de masse. Il existe plusieurs types d'analyseurs de masse, en particulier le triple quadripôle, le temps de vol (TOF) et l'Orbitrap. Les méthodes quantitatives avec un spectromètre de masse triple quadripôle impliquent trois quadripôles (**Figure 26**). Le premier quadripôle assure une trajectoire stable pour les ions ayant une valeur  $m/z$  spécifique correspondant aux composés d'intérêt, désignés comme ions précurseurs ou ions parents. Seuls les ions correspondant à cette valeur spécifique sont acheminés vers le deuxième quadripôle, où ils subissent une

fragmentation en plusieurs ions dits ions produits ou ions fils. Le troisième quadropôle est programmé pour sélectionner et laisser passer uniquement les ions ayant une valeur  $m/z$  précise, qualifiés d'ions fils, seuls à pouvoir parvenir jusqu'au détecteur. Ce système de détection permet ainsi une mesure précise et sélective du composé d'intérêt [295].

Plusieurs méthodes basées sur la LC-MS/MS ont été développées pour réaliser un profilage quantitatif des métabolites du TRP dans le plasma [282,288,289,292,296–299] et dans les urines [282,288,300,301]. L'un des objectifs de cette thèse était de développer et valider une méthode de quantification par LC-MS/MS, dans le plasma et l'urine, de neuf métabolites de la voie des kynurénines (TRP, KYN, KA, XA, 3-HK, 3-HANA, QA, NaMN, PIC), ainsi que deux précurseurs du NAD, le NA et le NAM.

En dépit de la pléthore de techniques déjà publiées sur les métabolites du TRP, quantifier un panel spécifique de métabolites dans une matrice donnée requiert une mise au point analytique et une optimisation des différentes étapes [287,302]. Cela englobe la détermination du volume d'échantillon, le choix de la méthode du pré-traitement, la sélection de la colonne de séparation, l'établissement du gradient optimal de la séparation chromatographique et l'optimisation de la détection et de la quantification par MS. De plus, une validation analytique complète des divers paramètres est nécessaire, en particulier la linéarité, les limites de détection et de quantification, la répétabilité, la reproductibilité, l'effet de la matrice, et la contamination inter-échantillons. Ces étapes de validation doivent être menées conformément aux directives établies par des organismes experts, notamment la FDA (Food and Drug Administration) et l'EMA (European Medicines Agency) [303,304].

# **PARTIE 2 : OBJECTIFS ET PRESENTATION DES TRAVAUX**

## **OBJECTIFS DE LA THESE**

---

Durant ma thèse, nous nous sommes intéressés à deux principaux axes de recherche :

- Un axe de recherche expérimentale, portant sur les mécanismes de la répression de la QPRT au cours de l'IRA et de la transition vers la MRC.
- Un axe de recherche translationnelle portant sur le monitoring de la voie des kynurénines par LC-MS/MS dans l'urine et le plasma à la recherche de marqueurs non invasifs de l'IRA :
  - Développer et valider une technique de quantification des métabolites de la voie des kynurénines par LC-MS/MS dans le plasma et l'urine ;
  - Décrire les variations des métabolites de la voie des kynurénines dans une cohorte de patients après chirurgie cardiaque sous CEC ;
  - Décrire les variations des métabolites de la voie des kynurénines dans un modèle porcin de GNC.

## **PRESENTATION DES TRAVAUX**

---

### **AXE 1. Mécanisme de régulation de la voie de synthèse *de novo* de NAD au cours de l'IRA et de la transition de l'IRA vers la MRC**

#### **Etude 1. Mécanisme et conséquences de la régulation de la voie de synthèse *de novo* de NAD par le stress du RE dans le rein**

*Cell stress response impairs de novo NAD<sup>+</sup> biosynthesis in the kidney.*

Bignon Y, Rinaldi A, Nadour Z (co-first author), Poindessous V, Nemazanyy I, Lenoir O, Fohlen B, Weill-Raynal P, Hertig A, Karras A, Galichon P, Naesens M, Anglicheau D, Cippà P.E, Pallet N.

*JCI Insight.* 2022;7(1):e153019

#### **OBJECTIF DE L'ETUDE**

Ce travail a eu pour objectif d'étudier le mécanisme des variations de la synthèse *de novo* du NAD dans différents modèles d'IRA, humain et murin, associés au stress du RE. Dans un premier temps, (1) nous avons évalué le potentiel du ratio urinaire QA/TRP comme biomarqueur non invasif pronostique de la survenue de l'IRA post chirurgie cardiaque sous CEC, (2) et l'impact de son augmentation à long terme sur la fonction de l'allogreffe rénale. (3) Puis nous avons étudié les variations de l'expression de la QPRT au cours de la progression de l'IRA vers la MRC chez des patients greffés rénaux (4) Ensuite, nous avons analysé l'expression de QPRT dans différents modèles murins de lésions rénales associées au stress du RE puis (5) nous avons étudié l'effet du stress du RE sur la synthèse *de novo* du NAD et l'expression de la QPRT, dans des cellules HK-2 et des cellules rénales primaires HEK 293 (Human embryonic kidney 293), en réponse à un stress toxique (Tun, BFA, Tg) ou ischémique (privation en glucose).

#### **METHODES ET RESULTATS**

Nous avons réalisé cette étude en utilisant des biobanques d'échantillons urinaires et de biopsies rénales provenant de différentes cohortes disponibles dans notre laboratoire. Ce travail a été mené en collaboration avec d'autres équipes, notamment les services d'Anesthésie réanimation chirurgicale et de Néphrologie de l'HEGP, le service de Transplantation rénale de l'hôpital Necker (Pr Dany Anglicheau), le service de Transplantation rénale de l'hôpital Leuven en Belgique (Pr Maarten Naesens) et le service de Néphrologie de l'hôpital régional de Lugano en Suisse (Pr Pietro E Cippa).

Dans une première partie, nous avons travaillé sur les échantillons urinaires d'une cohorte de 41 patients ayant bénéficié d'une chirurgie cardiaque programmée (pontage et/ou

remplacement valvulaire) pour lesquels des urines ont été récoltées avant la CEC, à la fin de l'intervention (2 h après CEC) et un jour après la chirurgie. Parmi les patients de cette « cohorte HEGP », 27 % (n = 11) ont développé une IRA (selon la classification KDIGO) à la suite de l'intervention. Le profilage métabolomique par LC-MS/MS a été réalisé sur la plateforme de l'hôpital Necker Enfants malades à Paris. Nous avons montré que le ratio urinaire QA/TRP mesuré le jour suivant la CEC était un prédicteur, précoce et indépendant, de la survenue de l'IRA post-chirurgie cardiaque. Nous avons également observé que ce biomarqueur était corrélé à la sévérité de l'IRA (estimée par la variation de la créatininémie entre sa valeur de base et sa valeur la plus élevée dans les 7 jours suivant la CEC). Enfin, comparé à d'autres biomarqueurs classiques (KIM-1, NGAL, TIMP2\*IGFBP7 et RBP), le ratio urinaire QA/TRP s'est avéré plus précis dans la prédiction de l'IRA.

Ensuite, nous avons étudié l'expression de la *QPRT* dans trois modèles d'IRA post-IR : la cohorte HEGP (1), une autre cohorte de 42 receveurs de greffe de rein (cohorte Leuven) (2), et enfin des souris soumises à une IR rénale bilatérale (3 à 4 souris par condition) (3). Nous avons constaté sur les trois cohortes que l'IRA post-IR était accompagnée d'une répression transcriptionnelle précoce de la *QPRT*, associée à une diminution de son activité mesurée indirectement par le ratio urinaire QA/TRP. Dans la cohorte HEGP, les niveaux du transcrit *QPRT* dans les culots urinaires, qui reflètent la dynamique de sa signature génique au niveau des biopsies rénales [305–307], étaient négativement corrélés avec les niveaux du ratio urinaire QA/TRP. La diminution transcriptionnelle de la *QPRT* dans les biopsies rénales a été observée dès 24 heures suivant l'IR chez les souris avec IRA ischémique, et après les premières heures d'IR rénale chez les receveurs de greffe rénale. De façon intéressante, les niveaux du transcrit *QPRT* étaient négativement corrélés à la sévérité de la lésion rénale aiguë objectivée par les niveaux du transcrit *HAVCRI* codant pour KIM-1. Ce résultat montre qu'une réduction plus prononcée de *QPRT* dans les biopsies post-transplantation est présente chez les patients souffrant de lésions rénales aiguës les plus sévères.

Nous avons ensuite montré dans une cohorte de 237 receveurs d'allogreffe rénale (cohorte Necker), qu'un ratio urinaire QA/TRP élevé à 10 jours après la transplantation rénale était un marqueur prédictif indépendant du dysfonctionnement de l'allogreffe rénale à 3 et à 12 mois après la transplantation. Un ratio urinaire QA/TRP plus élevé était retrouvé chez les patients ayant subi des lésions ischémiques rénales les plus sévères (objectivées par un temps d'ischémie froide plus long), une fréquence d'épisodes de dysfonctionnement retardé de l'allogreffe plus élevée (nécessitant au moins 1 séance de dialyse au cours des 7 jours suivant la transplantation),



un plus grand nombre de séances de dialyse, et une créatininémie plus élevée à 10 jours, 3 mois et 12 mois après la transplantation rénale.

Nous avons ensuite montré dans la cohorte Leuven de transplantés rénaux qu'une persistance de la répression transcriptionnelle de la *QPRT* au niveau rénal est un marqueur de transition de l'IRA vers une MRC. En effet, les lésions d'IR déclenchées lors d'une transplantation rénale peuvent contribuer à un dysfonctionnement progressif de l'allogreffe [308]. Sur des biopsies protocolaires obtenues 3 et 12 mois après la transplantation dans la cohorte Leuven, un modèle informatique utilisant les données transcriptomiques a été utilisé pour caractériser la transition transcriptionnelle de l'IRA vers la MRC [308]. Dans ce modèle informatique, nous avons montré que le transcrit *QPRT* était progressivement réduit le long de la transition de l'IRA vers la MRC. La diminution progressive de l'expression du *QPRT* au cours de la MRC a été confirmée dans deux cohortes de patients atteints de MRC. Dans la cohorte « HEGP MRC » de 55 patients atteints de MRC toutes causes confondues, les niveaux du transcrit *QPRT* dans les culots urinaires étaient positivement corrélés à la fonction rénale (DFG). De plus, l'expression de la *QPRT* analysée par immunohistochimie dans les biopsies rénales était plus basse par rapport aux reins sains. De plus, l'analyse de données transcriptomiques [309] disponibles sur une cohorte de 10 patients avec néphropathie diabétique a montré que l'expression de *QPRT* dans les tubulaires rénaux était plus faible par rapport aux contrôles (n = 12).

Nous nous sommes ensuite concentrés sur l'effet du stress du RE, connu pour être activé précocement lors de lésions rénales aiguës [27–30], sur le métabolisme du NAD. Nous avons fourni des preuves que le stress de RE pouvait altérer la biosynthèse *de novo* du NAD en réprimant la transcription de la *QPRT*.

Tout d'abord, nous avons montré sur quatre modèles murins de lésions rénales associées au stress du RE, objectivé par une augmentation du transcrit *ddit3*, que l'expression du transcrit *qprt* était réprimée au niveau rénal et plus spécifiquement au niveau du tubule rénal proximal: (1) dans les cortex rénaux de 4 souris 48 heures après l'injection intrapéritonéale de 1 mg/kg de Tun, (2) dans les biopsies rénales de 5 à 10 souris transgéniques exprimant l'UMOD mutée (*UmodC147<sup>-/+</sup>*) (analyse de données de RNA-Seq (GSE102566), (3) dans les cortex rénaux de 12 souris avec néphropathie diabétique induite par la STZ et enfin (4) dans les CTP de 7 souris, 4 h et 12 h après une IR bilatérale où l'analyse transcriptomique par séquençage d'ARN à noyau unique (snRNA-Seq) était réalisée par l'équipe de Pietro E Cippà.

Ensuite, nous avons modélisé l'interaction entre le stress du RE et la biosynthèse du NAD dans les cellules rénales en effectuant des études *in vitro* sur deux lignées cellulaires du rein humain, les cellules HK-2 et HEK 293.

Nous avons montré dans les deux lignées cellulaires rénales, que le stress du RE réduisait la biosynthèse *de novo* du NAD. L'activation de stress du RE par la Tun ou la BFA, était accompagnée d'une accumulation du QA dans les cellules rénales et d'une diminution du contenu intracellulaire en NAD. Le contenu en NAD a pu être restauré, dans ces conditions de stress de RE, par l'ajout d'un inhibiteur de l'ACMSD, le TES1025. Ce résultat indique que le stress du RE réprime la synthèse *de novo* NAD puisque l'ACMSD diminue la proportion de substrat capable de subir spontanément la cyclisation en QA. De façon intéressante, l'expression transcriptionnelle et protéique de la QPRT était diminuée quel que soit l'inducteur de stress du RE (Tun, BFA, Tg, privation en glucose) contrairement à d'autres enzymes des voies de synthèse du NAD (IDO, ACMSD, NAPRT et NAMPT) pour lesquelles les variations de leurs expressions transcriptionnelles étaient non significatives. L'ensemble de ces résultats montrent que le stress du RE est impliqué dans l'altération de la biosynthèse *de novo* du NAD, et que l'accumulation du QA et la diminution du contenu en NAD observées pouvaient être en lien avec une réduction de l'activité de la QPRT.

L'analyse longitudinale des niveaux du *QPRT*, dans les cellules HK-2 après l'induction du stress du RE par la Tun, la BFA ou la Tg, a montré une baisse significative du *QPRT* à partir de 4 heures après l'induction du stress, tandis que le niveau transcriptionnel de *DDIT3* était déjà augmenté dès 2 heures après stimulation. Le facteur de transcription *DDIT3*, connu pour son activité répressive sur de nombreux gènes cibles, pourrait donc être responsable de la répression du transcrit *QPRT* dans les cellules rénales étudiées.

Nous avons enfin montré que la diminution du contenu en NAD lors du stress du RE passait par la répression du *QPRT* et que cette répression impliquait *DDIT3* (CHOP). L'inhibition du *DDIT3* par des siARN anti-*DDIT3* dans les cellules rénales stressées, avait permis de lever la répression sur *QPRT* et de restaurer le contenu en NAD intracellulaire. *DDIT3* était donc impliqué dans la répression transcriptionnelle de la *QPRT*. La surexpression du *DDIT3* dans les cellules rénales non stressées n'a eu aucun impact sur l'expression de la *QPRT*, ce qui suggère que des facteurs supplémentaires, intégrés dans la réponse au stress du RE, sont nécessaires pour que *DDIT3* réprime *QPRT*.

## CONCLUSION

Cette étude montre l'importance du ratio urinaire QA/TRP en tant que biomarqueur précoce de l'IRA post-chirurgie cardiaque sous CEC, ainsi que son utilité en tant que marqueur prédictif du dysfonctionnement de l'allogreffe rénale à 3 et à 12 mois après la transplantation. Par ailleurs, la persistance de la répression transcriptionnelle de la QPRT au niveau rénal a été identifiée comme un prédicteur de la progression vers une MRC chez les receveurs d'allogreffe rénale. Nous avons également montré que le stress du RE réprimait la transcription de la QPRT en lien avec l'activation de DDIT3, et entraînait une diminution de la biosynthèse *de novo* du NAD.

## **Publication n° 1**

Cell stress response impairs *de novo* NAD<sup>+</sup> biosynthesis in the kidney

Bignon Y, Rinaldi A, **Nadour Z (co-first author)**, Poindessous V, Nemazanyy I, Lenoir O, Fohlen B, Weill-Raynal P, Hertig A, Karras A, Galichon P, Naesens M, Anglicheau D, Cippà P.E, Pallet N.

**JCI Insight. 2022;7(1):e153019**

# Cell stress response impairs de novo NAD<sup>+</sup> biosynthesis in the kidney

Yohan Bignon,<sup>1</sup> Anna Rinaldi,<sup>2</sup> Zahia Nadour,<sup>1,3</sup> Virginie Poindessous,<sup>1</sup> Ivan Nemazany,<sup>4</sup> Olivia Lenoir,<sup>5</sup> Baptiste Fohlen,<sup>6</sup> Pierre Weill-Raynal,<sup>6</sup> Alexandre Hertig,<sup>7</sup> Alexandre Karras,<sup>1,8</sup> Pierre Galichon,<sup>9</sup> Maarten Naesens,<sup>10</sup> Dany Anglicheau,<sup>11</sup> Pietro E. Cippà,<sup>2</sup> and Nicolas Pallet<sup>1,3,8</sup>

<sup>1</sup>University of Paris, INSERM UMR51138, Cordeliers Research Center, Paris, France. <sup>2</sup>Department of Medicine, Division of Nephrology, Ente Ospedaliero Cantonale, Lugano, Switzerland. <sup>3</sup>Department of Biochemistry, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France. <sup>4</sup>PMM: The Metabolism-Metabolome Platform, Necker Federative Research Structure, INSERM US24/CNRS UMS3633, Paris, France. <sup>5</sup>University of Paris, INSERM UMR5970, Paris Cardiovascular Research Center (PARCC), Paris, France. <sup>6</sup>Department of Anesthesia, Surgical Resuscitation, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France. <sup>7</sup>Service of Nephrology, Foch Hospital, Suresnes, France. <sup>8</sup>Service of Nephrology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France. <sup>9</sup>INSERM UMR51155, Common and Rare Kidney Diseases: From Molecular Mechanisms to Personalized Medicine, Sorbonne University, Paris, France. <sup>10</sup>Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, KU Leuven, Leuven, Belgium. <sup>11</sup>Service of Nephrology and Transplantation, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Necker Hospital, Paris, France.

The biosynthetic routes leading to de novo nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) production are involved in acute kidney injury (AKI), with a critical role for quinolinate phosphoribosyl transferase (QPRT), a bottleneck enzyme of de novo NAD<sup>+</sup> biosynthesis. The molecular mechanisms determining reduced QPRT in AKI, and the role of impaired NAD<sup>+</sup> biosynthesis in the progression to chronic kidney disease (CKD), are unknown. We demonstrate that a high urinary quinolinate-to-tryptophan ratio, an indirect indicator of impaired QPRT activity and reduced de novo NAD<sup>+</sup> biosynthesis in the kidney, is a clinically applicable early marker of AKI after cardiac surgery and is predictive of progression to CKD in kidney transplant recipients. We also provide evidence that the endoplasmic reticulum (ER) stress response may impair de novo NAD<sup>+</sup> biosynthesis by repressing QPRT transcription. In conclusion, NAD<sup>+</sup> biosynthesis impairment is an early event in AKI embedded with the ER stress response, and persistent reduction of QPRT expression is associated with AKI to CKD progression. This finding may lead to identification of noninvasive metabolic biomarkers of kidney injury with prognostic and therapeutic implications.

**Authorship note:** YB, AR, and ZN are co-first authors. PEC and NP are co-senior authors.

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Copyright:** © 2022, Bignon et al. This is an open access article published under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

**Submitted:** July 8, 2021

**Accepted:** November 17, 2021

**Published:** January 11, 2022

**Reference information:** *JCI insight*. 2022;7(1):e153019. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.153019>.

## Introduction

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) is a cofactor involved in oxidation-reduction reactions and serves as an energy transfer intermediate in multiple metabolic pathways (1). NAD<sup>+</sup> is an important cosubstrate for histone deacetylases (sirtuins) and poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs), which regulate several aspects of cellular homeostasis (1). Cellular NAD<sup>+</sup> reduction in aging and in association with several diseases contributes to overall fitness decline and to a lower resistance to cell stress. Conversely, increasing NAD<sup>+</sup> content can prolong health and life span in experimental organisms (2, 3). Recent experimental and clinical data demonstrated a critical role for NAD<sup>+</sup> homeostasis in acute kidney injury (AKI) (4–7). Proximal tubular cells (PTCs) are highly metabolically active, and their survival and function depend on the ability to couple their energetic needs to the regulation of energy generation, antioxidant responses, and mitochondrial biogenesis and quality control, all of which rely on cytosolic and mitochondrial NAD<sup>+</sup> (5, 8). NAD<sup>+</sup> is continuously degraded, and stable NAD<sup>+</sup> cellular concentrations are maintained by constant new supply through the nicotinamide salvage pathway (nicotinamide is generated as a by-product of enzymatic activities) and biosynthetic pathways (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/jci.insight.153019DS1>). NAD<sup>+</sup> biosynthesis involves diverse dietary sources, including nicotinic acid,

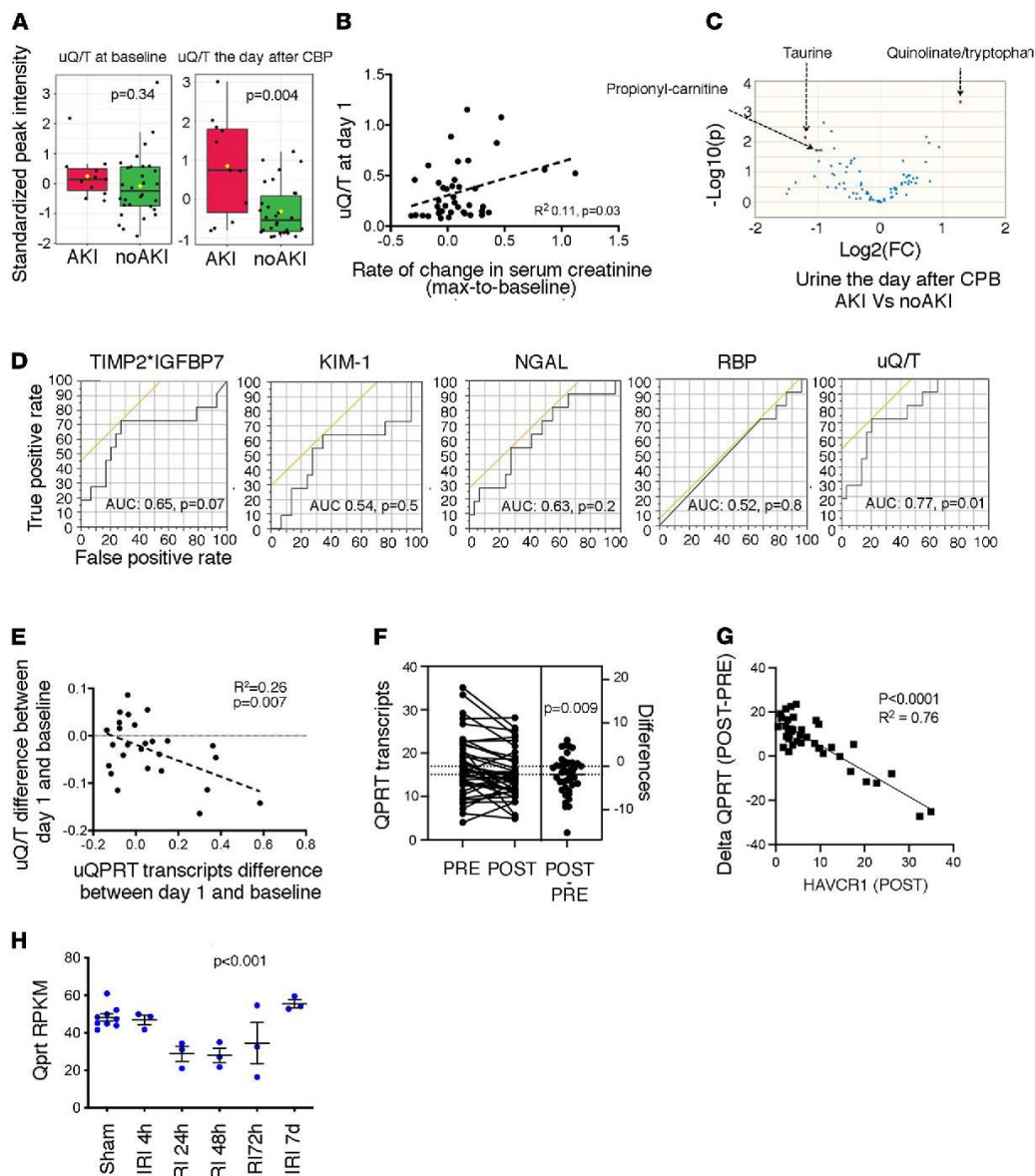
nicotinamide, nicotinamide riboside, and tryptophan. The *de novo* pathway converts dietary tryptophan to NAD<sup>+</sup> in 8 steps, with the last catalyzed by quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRT). Reduction in QPRT activity during AKI is considered critical in NAD<sup>+</sup> biosynthetic impairment (6), but the molecular mechanisms determining reduced QPRT upon kidney injury and its role in long-term outcomes after AKI remain unclear. The clinical relevance of noninvasive monitoring of QPRT activity in patients with kidney disease is not established.

## Results

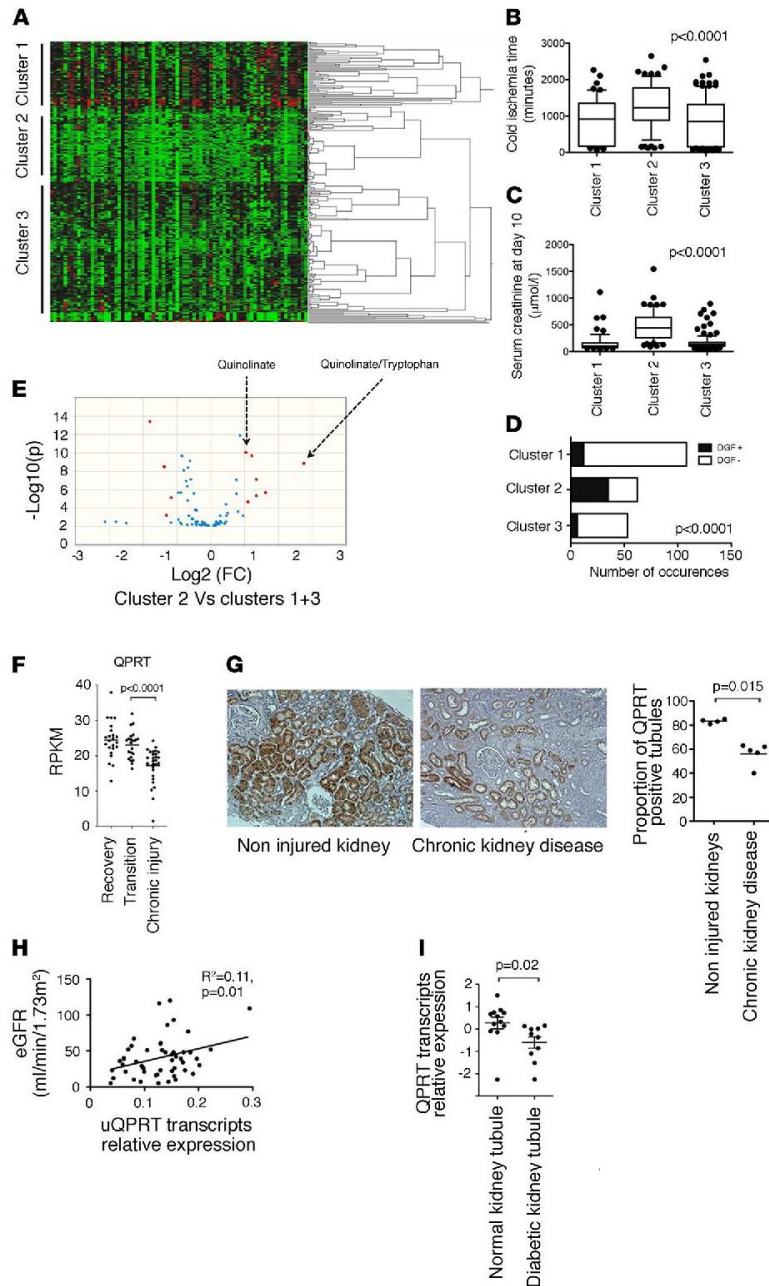
*Impaired NAD<sup>+</sup> biosynthesis is a very early event in AKI.* A previous study showed that quinolinate accumulates as a consequence of reduced QPRT activity and that urinary quinolate/tryptophan ratio (uQ/T) is elevated in AKI (6). Metabolic profiling of urine samples collected at baseline and the day after cardiopulmonary bypass (CPB) in 41 cardiac surgery patients (Supplemental Figure 3 for metabolomics data and Supplemental Table 2 for clinical data), including 11 patients (26%) developing AKI in the 7 days following CPB according to KDIGO criteria, showed that uQ/T was higher at day 1 after surgery in patients developing AKI, whereas at baseline, the levels were the same (Figure 1A), and severity of AKI correlated with uQ/T levels at day 1 (Figure 1B). uQ/T was one of a few urinary metabolic parameters significantly discriminating AKI at day 1 after surgery (but not at baseline) in this cohort (Figure 1C). uQ/T on day 1 after cardiac surgery predicted AKI with a higher accuracy than other AKI biomarkers, including kidney injury molecule 1 (KIM-1) or neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) (Figure 1D). In a multivariate analysis, uQ/T measured the day after CPB was an independent predictor of the occurrence of AKI (Supplemental Tables 3 and 4 for univariate and multivariate analyses). Urinary QPRT transcripts (urinary gene expression patterns reflect the dynamics of biopsy gene signatures; refs. 9–11) were negatively correlated with uQ/T levels, in line with the fact that elevated uQ/T is an indirect marker of reduced QPRT activity (Figure 1E). QPRT mRNA levels were significantly reduced in the first hours after ischemia-reperfusion injury (IRI) in protocol biopsies obtained in 42 kidney transplant recipients (KTRs) before and after reperfusion (12) (Figure 1F). QPRT transcripts levels were highly negatively correlated with HAVCR1 (the gene encoding KIM-1) transcripts (Figure 1G), suggesting that patients with more severe AKI in the posttransplantation biopsy had more pronounced QPRT reduction after reperfusion. Finally, in a mouse model of bilateral IRI (13), Qprt achieved the lowest level within 24 hours after IRI (Figure 1H). Thus, reduced QPRT transcription and activity is an early event associated with AKI. Indirectly determined by uQ/T in a clinical context, this is the first metabolic change to our knowledge predictive of AKI detectable by urinary metabolic profiling.

*QPRT reduction is associated with progression to chronic kidney disease.* To investigate the long-term impact of the early reduction of *de novo* NAD<sup>+</sup> biosynthesis associated with IRI, we performed a targeted urinary metabolic profiling in 237 KTRs 10 days after transplantation (Supplemental Table 5 for clinical data). Hierarchical clustering according to metabolic profiling identified 3 clusters (Figure 2A). Donor-related parameters, such as age, history of hypertension, renal function, or death from stroke (i.e., Extended Criteria Donor kidneys), were balanced among the clusters (Supplemental Figure 4, A and B), but cluster 2 was enriched with patients who underwent more severe ischemic injury, as indicated by longer cold ischemia time, higher serum creatinine the day of urine sampling, higher frequency of delayed graft function episodes (need for at least 1 dialysis session during the 7 days after transplantation), and higher number of dialysis sessions (Figure 2, B–D, and Supplemental Figure 4C). Among the urinary metabolites that best characterized cluster 2, quinolinate and uQ/T had the largest and most significant size effect (Figure 2E and Supplemental Table 6 for the list of metabolites). Critically, multivariate models integrating all variables associated with graft outcomes showed that high uQ/T 10 days after transplantation was an independent predictor of allograft function 3 and 12 months after transplantation (Table 1 and Table 2).

To investigate the role of QPRT along the transition from AKI to chronic kidney disease (CKD), we took advantage of the previously reported cohort of 42 KTRs followed by bulk RNA-Seq in protocol biopsies obtained 3 and 12 months after transplantation (12). A computational model to characterize the transcriptional transition from AKI to CKD has been developed, based on the principle that the progression to fibrosis is a transitional process from acute injury to fibrosis (12) (see Methods). According to this computational model, QPRT was progressively reduced along the transition to CKD (Figure 2F), a finding confirmed by immunohistochemistry in kidney biopsies obtained from patients with CKD (Figure 2G), by the correlation between renal function and QPRT transcript levels in urinary cell pellets in a cohort of 55 CKD patients (Figure 2H and Supplemental Table 7 for clinical data), and by a lower expression of QPRT



**Figure 1. Impaired NAD<sup>+</sup> biosynthesis is a very early event in AKI.** (A) Distribution of quinolate/tryptophan (uQ/T) levels measured in urine at baseline, and the day after cardiopulmonary bypass (CPB), according to the occurrence of AKI during the week after CPB. (B) Correlation between uQ/T levels measured in urine the day after CPB and the rate of variation in serum creatinine between the baseline and the maximum value in the week after CPB. *P* value was computed with Student's *t* test. (C) Volcano plot comparing urinary metabolites of 41 patients collected 24 hours after CPB and who eventually developed AKI the week after surgery. (D) Receiver operating characteristic curves for the association between the concentrations of urinary tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) multiplied by insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7), KIM-1, NGAL, retinol binding protein (RBP), and uQ/T collected the day after CPB and the occurrence of AKI the week after surgery. *P* values were computed with  $\chi^2$  test, *n* = 41. (E) Increase of uQ/T levels between the day after CPB and baseline as a function of increase of urinary QPRT transcripts levels between the day after CPB and baseline. *P* value was computed with Student's *t* test. (F) Expression of QPRT measured by RNA sequencing (RNA-Seq) of mRNA isolated from whole-kidney biopsies in a cohort of 42 KTRs before implantation (PRE) and shortly after the restoration of the blood flow (POST). *P* value was computed with Student's *t* test. (G) Decrease of QPRT transcript levels as a function of the increase in HAVCR1 transcript levels measured by RNA-Seq of mRNA isolated from whole-kidney biopsies in a cohort of 42 KTRs shortly after the restoration of the blood flow (POST). *P* value was computed with Student's *t* test. (H) Expression of Qprt transcripts measured by RNA-Seq of mRNA isolated from whole mouse kidneys examined at different time points following bilateral ischemia-reperfusion injury (IRI): (*n* = 3 to 4 mice per condition). *P* value was computed with 1-way ANOVA. RPKM, reads per kilobase per million mapped reads.



**Figure 2. Persistent QPRT reduction is associated with progression to chronic kidney disease.** (A) Hierarchical clustering of 237 urine samples collected 10 days after kidney transplantation. (B) Distribution of cold ischemia times, according to the clusters identified by hierarchical clustering in A. *P* value was computed using 1-way ANOVA. (C) Distribution of serum creatinine 10 days after transplantation, according to the clusters identified by hierarchical clustering in A. *P* value was computed using 1-way ANOVA. (D) Proportion of delayed graft function (DGF, need for a dialysis session during the 7 days after transplantation) events according to the clusters identified by hierarchical clustering in A. *P* value was computed using 1-way ANOVA. (E) Volcano plot comparing urinary metabolites of 273 patients collected 10 days after kidney transplantation in cluster 2 or clusters 1+3. Urinary quinolate/tryptophan (uQ/T) remained significantly increased when using FDR-adjusted *P* values. (F) Expression of QPRT measured by RNA-Seq of mRNA isolated from whole kidneys in the group of 42 KTRs who recovered or progressed to fibrosis according to the computational model described (12), which identified 2 main transcriptional trajectories leading to kidney recovery or to sustained injury with associated fibrosis and renal dysfunction. *P* values were computed using Student's *t* test. (G) Representative photomicrograph of human QPRT expression evaluated by immunohistochemistry in kidney tissue from an individual without chronic kidney disease (left) and with advanced chronic kidney disease (right). Original magnification,  $\times 40$ . The distributions of QPRT-positive



tubule sections corresponding to each condition ( $n = 4$ ) were compared with Student's  $t$  test. (H) Correlation between urinary QPRT transcript levels and estimated glomerular filtration rate in 55 patients examined for chronic kidney disease.  $P$  value was computed with Student's  $t$  test. RPKM, reads per kilobase per million mapped reads. (I) Relative expression of QPRT transcripts in diabetic kidney disease tubulointerstitium samples ( $n = 10$ ) compared with control samples ( $n = 12$ ).  $P$  value was computed using Student's  $t$  test. Data are from public repositories (National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus [NCBI GEO] accession GSE126805).

transcripts in human diabetic renal tubular tissues (14) (Figure 2I). Thus, persistent QPRT reduction and impaired de novo NAD<sup>+</sup> biosynthesis after AKI are features of the transition to chronic renal damage.

*ER stress reduces de novo NAD<sup>+</sup> biosynthesis in the kidney.* We next investigated the potential mechanisms determining the reduction of NAD<sup>+</sup> biosynthetic activity upon AKI. Among several factors involved in the early transcriptional response to AKI, we focused on the ER stress response, which is known to be activated in the early kidney injury response in mice (15, 16) and humans (17). We modeled the interaction between ER stress and NAD<sup>+</sup> biosynthesis in PTCs by performing in vitro studies in the human kidney 2 (HK2) cell line, a proximal tubule-derived cell line expressing QPRT (Supplemental Figure 5). In line with this, analysis of mouse single-nucleus RNA-sequencing data sets indicated that Qprt was almost exclusively expressed in PTCs (Figure 3A), which is in line with transcriptomic and proteomic data in microdissected tubules in rats (18, 19) (Supplemental Figure 6, A and B) and supported by an immunohistochemistry study on normal human kidneys (Figure 3B).

In an unbiased approach, we induced ER stress with tunicamycin (Tun), an inhibitor of GlcNAc phosphotransferase that promotes ER stress and activates the unfolded protein response (UPR) (Supplemental Figure 7), and we performed metabolomics analysis in the cell lysate. ER stress profoundly reshaped the intracellular metabolic profile of HK2 cells (Figure 3C). Among the metabolites strongly enriched in response to ER stress, we found asparagine (ER stress induces asparagine synthase; refs. 20, 21), and quinolinate (Figure 3D and Supplemental Table 8A for the list of metabolites). Similar results were obtained after ER stress induction with brefeldin A (BFA) (Supplemental Figure 7), a lactone that inhibits protein transport from the ER to the Golgi complex (Supplemental Figure 8 and Supplemental Table 8B for the list of metabolites). ER stress induced by Tun or BFA reduced NAD<sup>+</sup> intracellular contents (Figure 3E). This process was inhibited by TESI025 (Figure 3F), an inhibitor of the  $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate- $\epsilon$ -semialdehyde decarboxylase (ACMSD), indicating ER stress represses de novo NAD<sup>+</sup> synthesis since ACMSD decreases the proportion of substrates able to undergo spontaneous cyclization into quinolinic acid (Supplemental Figure 1). Importantly, the decrease in NAD<sup>+</sup> intracellular content was unlikely a consequence of accelerated consumption of NAD<sup>+</sup> by PARPs, because ER stress was associated with PARP cleavage and defective PARylation activity (Figure 3, G–I). Note that etoposide, used as a positive control to promote apoptosis, did not induce ER stress and did not affect QPRT expression (Figure 3, G and H). We observed a slight increase in expression of the transcripts of the ectonuclease CD38 upon ER stress in HK2 cells (Figure 3J). CD38, an ectoenzyme capable of reducing extracellular NAD<sup>+</sup> precursors' availability (22), could theoretically participate in the decrease in NAD<sup>+</sup> contents observed in ER-stressed cells, though the culture medium used (DMEM) contained high and likely saturating concentrations of nicotinamide (4 mg/L). These results suggest that ER stress may be involved in NAD<sup>+</sup> biosynthetic impairment and that quinolinate accumulation is consistent with a reduction in the de novo biosynthetic pathway activity.

*QPRT expression is repressed in response to kidney injuries associated with ER stress.* A diminished expression of Qprt was found in several models of kidney injuries associated with ER stress — using DNA damage inducible transcript 3 (DDIT3), also known as C/EBP homologous protein, as a surrogate marker (23) — for instance, injection of Tun, a transgenic mouse model expressing mutant uromodulin (Umod-C147W/+) that accumulates in the ER lumen, and streptozotocin-induced diabetic nephropathy (Figure 4, A–C). In addition, in the first hours after IRI in mice, single-nucleus RNA sequencing (snRNA-Seq) indicated that PTCs displayed a fundamental change of their transcriptional profile, with the expression of established injury markers (e.g., Havcr1), and the parallel loss of classical differentiation markers (e.g., Lrp2, encoding megalin), leading to the characterization of potentially novel PTC clusters (called PT1 to 3), which were referred to as “injured proximal tubule” (Figure 4, D and E; and Supplemental Figure 6, C–E) (8). PTCs in the early damaged state displayed low levels of Qprt (Figure 4F) associated with high levels of the ER stress marker Ddit3 (Figure 4G), indicating that the ER stress response is engaged in PTCs following IRI and that in this condition, Qprt expression is repressed.

**Table 1. Determinants of measured glomerular filtration rate 3 months after kidney transplantation (146 KTRs, living donors excluded)**

Characteristic	Estimate	95% CI	P value
Extended criteria donor <sup>a</sup> (yes)	-7.32	-10 to -4.6	<0.0001
Cold ischemia time (min)	-0.0001	-0.006 to 0.006	0.95
Delayed graft function <sup>b</sup> (yes)	0.46	-3.3 to 4.3	0.81
Serum creatinine at day 10 (μmol/L)	-0.01	-0.03 to 0	0.048
Urinary quinolinate-to-tryptophan ratio at day 10	-4.5	-8 to -1	0.01

Glomerular filtration rate was determined by measuring iothexol clearance. Model F ratio: 11.8,  $P < 0.0001$ . <sup>a</sup>Extended criteria donors are normally aged 60 years or older, or over 50 years with at least 2 of the following conditions: hypertension history, serum creatinine  $> 133$  μmol/L, or death from cerebrovascular accident. <sup>b</sup>Delayed graft function is defined as failure of the renal transplant to function immediately, with the need for dialysis in the first posttransplantation week.

ER stress induced by Tun, BFA, thapsigargin (Tg, an inhibitor of the sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase), dithiothreitol (DTT, a reducing agent), and glucose starvation activated the UPR and repressed QPRT levels in HK2 cells (Figure 5, A–C), whereas other key enzymes of the  $NAD^+$  biosynthesis and salvage pathways, including indoleamine 2,3-dioxygenase 1, ACMSD, nicotinic acid phosphoribosyl transferase, and nicotinamide phosphoribosyl transferase, were not affected by ER stress (Supplemental Figure 9). Time course analysis of QPRT transcript levels in HK2 cells after ER stress induction showed QPRT downregulation starting 4 hours after stimulation (Figure 5, D and E). The transcription factor DDIT3 has a repressive activity on numerous target genes (23–26), leaving the possibility that it could repress QPRT transcription. siRNA-mediated RNA interference against DDIT3 attenuated QPRT reduction upon ER stress (Figure 5F). The overexpression of DDIT3 in nonstressed cells had no impact on QPRT expression (Figure 5G), suggesting that additional factors embedded in the ER stress response are required for DDIT3 to repress QPRT. These findings were replicated in primary cultured PTCs (Supplemental Figure 10). Together, these results indicate that ER stress impairs QPRT expression and that DDIT3 may participate in QPRT repression.

## Discussion

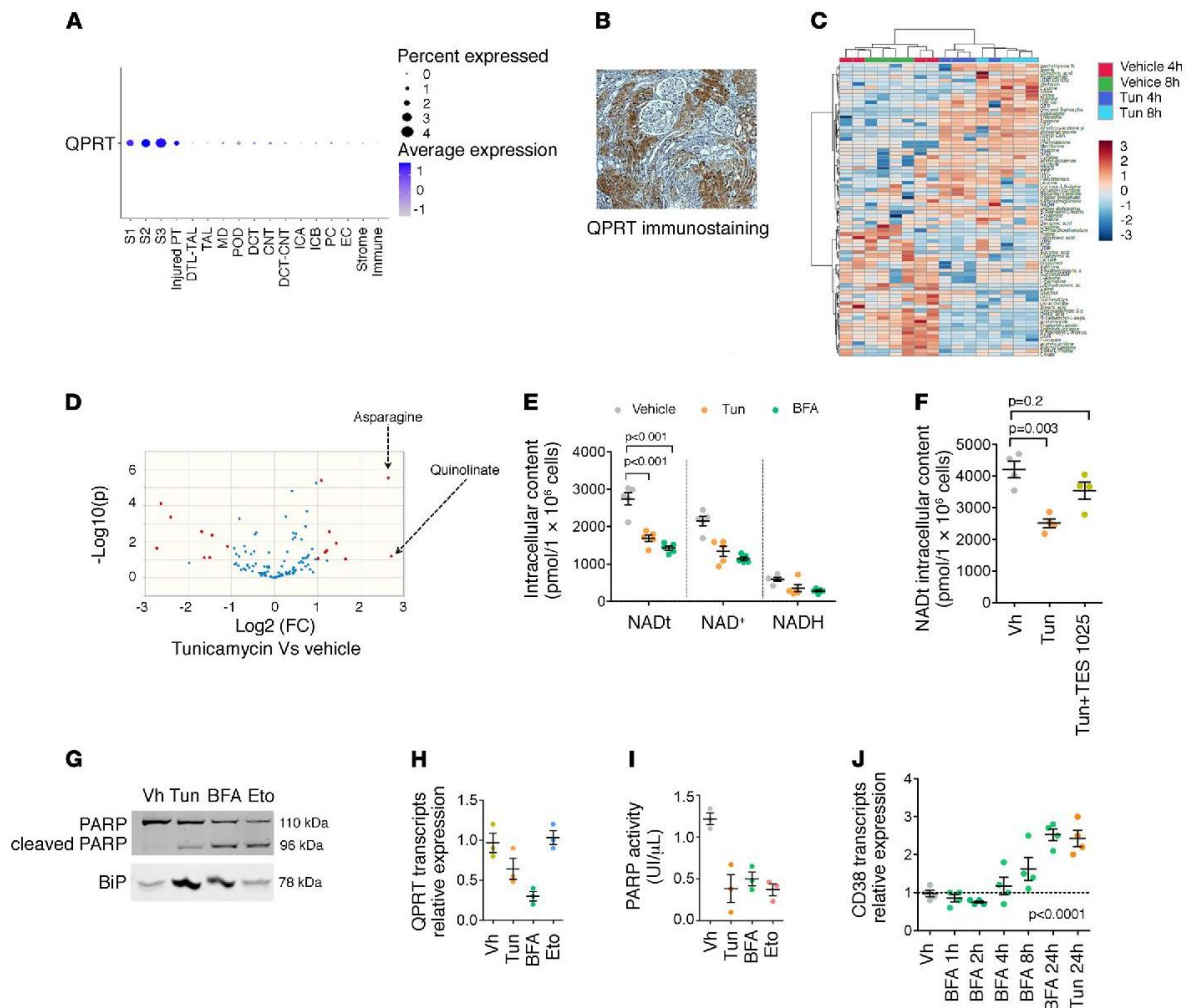
A better understanding of the cellular and molecular processes activated in response to kidney injury, a better characterization of the structural determinants that foster progression from AKI toward CKD, and the identification of biomarkers of ongoing tissue injury in individuals during the early stages of the disease are required to improve patient care in nephrology. Our findings link the ER stress response to fundamental changes in PTC biology associated with AKI and AKI to CKD progression. Furthermore, this study provides a comprehensive characterization of noninvasive metabolic biomarkers of kidney disease that ultimately could be used to optimize therapies to slow disease progression.

We provide evidence for the first time to our knowledge that the ER stress response has a repressive role in  $NAD^+$  biosynthesis. The relationship between ER stress and cellular energetic metabolism is complex, and multiple pathways appear to be at work (27). Our results suggest a potentially novel metabolic role for the UPR in modulating  $NAD^+$  biosynthesis, possibly mediated by DDIT3. The consequences of these

**Table 2. Determinants of measured glomerular filtration rate 12 months after kidney transplantation (104 KTRs, living donors excluded)**

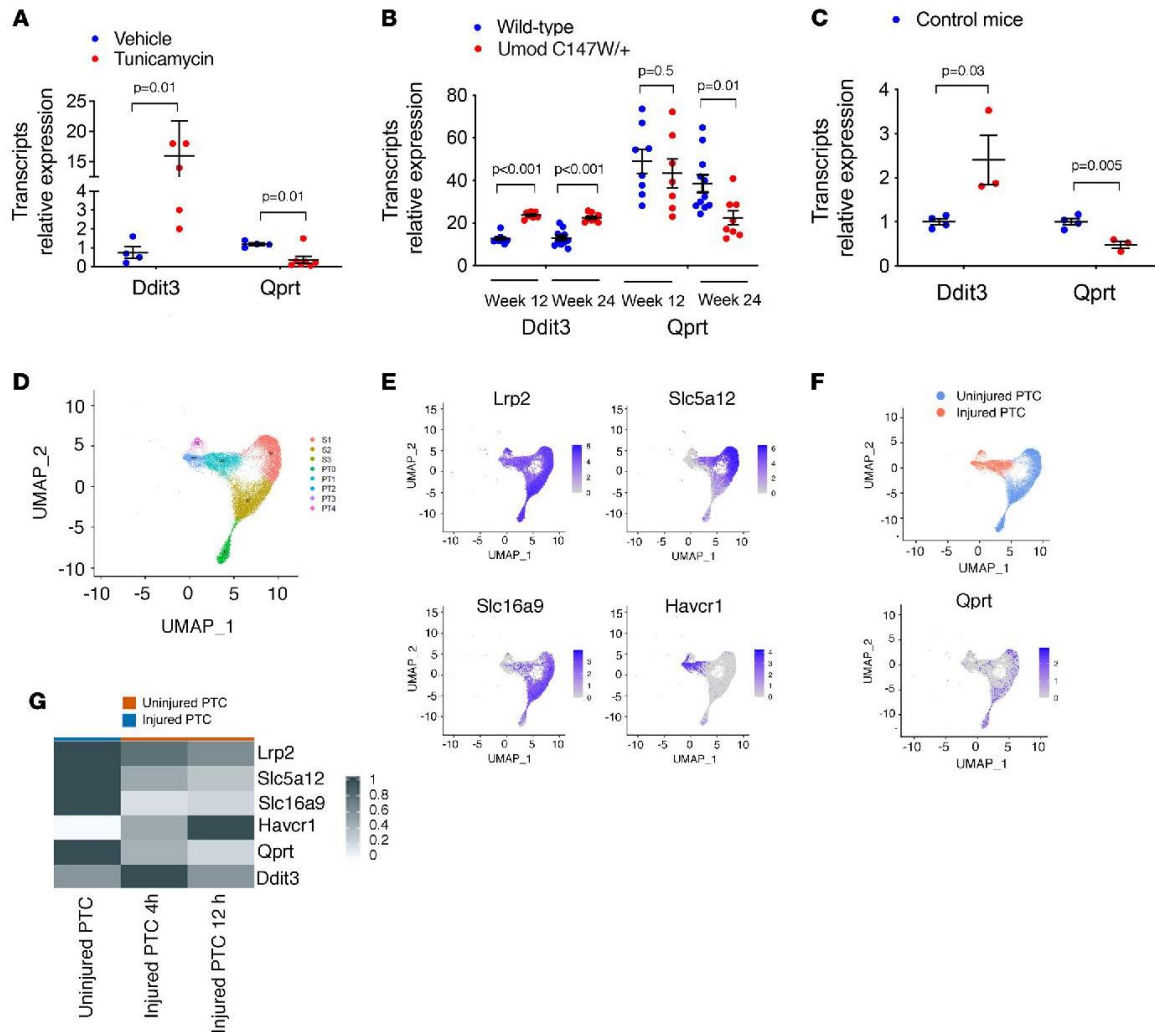
Characteristic	Estimate	95% CI	P value
Extended criteria donor <sup>a</sup> (yes)	-7.82	-10 to -5.2	<0.0001
Cold ischemia time (min)	-0.0009	-0.005 to 0.007	0.76
Delayed graft function <sup>b</sup> (yes)	-1.71	-5.22 to 1.75	0.33
Serum creatinine at day 10 (μmol/L)	-0.01	-0.03 to -0.003	0.01
Urinary quinolinate-to-tryptophan ratio at day 10	-3.7	-6.9 to -0.61	0.02

Glomerular filtration rate was determined by measuring iothexol clearance. Model F ratio: 14.1,  $P < 0.0001$ . <sup>a</sup>Extended criteria donors are normally aged 60 years or older, or over 50 years with at least 2 of the following conditions: hypertension history, serum creatinine  $> 133$  μmol/L, or death from cerebrovascular accident. <sup>b</sup>Delayed graft function is defined as failure of the renal transplant to function immediately, with the need for dialysis in the first posttransplantation week.



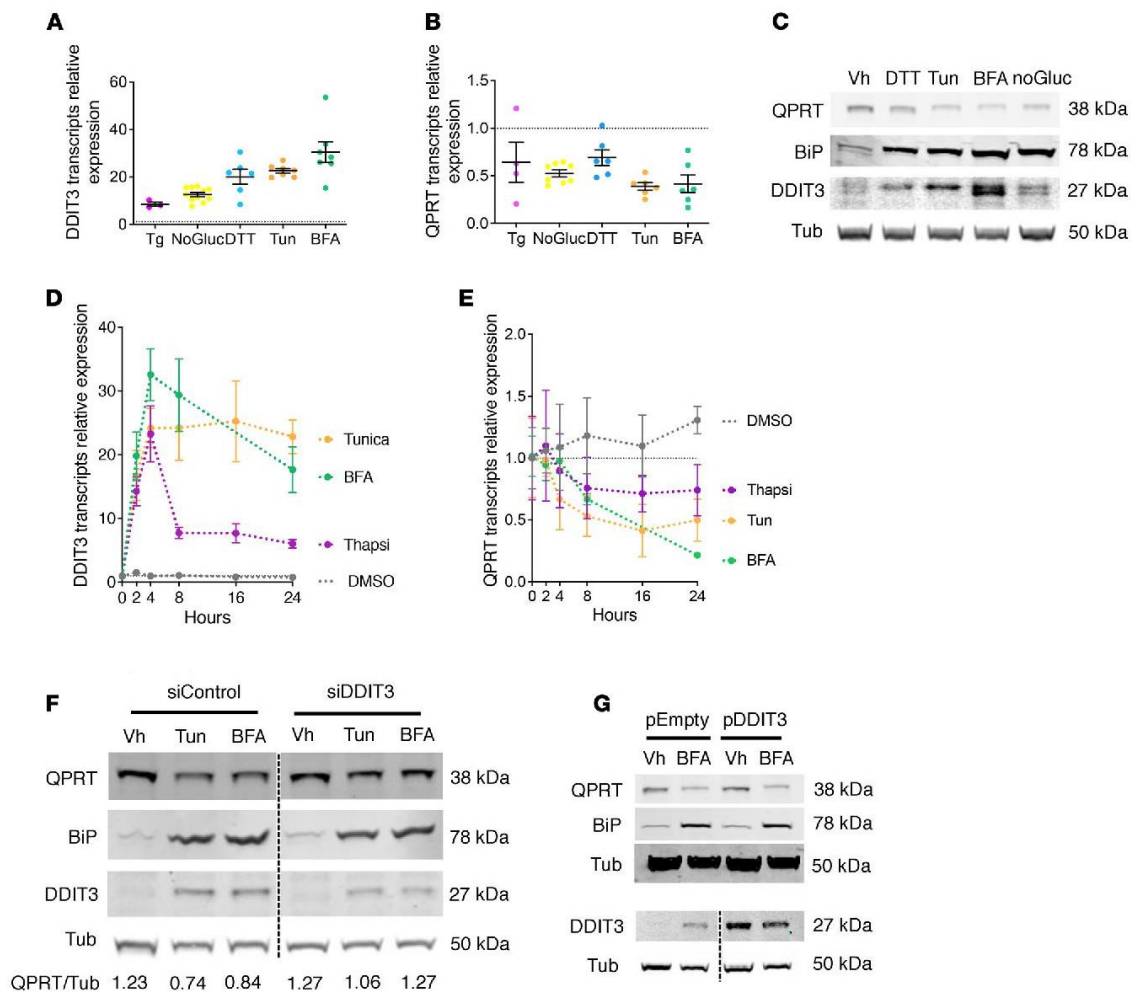
**Figure 3. ER stress reduces de novo NAD<sup>+</sup> biosynthesis in the kidney.** (A) Qprt gene expression in the renal cell types identified by snRNA-Seq of 8 control kidney samples (25,896 cells). (B) Representative photomicrograph of human Qprt expression evaluated by immunohistochemistry in kidney. Original magnification, ×40. (C) Hierarchical clustering of HK2 cells incubated with 2.5 μg/mL of Tun or DMSO or vehicle for 4 hours and 8 hours (4 replicates). (D) Volcano plot comparing urinary metabolites of HK2 cells incubated with or without 2.5 μg/mL Tun for 8 hours. (E) Concentrations of total NAD concentrations, NAD<sup>+</sup>, and NADH, in HK2 cells incubated with 2.5 μg/mL Tun or 5 μg/mL BFA or DMSO for 24 hours (4–5 replicates). Bars represent mean ± SEM. *P* value was computed with Dunnett's multiple-comparison test. (F) Concentrations of total NAD concentrations, NAD<sup>+</sup>, and NADH, in HK2 cells incubated with 2.5 μg/mL Tun alone with or without 100 μmol/L of TES1025 for 24 hours (*n* = 3–4 replicates). Bars represent mean ± SEM. *P* value was computed with Dunnett's multiple-comparison test. (G) Immunoblot representing PARP, its cleaved fragment, and binding immunoglobulin protein (BiP) expression in HK2 cells 24 hours after incubation with DMSO, 2.5 μg/mL Tun, 5 μg/mL BFA, or 100 μM etoposide (Eto). The immunoblot shown is representative of 3 independent experiments. (H) Relative expression of Qprt measured by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in HK2 cells incubated with 2.5 μg/mL Tun, 5 μg/mL BFA, and 100 μM Eto or DMSO for 24 hours (3 replicates per condition). Bars represent mean ± SEM. (I) The PARylation activity of PARP in HK2 cells incubated with DMSO, 2.5 μg/mL Tun, 5 μg/mL BFA, or 100 μM Eto (3–4 replicates). Bars represent mean ± SEM. (J) Relative expression of CD38 measured by RT-qPCR in HK2 cells incubated with 2.5 μg/mL Tun or 5 μg/mL of BFA or DMSO for 24 hours (3–4 replicates per condition). Bars represent mean ± SEM. *P* value was computed with 1-way ANOVA.

findings are multiple and raise several avenues for further investigation. The landscape of the biological impact of de novo NAD<sup>+</sup> downregulation appears endless given the hundreds of redox reactions involving NAD<sup>+</sup>/NADH and dozens of reactions involving NAD<sup>+</sup> consumption throughout the cell (28). Considering that NAD<sup>+</sup> is a key modulator of mitochondrial homeostasis, a prime issue to be addressed is the way the UPR affects mitochondrial function and biogenesis. Indeed, the kidney is second only to the heart in the abundance of mitochondria, and the elevated energetic burden may render the kidney especially vulnerable



**Figure 4. QPRT expression is repressed in response to kidney injuries associated with ER stress.** (A) Expression of *Ddit3* and *Qprt* transcripts by quantitative PCR (qPCR) in the kidney cortex of mice 48 hours after intraperitoneal injection of 1 mg/kg Tun or DMSO ( $n = 4$  to 5 mice per condition). Bars represent mean  $\pm$  SEM.  $P$  values were computed with Student's  $t$  test. (B) Expression of *Ddit3* and *Qprt* transcripts by RNA-Seq in whole kidneys of 12- and 24-week-old *Umod*C147W/+ mice and wild-type mice (5 to 10 mice per condition). Data are from public repositories (National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus [NCBI GEO] accession GSE102566). Bars represent mean  $\pm$  SEM.  $P$  values were computed with Student's  $t$  test. (C) Expression of *Ddit3* and *Qprt* transcripts by qPCR in the kidney cortex of diabetic mice. Bars represent mean  $\pm$  SEM.  $P$  values were computed with Student's  $t$  test. (D) Uniform manifold approximation and projections (UMAPs) of 7 mouse IRI and 8 control kidney samples analyzed by snRNA-Seq ( $n = 19,926$  cells) identify segments of the proximal tubule (S1, S2, S3) and new (injured) proximal tubule clusters (PT1, PT2, PT3). (E) UMAPs of 7 mouse IRI and 8 control kidney samples analyzed by snRNA-Seq ( $n = 19,926$  cells) identify the expression of differentiation markers (*Lrp2*, *Slc5a12*, and *Slc16a9*) and injury marker (*Havcr1*) in segments of the proximal tubule (S1, S2, S3) and new proximal tubule clusters (PT1, PT2, PT3). (F) (Left) UMAPs of 7 mouse IRI and 8 control kidney samples analyzed by snRNA-Seq ( $n = 19,926$  cells) highlighting uninjured (blue) and injured PTC (red) populations. (Right) UMAPs of 7 mouse IRI and 8 control kidney samples analyzed by snRNA-Seq ( $n = 19,926$  cells) identify the differential expression of *Qprt* in injured and noninjured PTCs. (G) Expression of classical differentiation and injury markers over time after IRI in 7 mouse IRI and 8 control kidney samples analyzed by snRNA-Seq. Each column represents the average expression per cell state in control PTCs and injured PTCs at 4 hours and 12 hours. ( $n = 15$  samples,  $n = 19,164$  cells.)

to ischemia. This also underlines the need to better understand the heterogeneity of individual cellular stress responses and cell fate in the face of IRI. A subset of PTCs may fail to recover from acute stress and face an unresolved ER stress that may ultimately become deleterious and may prompt progression toward irreversible lesions. One could envision that early events that affect NAD<sup>+</sup> contents in a proportion of PTCs imprint a metabolic memory in these cells, possibly through altered sirtuin activity and epigenetic reprogramming,



**Figure 5. ER stress reduces QPRT expression in HK2 cells.** (A and B) Scatter dot plots representing the relative expression of DDIT3 (A) and QPRT (B) transcripts measured by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in HK2 cells incubated 8 hours with 0.25  $\mu$ M thapsigargin (Tg), with 1  $\mu$ M dithiothreitol (DTT), with 2.5  $\mu$ g/mL tunicamycin (Tun), with 5  $\mu$ g/mL brefeldin A (BFA) or 48 hours in a glucose-deprived culture medium (No Gluc.), and compared with vehicle-treated (DMSO) cells ( $n = 6-8$  replicates). The dashed line represents 1, the reference value of vehicle-treated cells. Bars represent mean  $\pm$  SEM. (C) Immunoblot representing QPRT, binding immunoglobulin protein (BiP), DDIT3, and tubulin protein expression in HK2 cells 24 hours after incubation with DMSO (vehicle), 1  $\mu$ M DTT, 2.5  $\mu$ g/mL Tun, and 5  $\mu$ g/mL BFA or 48 hours in a glucose-deprived culture medium (No Gluc.). The immunoblot shown is representative of 3 independent experiments. (D and E) Time course analysis of the relative expression of DDIT3 (D) and QPRT (E) transcripts measured by RT-qPCR in HK2 cells incubated with vehicle (DMSO), 0.25  $\mu$ M Tg, 5  $\mu$ g/mL BFA, or 2.5  $\mu$ g/mL Tun for up to 24 hours (4 replicates). Bars represent mean  $\pm$  SEM. (F) Immunoblot representing the expression of QPRT, BiP, DDIT3, and tubulin proteins in HK2 cells transfected with DDIT3 siRNA (siDDIT3) or with control siRNA and incubated with 2.5  $\mu$ g/mL Tun, 5  $\mu$ g/mL BFA, or DMSO (vehicle) for 24 hours. The immunoblot shown is representative of 2 independent experiments. (G) Immunoblot representing the expression of QPRT, BiP, DDIT3, and tubulin proteins in HK2 cells transfected with a pcDNA3.1 vector expressing DDIT3 or an empty vector and incubated with 5  $\mu$ g/mL BFA or with DMSO (vehicle) for 24 hours. The immunoblot shown is representative of 2 independent experiments.

which would endow them with a maladaptive phenotype, fueling fibrogenesis, inflammation, and progression to CKD if a critical threshold of PTC number is reached.

Our results suggest that DDIT3 could participate in the attenuation of QPRT transcription and contribute to the expanding body of data indicating that DDIT3 not only is an apoptotic regulator but also carries out nonapoptotic functions. It is clear that DDIT3 alone is not sufficient to inhibit metabolic gene expression because overexpressed DDIT3 was not associated with QPRT repression in the absence of ER stress. This observation suggests that ER stress signals are necessary to potentiate its repressive action.

Our observations are reminiscent of what have been described for the suppression of genes encoding the transcriptional regulators of lipid metabolism such as PPAR $\alpha$ , or SREBF1 by DDIT3 (25), raising the possibility that a regulatory program is engaged upon ER stress and could affect metabolic genes expression in a similar manner. In the case of NAD<sup>+</sup> biosynthesis impairment upon ER stress, the precise mechanisms by which DDIT3 repress QPRT upon ER stress remain to be examined in detail. This transcriptional regulation of QPRT is not exclusive, and ER stress may affect QPRT enzyme activity through other mechanisms.

Our findings highlight the fact that a molecular reprogramming process occurring within a stressed cell in an injured tissue can be noninvasively detected and quantified and provide information regarding the magnitude of the damage. Implementing uQ/T as a noninvasive biomarker to improve prediction performance will provide a validated tool to increase the earliness and specificity of the diagnosis of kidney injury, which is a major prerequisite for successful intervention. It is anticipated that the earlier that therapy can be started, the greater the chances are to stop the pathological process. In agreement, the detection of increased uQ/T could lead to a better stratification of the risk of kidney disease progression. uQ/T is a new monitoring tool that could be routinely used in the follow-up of individuals with kidney disease. Individuals at high risk of disease progression will benefit from early nephroprotective strategies whose purpose is to increase intracellular NAD<sup>+</sup> contents, and they would slow disease progression.

In conclusion, ER stress impairs de novo NAD<sup>+</sup> biosynthesis, and the transcription factor DDIT3 may be involved in QPRT repression. Unresolved ER stress and QPRT downregulation constitute a signature of the transition from AKI to CKD. Finally, elevated uQ/T levels reflect the severity of tissue damage upon acute kidney allograft injury and are predictive of kidney outcomes.

## Methods

### Study populations

*HEGP CPB cohort for urinary metabolome.* From February 17, 2017, to April 26, 2017, 42 patients undergoing scheduled cardiac surgery with CPB were enrolled. Detailed information on the cohort is available in Supplementary Table 2. The exclusion criteria were an estimated glomerular filtration rate (eGFR) < 30 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, an infusion of a radio contrast agent within the 24 hours before surgery, a preoperative left ventricular ejection fraction < 40%, age < 18 years, pregnancy, and the inability to provide written informed consent. AKI was diagnosed according to the KDIGO Clinical Practice Guideline for AKI criteria in measuring serum creatinine concentrations and urine output after the surgery. All medications acting on the renin-angiotensin system and all diuretics were stopped on the day before surgery. Lost blood was recovered using Cell Saver Elite (Haemonetics) and retransfused when possible. Vasotropic or inotropic agents, fluids, and transfusion products were administered at the discretion of the anesthesiologist based on clinical, echocardiographic, and biological findings. After surgery, all patients were transferred to the cardiovascular intensive care unit. Hemodynamic data were extracted from the Philips system using IXTREND software version 2.1.0 FW14 (Ixellence GmbH). Mean arterial pressure values were recorded every 1.25 seconds during the CPB procedure. Clinical data were prospectively extracted from the hospital's electronic medical records. Urine samples were collected in Corning 50 mL conical tubes and centrifuged at 2000g for 20 minutes at 4°C within 4 hours of collection. Cell pellets were conserved in 300  $\mu$ L of RLT buffer (Qiagen) and stored until mRNA extraction. Supernatants and cell pellets were stored at -80°C until analysis. All clinical data and samples were deidentified. Urine samples of 41 patients were technically adequate for further analysis. The urine samples used in this study have been part of a previously published analysis (29).

*Leuven KTR cohort for kidney allograft RNA-Seq.* A total of 41 KTRs were enrolled at the University Hospitals of Leuven (12). In each case, protocol biopsy was performed at 4 time points: before implantation (PRE, kidney flushed and stored in ice), after reperfusion (POST, at the end of the surgical procedure), and 3 and 12 months after transplantation. Genome-wide gene expression profiling using RNA-Seq was performed in kidney allograft recipients as previously described (12). Based on RNA-Seq profiling of protocol biopsies, a computational model to characterize the transition from AKI to CKD has been developed, as previously described (12). Briefly, a pseudotime analysis including all 3-month and 12-month samples was performed to cover this transition. The pseudotime line separated into 2 branches: a branch with transcriptomes depicting the progression to fibrosis over time (called "transition" and "progression") and an opposite branch with transcriptomes moving toward recovery (called "recovery").

*Necker KTR cohort for urinary metabolome.* All of the 405 consecutive patients who received a kidney transplant at the center from January 2010 to June 2012 were considered for this prospective, longitudinal, single-center cohort study. The reasons for exclusion were noninclusion criteria ( $n = 48$ ), primary nonfunction/early graft loss ( $n = 12$ ), other study with urine monitoring ( $n = 16$ ), patients' death within the first 6 months ( $n = 7$ ), and early loss of follow-up ( $n = 22$ ). Posttransplantation, urine was collected on day 10 for 237 out of 300 individuals initially included in the study. Glomerular filtration rate was measured using iohexol clearance calculation. Urine samples were centrifuged at 1000g for 10 minutes at 4°C within 4 hours of collection. The supernatant was collected after centrifugation and stored with protease inhibitors at -80°C. The urine samples used in this study have been part of a previously published analysis (30).

*HEGP CKD cohort for urinary transcript monitoring.* Between November 2017 and February 2018, 55 consecutive individuals who were referred to the Service of Nephrology at the Georges Pompidou European Hospital for a kidney biopsy were evaluated for potential inclusion in the study. Indications for biopsy were eGFR < 60 mL/min and/or proteinuria > 0.5 g/L. Kidney biopsies were collected only for patient care. At biopsy, urine samples were collected for routine clinical chemistry analyses and stored at -80°C. Detailed information regarding the clinical, medical, demographic, biological, and histological status of the patients was collected using an information-based data warehouse.

### Urine analyses

*ELISAs.* Urinary KIM-1 levels were quantified using the KIM-1 ELISA immunoassay (R&D Systems), NGAL using the Lipocalin-2/NGAL Quantikine ELISA Immunoassays (R&D Systems), and TIMP-2 and IGFBP7 using TIMP2 ELISA immunoassay (R&D Systems) and IGFBP7 ELISA immunoassay (MyBioSource), respectively, according to the manufacturer's protocol. Multiplication of the 2 markers (TIMP-2\*IGFBP7) was performed as previously described (31). Because the distribution of the values of urinary KIM-1, NGAL, RBP, and TIMP2\*IGFBP7 concentrations was skewed, we performed analyses using log-transformed values to obtain a Gaussian distribution, but this did not change the results of the comparative study.

*Clinical chemistry analyses.* The urine protein measurements were performed at the Clinical Chemistry Department of the Georges Pompidou European Hospital. The urinary levels of RBP were measured using a Siemens BN II nephelometer Analyzer II and kits from Siemens. Values considered normal were less than 0.5 mg/L.

*Urine mRNA processing.* Urine samples from the HEGP CKD cohort were collected in Corning 50 mL conical tubes and centrifuged at 2000g for 20 minutes within 4 hours of collection. Cell pellets were conserved in 300  $\mu$ L of RLT buffer (Qiagen) and stored until mRNA extraction. Supernatants and cell pellets were stored at -80°C until analysis. RNA was extracted from the pellets using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and reverse-transcribed into cDNAs using TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems).

### Targeted metabolomics

HK2 cells were washed twice with ice-cold PBS, drained, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analyses. After addition of an extraction solution made of 50% methanol, 30% acetonitrile, and 20% water (32) (1 mL/1  $\times$  10<sup>6</sup> cells or 500  $\mu$ L for 20  $\mu$ L urine), the samples were vortexed for 5 minutes at 4°C, then centrifuged at 16,000g for 15 minutes at 4°C. The supernatants were collected and separated by liquid chromatography-mass spectrometry using SeQuant ZIC-pHilic column (MilliporeSigma). The aqueous mobile-phase solvent was 20 mM ammonium carbonate plus 0.1% ammonium hydroxide solution, and the organic mobile phase was acetonitrile. The metabolites were separated over a linear gradient from 80% organic to 80% aqueous for 15 minutes. The column temperature was 50°C and the flow rate was 200  $\mu$ L/min. The metabolites were detected across a mass range of 75–1000  $m/z$  using the Q-Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) at a resolution of 35,000 (at 200  $m/z$ ) with electrospray ionization and polarity switching mode. Lock masses were used to ensure mass accuracy below 5 ppm. The peak areas of different metabolites were determined using Thermo Fisher Scientific TraceFinder software using the exact mass of the singly charged ion and known retention time on the HPLC column. Data analysis was performed in the MetaboAnalyst 4.0 software (33).

### Human kidney immunohistochemistry

Kidney biopsies were fixed in alcohol-formalin-acetic acid, dehydrated with ethanol and xylene, embedded in paraffin, and cut into 3  $\mu$ m sections. Samples were then deparaffinized, rehydrated, and heated for 20 minutes at 97°C in citrate buffer. Endogenous peroxidase was inactivated by incubation for 10 minutes at

room temperature in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sections were incubated with PBS containing 1:100 anti-QPRT (catalog orb317756, Biorbyt). Next, sections were incubated with anti-mouse antibody conjugated with horseradish peroxidase-labeled polymer (mixture of secondary antibodies of various species, Dako), then visualized with a peroxidase kit (Dako). Finally, the tissue sections were counterstained with hematoxylin.

### Animal experiments

**Tun injection.** Twelve-week-old C57BL/6 background male mice (Charles River Laboratories) were intraperitoneally injected with Tun (MilliporeSigma, T7765) (1 mg/kg) or vehicle (DMSO) at day 0, and mice were sacrificed 2 days postinjection ( $n = 4-5$  per condition). Total RNA was extracted from kidneys using the RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's protocol.

**Induction of diabetes mellitus.** Twelve-week-old males of the 129/SvJ genetic background (Charles River Laboratories) were rendered diabetic by streptozotocin (MilliporeSigma, S-0130) (100 mg/kg in sodium citrate buffer, pH = 4.5) intraperitoneal injection on 2 consecutive days. Control mice received citrate buffer alone. Mice with fasting glycemia above 300 mg/dL were considered diabetic. Mice were euthanized 10 weeks after the induction of diabetes ( $n = 3-4$  per condition). Total RNA was extracted from kidneys using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol.

**UmodC147W/+ mouse.** A detailed description of the methods for the UmodC147W/+ mouse line of the C57BL/6J genetic background was previously reported (34). Public repositories pertaining to the transcriptome of mRNA isolated from whole-kidney tissue from mutant mice and littermate controls at multiple time points, including 12 and 24 weeks (GEO accession GSE102566), were analyzed for QPRT and DDIT3 expression.

**Bilateral IRI.** This procedure has been detailed (13). A 21-minute warm IRI was performed, and cohorts of injured mice were examined at 2 and 4 hours and 1, and 2, and 3 days after IRI ( $n = 3-4$ ). Warm renal IRI was performed on 10- to 12-week-old (25–28 g) C57BL/6CN male mice from Charles River Laboratories.

### Bulk RNA-Seq of kidneys after bilateral IRI

This procedure has been detailed (13).

### snRNA-Seq

snRNA-Seq data were obtained from an experimental model previously described (8). The experimental protocol is shown in Supplemental Figure 2. Seurat v3.2.0 in R v4 was used for analyses, including normalization, scaling, and clustering of nuclei. First, we analyzed each data set separately and excluded nuclei with fewer than 150 or more than 8000 genes detected. We also excluded nuclei with a relatively high percentage of unique molecular identifiers mapped to mitochondrial genes (>1) and ribosomal genes (>1, for normal kidney sample; and >2, all other samples). We performed curated doublet removal based on known lineage-specific markers. The samples from different data sets were integrated to avoid batch effect using Seurat standard workflow splitting by data set. Following ScaleData, RunPCA, FindNeighbours, and FindCluster at a resolution of 0.5 were performed. We focused our analysis on control and early time points after IRI (4 and 12 hours), resulting in 34,755 renal nuclei including 19,926 PTCs from 15 samples (8 controls and 7 after IRI). Cluster reassignment was performed based on manual review of lineage-specific marker expression. For data visualization, we used RunUMAP, FeaturePlot, and Dotplot from Seurat and dittoHeatmap from dittoSeq package.

### Cells

**HK2 cell line.** Normal human renal epithelial cells of proximal origin (HK2) were purchased from ATCC/LGC Standards (lot number 60352186), then cultured according to a previously published method (35). HK2 is a cell line derived from primary PTCs. HK2 cells were cultured in DMEM containing 5 µg/mL insulin, 10 µg/mL human apotransferrin, 500 ng/mL hydrocortisone, 10 ng/mL epithelial growth factor, 6.5 ng/mL triiodothyronine, 5 ng/mL sodium selenite, 1% fetal calf serum (FCS), 25 IU/mL penicillin, 25 µg/mL streptomycin, and 10 mM HEPES buffer. These cell lines were mycoplasma free (Mycoalert Mycoplasma Detection Kit, Lonza). Tun, Tg, DTT, BFA, and etoposide were from MilliporeSigma.

**Primary culture.** Human renal epithelial cells were harvested from human nephrectomy specimens removed for renal cell carcinoma, then isolated according to previously published methods, with minor modifications (36). Fragments of nonmalignant renal cortex were minced and digested with collagenase IV (250 IU/mL, MilliporeSigma) for 3 hours at 37°C. Cells were centrifuged at 3000g for 15 minutes at



4°C and the pellets washed 3 times with phosphate-buffered saline. Cells were then cultured in DMEM containing 5 µg/mL insulin, 10 µg/mL human apotransferrin, 500 ng/mL hydrocortisone, 10 ng/mL epithelial growth factor, 6.5 ng/mL triiodothyronin, 5 ng/mL sodium selenite, 1% FCS, 25 IU/mL penicillin, 25 µg/mL streptomycin, and 10 mM HEPES buffer. Cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. The characterization of our cellular model has been published previously (37), confirming the proximal descent of the vast majority of the cultured tubular epithelial cells. Experiments were not performed with cells beyond the third passage.

#### RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Transcript expression levels were quantified through SYBR Green RT-qPCR using an ABI PRISM 7900 sequence detector system (Applied Biosystems). Vehicle-treated samples were used as controls, and the fold changes for each tested gene were normalized to the ribosomal protein L13A housekeeping gene. The relative expression levels were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (38). By definition, the expression level of a given gene in a control sample, using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method to calculate relative expression levels, is 1. Primer sequences are listed in Supplemental Table 1.

#### Protein extraction and immunoblotting

Cells were washed in PBS and incubated for 30 minutes at 4°C and in mPER lysis buffer (Thermo Fisher Scientific) with protease (Halt Protease Inhibitor Cocktail 100X, Thermo Fisher Scientific) and phosphatase inhibitors (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X, Thermo Fisher Scientific). Extracts were centrifuged at 14,000g for 15 minutes at 4°C. Protein concentrations in the supernatant were measured by using a Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) and Tecan Safire plate reader. Protein extracts (25 µg) were resolved by 4%–12% SDS-PAGE (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membranes (iBlot, Invitrogen). Membranes were blocked with SEABLOCK blocking buffer (Thermo Fisher Scientific) for 1 hour at room temperature and then incubated overnight at 4°C with primary antibody diluted in blocking buffer. Primary antibodies were anti-QPRT (catalog HPA011887, MilliporeSigma), anti-DDIT3 (catalog L63F7, Cell Signaling Technology), anti-PARP (catalog 95424, Cell Signaling Technology), anti-BiP (GRP78) (catalog sc-1050, Santa Cruz Biotechnology), anti-PERK (catalog C33E10, Cell Signaling Technology), anti-eIF2 $\alpha$  (catalog 9722, Cell Signaling Technology), anti-phospho-eIF2 $\alpha$  (catalog 9721, Cell Signaling Technology), and anti-Tubulin (catalog T9026, MilliporeSigma). After washings in PBS-Tween buffer, membranes were incubated with secondary antibodies coupled to IRDye fluorophores: goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 800 (catalog A32735, Thermo Fisher Scientific) and goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 680 (catalog A-21057, Thermo Fisher Scientific). Infrared signal of membranes was revealed using an Odyssey detection system (Li-Cor Biosciences).

#### siRNA transfections

The transient inactivation of DDIT3 was achieved using small interfering synthetic RNAs (siRNAs) designed by and obtained from Qiagen and transfected using HiPerFect (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Two different siRNAs directed against the same target were transfected: Hs\_DDIT3\_1 FlexiTube siRNA (ref. SI00059528) and Hs\_DDIT3\_3 FlexiTube siRNA (ref. SI00059542). AllStars Negative Control siRNA (5'-AACGAUGACACGAACACACTT-3') has no homology to any known mammalian gene, and validation was performed using Affymetrix GeneChip arrays and a variety of cell-based assays to ensure minimal nonspecific effects on gene expression and phenotype. Cells were incubated with siRNA for 24 hours before conducting the experiments.

#### Expression vectors

Cells were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and were studied while subconfluent. Transient transfection of the gene DDIT3\_OHu16873C\_pcDNA3.1(+) subcloned by HindIII/BamHI in a pcDNA3.1 vector (catalog OHu16873C, GenScript) was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer instructions. pcDNA3.1 vector was used as a control. After 36 hours of transfection, cells were harvested for mRNA and protein preparation.

### NAD measurement

The levels of NAD<sup>+</sup> and intracellular NADH were measured by a colorimetric enzymatic test (BioVision, K337-100) according to the manufacturer's protocol. The cells of a determined number of wells containing the  $2 \times 10^5$  cells required for each test were washed with ice-cold PBS, lysed with 400  $\mu$ L of extraction buffer by 2 cycles of freeze-thaw (freezing 10 minutes at  $-80^\circ\text{C}$ , thawing 10 minutes on dry ice), harvested in tubes, vortexed for 10 seconds, and centrifuged at 19,000g for 5 minutes at  $4^\circ\text{C}$ . Concentrations of NAD<sup>+</sup> or NADH in cell lysates were measured at 450 nm against a calibration range with an Infinite 200 Plate Reader (Tecan). The levels of the dinucleotides were expressed per million cells.

### PARP activity

The levels of PARP activity were measured by ELISA (PARP/Apoptosis Colorimetric Assay Kit, catalog4684-096-K, R&D Systems) according to the manufacturer's protocol. A total of  $5 \times 10^4$  cells/200  $\mu$ L fresh medium/well in a 96-well, flat-bottom plate were incubated 24 hours for ER stressors or 10 mM etoposide. Samples of 25  $\mu$ L containing 200  $\mu$ g proteins were evaluated in triplicate. PARP activity in samples was evaluated by semiquantitatively detecting PAR deposited onto immobilized histone proteins in a 96-well format. An anti-PAR monoclonal antibody, goat anti-mouse IgG-HRP conjugate (both from the kit), and HRP substrate were used to generate a colorimetric signal (450 nm). Absorbance correlates with PARP activity.

### Data availability

RNA-Seq data for human kidney transplant biopsies are available at GEO (GSE126805). Transcriptomic data for human diabetic kidneys are available at GEO (GSE30122). RNA-Seq data for mouse IRI are available at GEO (GSE52004). RNA-Seq data for UmodC147W/+ kidneys and UMOD-expressing epithelium are available at GEO (GSE1102566). RNA-Seq and proteomic data for rat microdissected tubules are available at GEO (GSE56743 and PXD16958). RNA-Seq data for renal cell lines are available at GEO (GSE135441, GSE111837, and GSE99701). snRNA-Seq data are available at GEO (GSE151167, GSE139107, and GSE163863). Raw data of metabolomics analyses and clinical data are available from the corresponding authors upon reasonable request.

### Statistics

Graphs were generated using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.). Statistical analyses were performed with JMP.10 software (SAS Institute Inc.). Student's *t* tests were 2 tailed and 1-way ANOVA was performed when indicated. A *P* value less than 0.05 was considered significant.

### Study approval

*HEGP CPB cohort.* This single-center, prospective, pilot study was approved by the Comité de Protection des Personnes Sud Est III (CPP Sud Est III 2016-072 B), Bron, France, on February 7, 2017, and registered under EudraCT 2016-A01871-50. All patients provided written informed consent for study participation and for the biological analysis before inclusion.

*Leuven KTR cohort for kidney allograft RNA-Seq.* Patients were enrolled at the University Hospitals of Leuven (12). Participants provided written informed consents, and the Ethical Review Board of the University Hospitals of Leuven (S53364 and S59572), Leuven, Belgium, approved this procedure and studies of humans.

*Necker KTR cohort.* This study was approved by the Ethics Committee of Ile-de-France XI (approval 13016), Paris, France, and all the participating patients provided written informed consent.

*HEGP CKD cohort.* Analyses were performed on deidentified patient samples. The patients were informed about the study and did not object to the use of their clinical and biological data collected as part of their clinical care exclusively. Data management complied with the French reference methodologies guidelines MR004 published by the commission nationale informatique et liberté, which apply to research carried out as part of clinical care (Comité de Recherche non CPP [institutional review board], CERAPHP Centre, Paris, France).

*Animal experiments.* Experiments were conducted according to French veterinary guidelines and those formulated by the European Commission for experimental animal use (L358-86/609EEC) and/or to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* as published by the US NIH (National Academies Press, 2011). Animals were fed ad libitum, had free access to water, and were housed at constant ambient temperature in a 12-hour light/12-hour dark cycle.

### Author contributions

NP conceived and designed the project. NP, YB, AR, ZN, and VP performed experiments. NP analyzed CPB data sets. IN performed metabolomic analyses. AH and PG validated data interpretation. OL provided diabetic mouse kidneys. BF and PWR generated the CPB database urine biocollection. AK generated HEGP CKD data sets. MN and PEC provided RNA-Seq data from kidney allograft recipients and PEC performed analyses. DA generated Necker's KTR data sets and urine biocollection. PEC and AR conducted snRNA-Seq experiments and analysis. NP and PEC wrote the manuscript. First authorship order was assigned according to the relative amount of data generated in the project in agreement with the 3 coauthors (YB, AR, and ZN).

### Acknowledgments

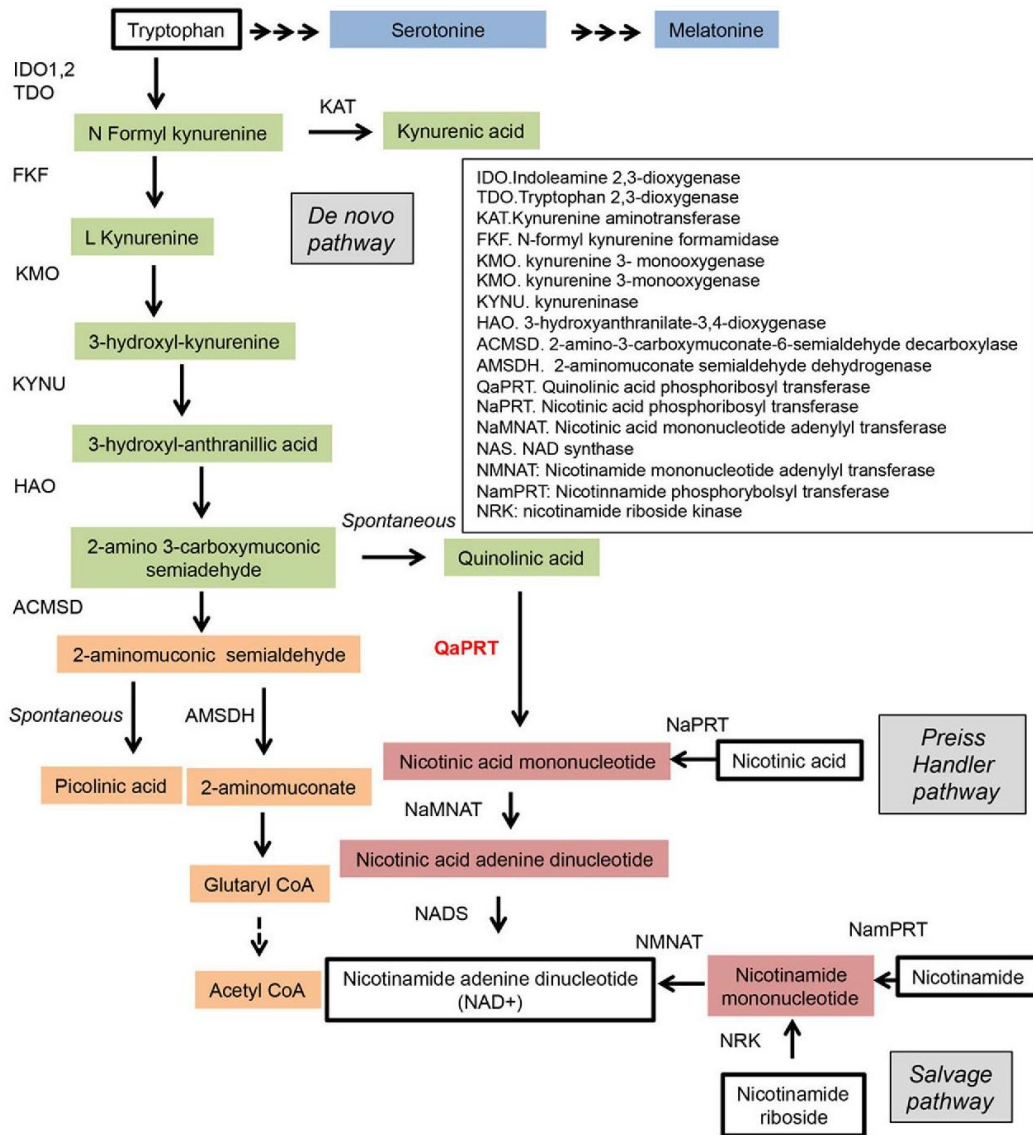
This work was funded by grants from INSERM, La Fondation du Rein (Prix Michel Olmer), and L'Agence de la Biomédecine.

Address correspondence to: Nicolas Pallet, INSERM UMRS1138, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France. Phone: 33156092435; Email: Nicolas.Pallet@aphp.fr.

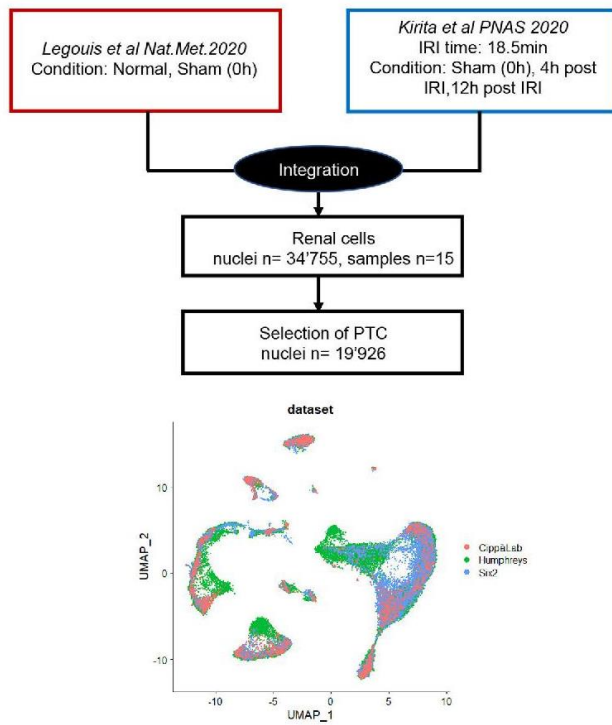
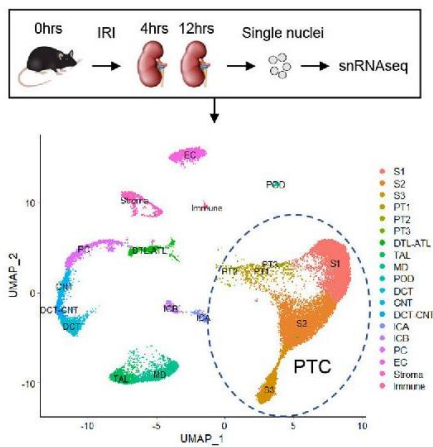
- Verdin E. NAD<sup>+</sup> in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science*. 2015;350(6265):1208–1213.
- Lin S-J. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 2000;289(5487):2126–2128.
- Katsyuba E, et al. NAD<sup>+</sup> homeostasis in health and disease. *Nat Metab*. 2020;2(1):9–31.
- Katsyuba E, et al. De novo NAD<sup>+</sup> synthesis enhances mitochondrial function and improves health. *Nature*. 2018;563(7731):354–359.
- Raito KM, et al. NAD<sup>+</sup> homeostasis in renal health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2020;16(2):99–111.
- Poyan Mehr A, et al. De novo NAD<sup>+</sup> biosynthetic impairment in acute kidney injury in humans. *Nat Med*. 2018;24(9):1351–1359.
- Hershberger KA, et al. Role of NAD<sup>+</sup> and mitochondrial sirtuins in cardiac and renal diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(4):213–225.
- Legouis D, et al. Altered proximal tubular cell glucose metabolism during acute kidney injury is associated with mortality. *Nat Metab*. 2020;2(8):732–743.
- Abedini A, et al. Urinary single-cell profiling captures the cellular diversity of the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32(3):614–627.
- Suthanthiran M, et al. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med*. 2013;369(1):20–31.
- Racusen LC, et al. Culture of renal tubular cells from the urine of patients with nephropathic cystinosis. *J Am Soc Nephrol*. 1991;1(8):1028–1033.
- Cippà PE, et al. Transcriptional trajectories of human kidney injury progression. *JCI Insight*. 2018;3(22):123151.
- Liu J, et al. Molecular characterization of the transition from acute to chronic kidney injury following ischemia/reperfusion. *JCI Insight*. 2017;2(18):94716.
- Woroniecka KI, et al. Transcriptome analysis of human diabetic kidney disease. *Diabetes*. 2011;60(9):2354–2369.
- Qiu L, et al. Kidney-intrinsic factors determine the severity of ischemia/reperfusion injury in a mouse model of delayed graft function. *Kidney Int*. 2020;98(6):1489–1501.
- Noh MR, et al. C/EBP homologous protein (CHOP) gene deficiency attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(9):1895–1901.
- Fan Y, et al. Inhibition of reticulon-1A-mediated endoplasmic reticulum stress in early AKI attenuates renal fibrosis development. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(7):2007–2021.
- Lee JW, et al. Deep sequencing in microdissected renal tubules identifies nephron segment-specific transcriptomes. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(11):2669–2677.
- Limbutara K, et al. Quantitative proteomics of all 14 renal tubule segments in rat. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(6):1255–1266.
- Harding HP, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*. 2003;11(3):619–633.
- Siu F, et al. ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem*. 2002;277(27):24120–24127.
- Hogan KA, et al. The multi-faceted ecto-enzyme CD38: roles in immunomodulation, cancer, aging, and metabolic diseases. *Front Immunol*. 2019;10:1187.
- Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2004;11(4):381–389.
- Cao Y, et al. ER stress-induced mediator C/EBP homologous protein thwarts effector T cell activity in tumors through T-bet repression. *Nat Commun*. 2019;10(1):1280.
- Chikka MR, et al. C/EBP homologous protein (CHOP) contributes to suppression of metabolic genes during endoplasmic reticulum stress in the liver. *J Biol Chem*. 2013;288(6):4405–4415.
- Ubeda M, et al. Stress-induced binding of the transcription factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol Cell Biol*. 1996;16(4):1479–1489.
- Lemmer IL, et al. A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. *Mol Metab*. 2021;47:101169.
- Zempleni J, et al, eds. *Handbook of Vitamins*. CRC Press; 2013.
- Fohlen B, et al. Real-time and non-invasive monitoring of the activation of the IRE1 $\alpha$ -XBP1 pathway in individuals with hemodynamic impairment. *EBioMedicine*. 2018;27:284–292.
- Tavernier Q, et al. A comparative study of the predictive values of urinary acute kidney injury markers angiogenin and kidney

- injury molecule 1 for the outcomes of kidney allografts. *Transplant Direct*. 2017;3(9):e204.
31. Xie Y, et al. Tissue inhibitor metalloproteinase-2 (TIMP-2) • IGF-binding protein-7 (IGFBP7) levels are associated with adverse outcomes in patients in the intensive care unit with acute kidney injury. *Kidney Int*. 2019;95(6):1486–1493.
  32. Mackay GM, et al. Analysis of cell metabolism using LC-MS and isotope tracers. *Methods Enzymol*. 2015;561:171–196.
  33. Chong J, et al. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2019;68(1):e86.
  34. Johnson BG, et al. Uromodulin p.Cys147Trp mutation drives kidney disease by activating ER stress and apoptosis. *J Clin Invest*. 2017;127(11):3954–3969.
  35. Pallet N, et al. Rapamycin inhibits human renal epithelial cell proliferation: effect on cyclin D3 mRNA expression and stability. *Kidney Int*. 2005;67(6):2422–2433.
  36. Detrisac CJ, et al. Tissue culture of human kidney epithelial cells of proximal tubule origin. *Kidney Int*. 1984;25(2):383–390.
  37. Tang S, et al. Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 2003;111(4):515–527.
  38. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–408.

# SUPPLEMENTARY FIGURE 1

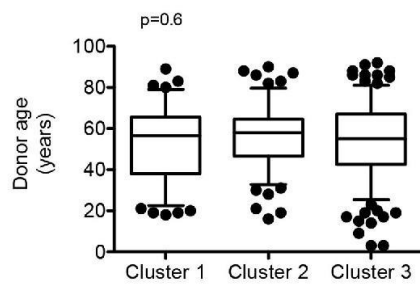


# SUPPLEMENTARY FIGURE 2

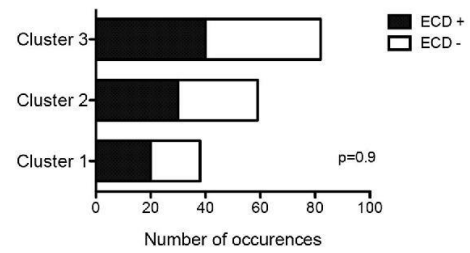


# SUPPLEMENTARY FIGURE 4

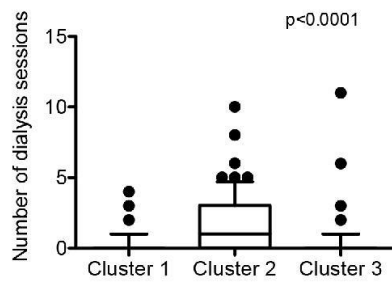
**A**



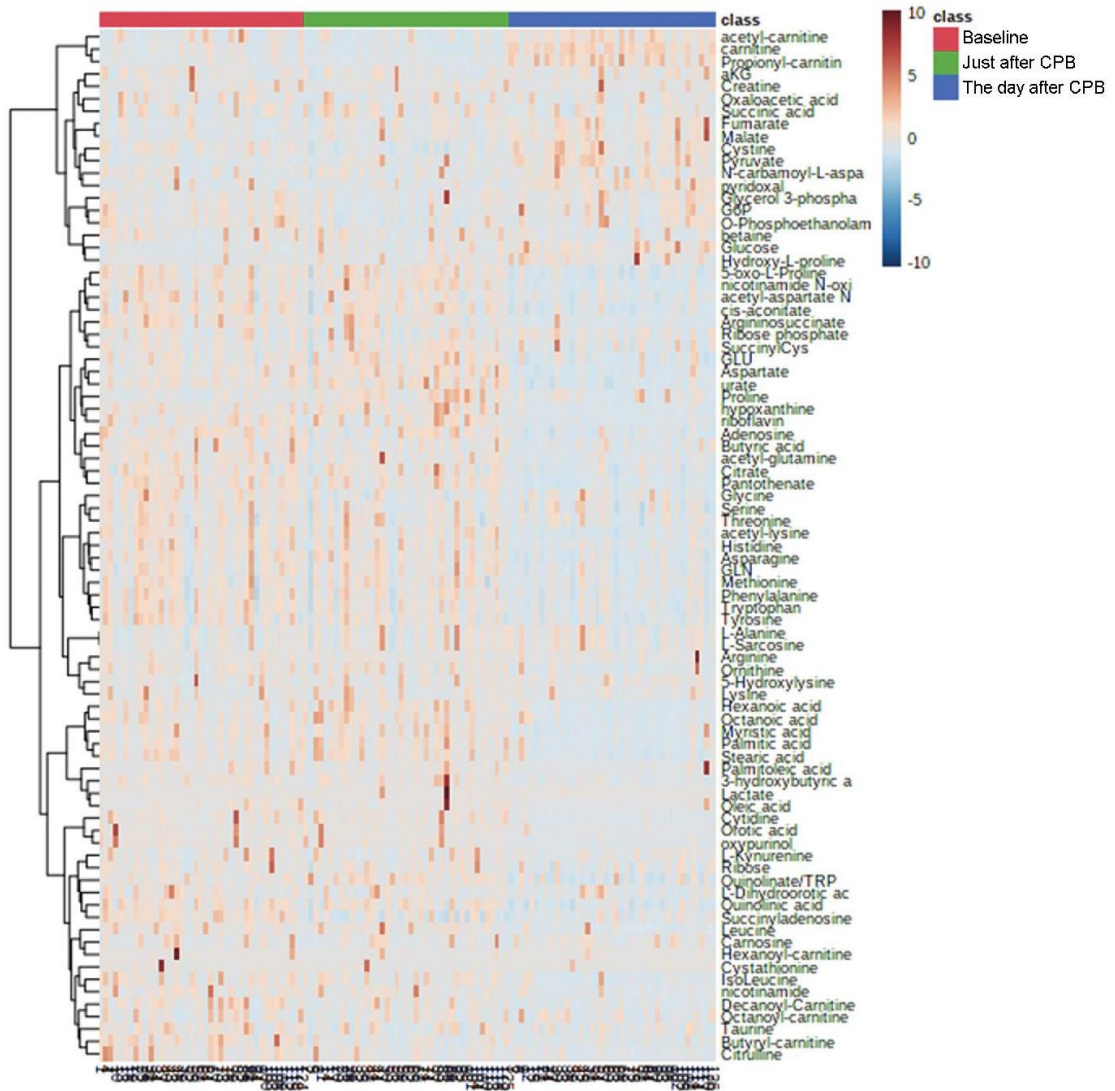
**B**



**C**

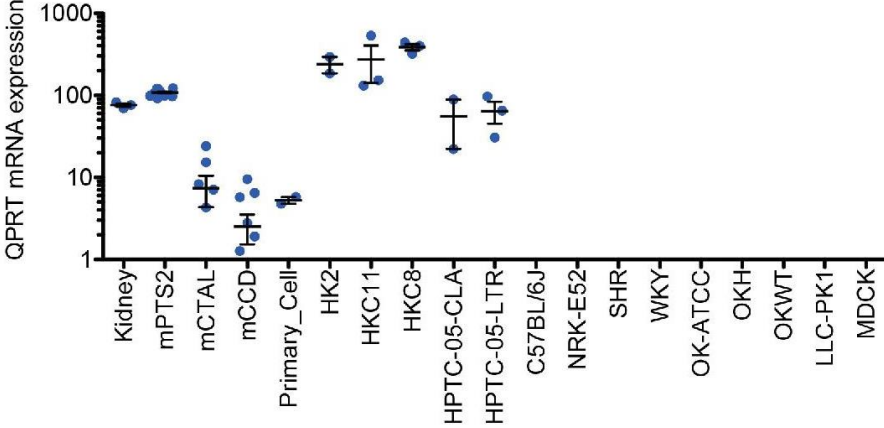


# SUPPLEMENTARY FIGURE 3

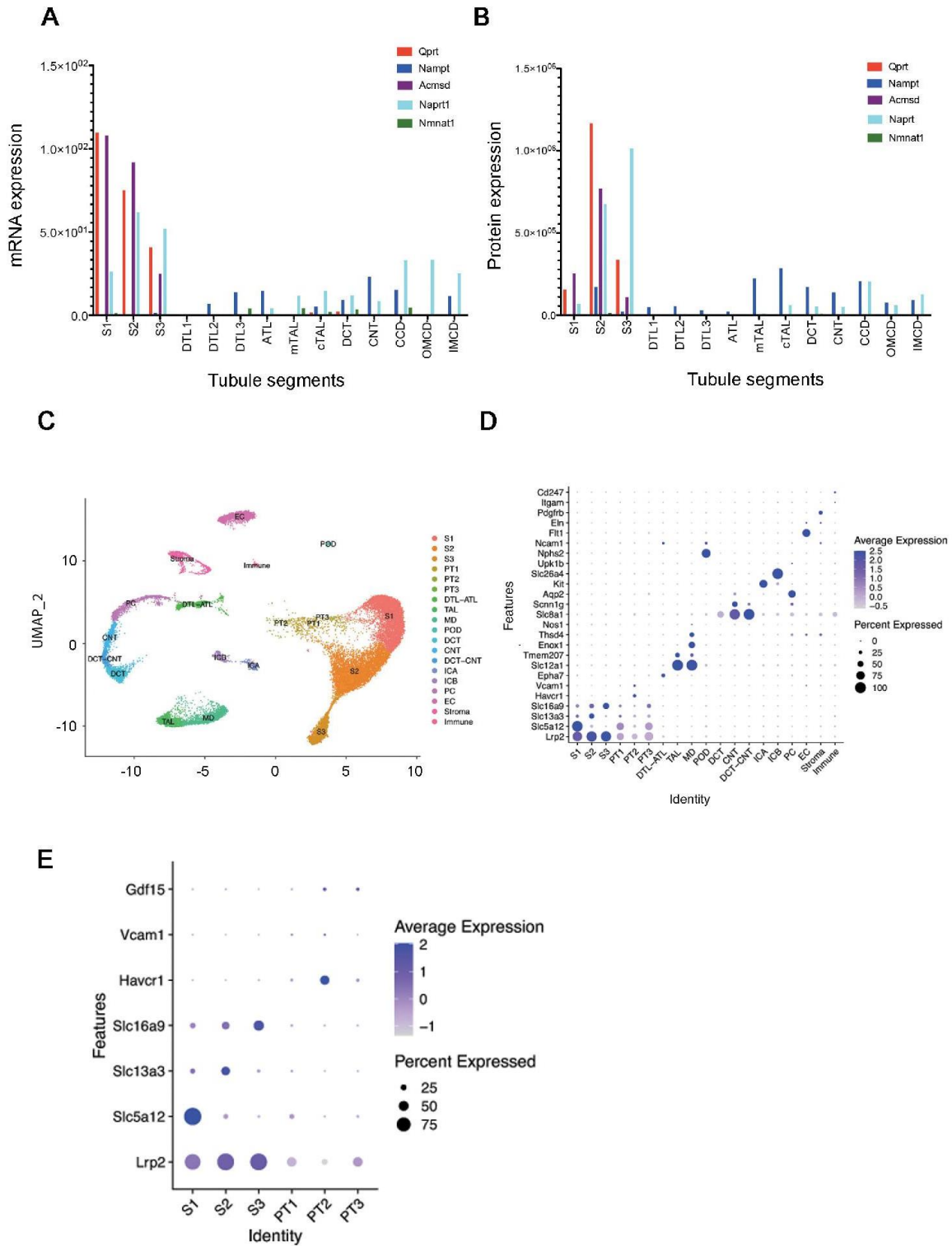




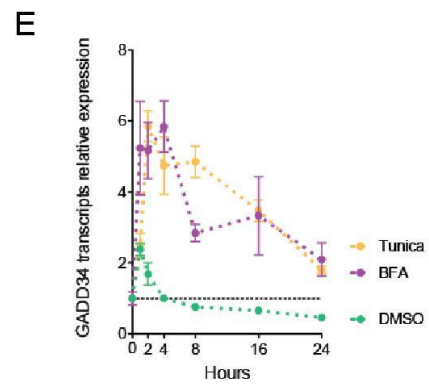
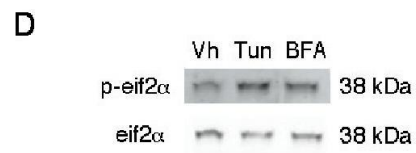
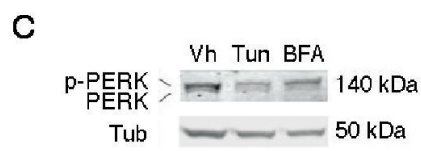
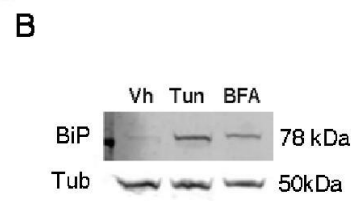
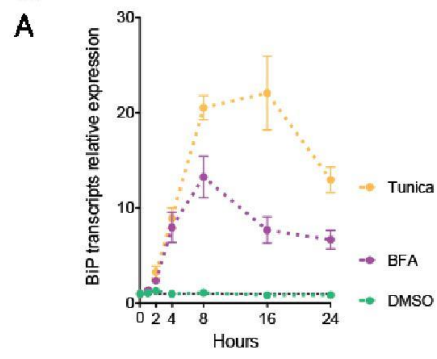
# SUPPLEMENTARY FIGURE 5



# SUPPLEMENTARY FIGURE 6

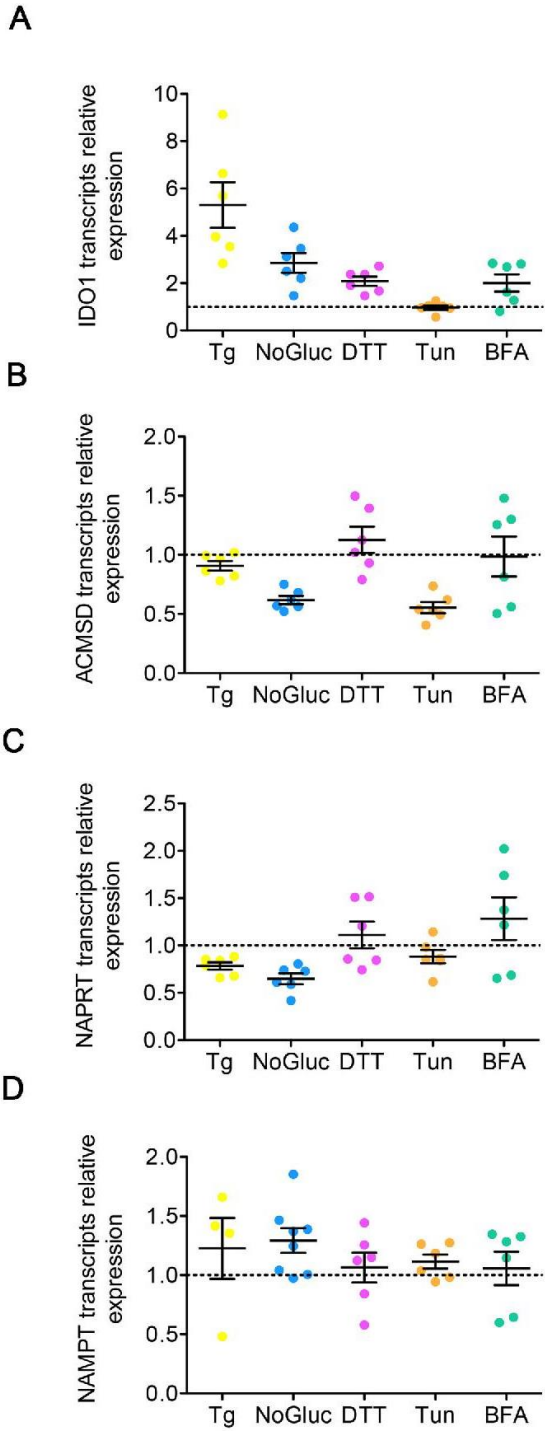


# SUPPLEMENTARY FIGURE 7

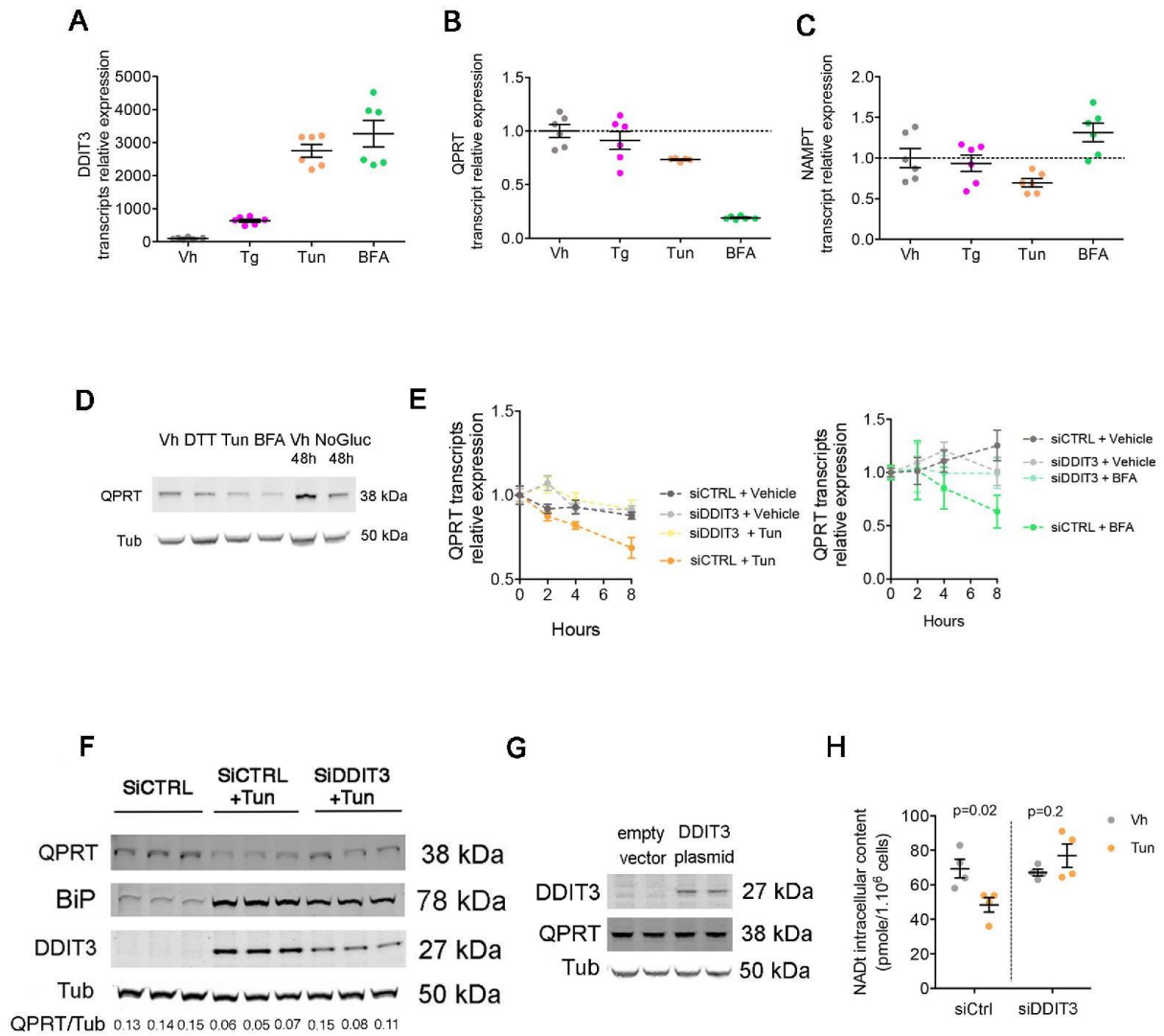




# SUPPLEMENTARY FIGURE 9



# SUPPLEMENTARY FIGURE 10



## **SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS**

### **SUPPLEMENTARY FIGURE 1**

Representation of the tryptophan metabolic pathways

### **SUPPLEMENTARY FIGURE 2**

Schematic of the experimental strategy for snRNAseq

### **SUPPLEMENTARY FIGURE 3.**

Hierarchical clustering (Ward method) of urine samples of 41 patients collected at baseline, just after cardiopulmonary bypass (CPB) and the day after CPB. Each column represents the relative composition of metabolites identified by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry using SeQuant ZIC-pHilic columns. Each line represents a patient. Samples were normalized by median and data were autoscaled. Each metabolite level is reported to urine creatinine.

### **SUPPLEMENTARY FIGURE 4.**

**A.** Box and whiskers plots representing donor's age in groups of patients identified by hierarchical clustering of the metabolome of 237 urine samples collected 10 days after kidney transplantation. The ends of the box are the upper and lower quartiles, the median is marked by a vertical line inside the box, and the whiskers are the two lines outside the box that extend to the highest and lowest observations. p value was computed using one-way ANOVA.

**B.** Histograms representing the proportion of Extended Criteria Donors (ECD) in groups of patients identified by hierarchical clustering of the metabolome of 237 urine samples collected 10 days after kidney transplantation. p value was computed using one-way ANOVA.

**C.** Box and whiskers plots representing the number of dialysis sessions after kidney transplantation in groups of patients identified by hierarchical clustering of the metabolome of 237 urine samples collected 10 days after kidney transplantation. The ends of the box are the upper and lower quartiles, the median is marked by a vertical line inside the box, and the whiskers are the two lines outside the box that extend to the highest and lowest observations. p value was computed using one-way ANOVA.

### **SUPPLEMENTARY FIGURE 5.**

Histograms representing the expression of QPRT transcripts in various human and non-human cell lines. Data are from public repositories pertaining to the transcriptome of these cells lines (<https://esbl.nhlbi.nih.gov/JBrowse/KCT/>)

### **SUPPLEMENTARY FIGURE 6.**

**A.** Histograms representing the expression of Qprt, Nicotinamide phosphoribosyl transferase (Nampt), aminomuconate semialdehyde decarboxylase (Acmsd), nicotinic acid phosphoribosyl transferase (Naprt)1, nicotinamidedinucleotide adenylyl transferase (Nmnat)1 transcripts in rat tubules. Data are from public repositories pertaining to the transcriptome (NCBI accession GSE56743 and the publicly accessible webpage (<https://helixweb.nih.gov/ESBL/Database/NephronRNAseq/index.html>))

**B.** Histograms representing the expression of Qprt, Nampt, Acmsd, Naprt1, Nmnat1 proteins in rat tubules. Data are from public repositories pertaining to the proteome (NCBI accession PDX016958 and the data publicly available online at the Kidney Tubule Expression Atlas website (<https://esbl.nhlbi.nih.gov/KTEA/>)).

**C.** Uniform manifold approximation and projection (UMAP) plot of control kidney samples analyzed by single nucleus RNA sequencing (snRNAseq) (n=8; 25,896 cells) identify the different cellular components of the kidney. Proximal Tubule Segment S1, S2, S3; new (injured) proximal tubule clusters (PT1, PT2, PT3); DTL, descending limb of loop of Henle; ATL, thin ascending limb of loop of Henle; TAL, thick ascending limb of loop of Henle; POD, podocytes; MD, macula densa; DCT, distal convoluted tubule; CNT, connecting tubule; ICA,

type A intercalated cells of collecting duct; ICB, type B intercalated cells of collecting duct; PC, principle cells; EC, endothelial cells.

D. Dot plot displaying gene expression for the renal cell types of control kidney samples analyzed by single nucleus RNA sequencing (snRNAseq) (n=8; 25,896 cells).

E. Dot plot displaying differentiation and injury genes expression in proximal tubule segments (S1, S2, S3), and new (injured) proximal tubule clusters (PT1, PT2, PT3) of 7 mouse IRI and 8 control kidney samples analyzed by single nucleus RNA sequencing (snRNAseq) (n=19,926 cells) (n= 19,926 cells).

#### **SUPPLEMENTARY FIGURE 7.**

A. Time course analysis of the relative expression of BiP transcripts measured by RT-qPCR in HK2 cells incubated with either with vehicle (DMSO), 2.5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin (Tun), 5  $\mu\text{g/mL}$  brefeldin A (BFA), or with for up to 24 h (4 replicates). Bars represent mean $\pm$ sem.

B. Immunoblot representing BiP and tubulin protein expression in HK2 cells 24 hours after incubation with DMSO (vehicle), 2.5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin (Tun), or 5  $\mu\text{g/mL}$  brefeldin A (BFA).

C. Immunoblot representing PERK and tubulin protein expression in HK2 cells 24 hours after incubation with DMSO (vehicle), 2.5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin (Tun), or 5  $\mu\text{g/mL}$  brefeldin A (BFA).

D. Immunoblot representing eif2 $\alpha$ , phospho-eif2 $\alpha$ , and tubulin protein expression in HK2 cells 24 hours after incubation with DMSO (vehicle), 2.5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin (Tun), or 5  $\mu\text{g/mL}$  brefeldin A (BFA).

E. Time course analysis of the relative expression of GADD34 transcripts measured by RT-qPCR in HK2 cells incubated with either with vehicle (DMSO), 2.5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin (Tun), 5  $\mu\text{g/mL}$  brefeldin A (BFA) for up to 24 h (4 replicates). Bars represent mean $\pm$ sem.

#### **SUPPLEMENTARY FIGURE 8.**

A. Hierarchical clustering (Ward method) of HK2 cells incubated with 5  $\mu\text{g/ml}$  BFA or dimethylsulfoxide (DMSO) for 4 h and 8 h (n=4 per condition). Each column represents the relative composition of metabolites identified by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry using SeQuant ZIC-pHilic columns. Each line represents a condition or a replicate. Samples were normalized by sum and data were autoscaled.

B. Volcano plot comparing urinary metabolites of HK2 cells incubated with or without 5  $\mu\text{g/ml}$  brefeldin A (BFA) for 8 hours. The x-axis is Log<sub>2</sub> [fold change for BFA/vehicle] and y-axis is -Log<sub>10</sub> (p.value) based on p values computed using a two-sided unpaired t-test without adjustment for multiple comparisons. Red points indicate metabolites that are above the threshold for the twofold abundance with a p value <0.05.

#### **SUPPLEMENTARY FIGURE 9.**

Scatter dot plots representing the relative expression of Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase (IDO1), Aminocarboxymuconate Semialdehyde Decarboxylase (ACMSD), Nicotinate Phosphoribosyltransferase (NAPRT), and (Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) transcripts measured by RT-qPCR in HK2 cells incubated 8 hours with either with 0.25 mM thapsigargin (Tg), with 1 mM dithiothreitol (DTT), with 2.5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin (Tun), with 5  $\text{mg/mL}$  brefeldin A (BFA), or 48 hours in a glucose-deprived culture medium (No Gluc.), and compared with vehicle(DMSO)-treated cells. The data were obtained from 3 to 7 independent experiments. Bars represent mean $\pm$ sem.

#### **SUPPLEMENTARY FIGURE 10.**

A, B, C. Scatter dot plots representing the relative expression of QPRT (A), DDIT3 (B) and NAMPT (C) transcripts measured by RT-qPCR in primary cultured proximal tubular cells incubated 8 hours with either with 0.25  $\mu\text{M}$  thapsigargin (Tg), with 2.5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin (Tun), with 5  $\mu\text{g/mL}$  brefeldin A (BFA), and compared with vehicle-treated cells. Bars represent mean $\pm$ sem.

D. Immunoblot representing QPRT, DDIT3 and tubulin protein expression in primary cultured proximal tubular cells 24 hours after incubation with DMSO (vehicle), 1  $\mu\text{M}$  dithiothreitol (DTT),



2.5  $\mu\text{g/ml}$  Tun, with 5  $\mu\text{g/ml}$  BFA, or 48 hours in a glucose-deprived culture medium (No Gluc.). The immunoblot shown is representative of 3 independent experiments.

**E.** Time course analysis of the relative expression of QPRT transcripts measured by RT-qPCR in primary cultured PTCs transfected with DDIT3 siRNA (siDDIT3) or with control siRNA (siScramble) and incubated 8 hours with either 2.5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin (Tun) (Left), 5  $\mu\text{g/ml}$  brefeldin A (BFA) (right), and compared with vehicle-treated cells. Bars represent mean $\pm$ sem

**F.** Immunoblot representing the expression of QPRT, BiP, DDIT3, and Tubulin proteins in primary cultured PTCs transfected with DDIT3 siRNA (siDDIT3) or with control siRNA (siScramble) and incubated with 2.5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin (Tun), or with DMSO (vehicle) for 24h. The immunoblot shown is representative of two independent experiments.

**G** Immunoblot representing the expression of QPRT and tubulin proteins in primary cultured PTCs transfected with a pcDNA3.1 vector expressing DDIT3 or an empty vector for 24h. The immunoblot shown is representative of two independent experiments.

**H.** Scatter dot plots representing the concentrations of total NAD concentrations in primary cultured PTCs transfected with DDIT3 siRNA (siDDIT3) or with control siRNA (siScramble) and incubated with 2.5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin (Tun) or DMSO (vehicle) for 24h. p value was computed with a Student's t-test.

**Supplementary table 1. RT-qPCR primers list**

**Human-expression**

huBIP-FwdGGTGAAAGACCCCTGACAAA,  
huBIP-RevGTCAGGCGATTCTGGTCATT;  
huNAMPT-FwdGTGACTTAAGCAACGGAGCG  
huNAMPT-RevGGAGGATGTTGAACTCGGCT;  
huQPRT-FwdGAGGGAAAGGAAGGATGGAAAG;  
huQPRT-RevTGGGTGCATGAAGGATGAAG ;  
huDDIT3-Fwd TGGAAGCCTGGTATGAGGAC  
huDDIT3-Rev TGTGACCTCTGCTGGTTCTG  
huCD38-Fwd ATGTTACCCCTGGAGGACACGCTGCT  
huCD38-Rev CTCAGGATTTTTACACACTGAAG  
huPGC-1a-FwdCCAAAGGATGCGCTCTCGTTCA;  
huPGC-1a-RevCGGTGTCTGTAGTGGCTTGACT  
huNAPRT-FwdTCCCCAACTTCCTAGCAGTC  
huNAPRT-RevGAAGACCTTGCGGATCTCCT  
huACMSD-FwdCAGGAGCTCTTTCCTGTCTATG  
huACMSD-RevGCCAAGGGAGCCAGTATTT  
huIDO1-FwdGTGAAAGCTCTGGTCTCCCT  
huIDO1-RevTCAGTGCCTCCAGTTCCTTT  
huRPL13A-FwdCCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA  
huRPL13A-RevGAGGACCTCTGTGATTTGTCAA  
huIGADD34-FwdAGGAGGCTGAAGACAGTGGA  
huIGADD34-RevGGCCATCTGCAAATTGACTT

**Mouse**

mQprt-FwdGTTCTGTGGGACACACATTGA  
mQprt-Rev GGGTATCTCCTTCAGCAAACAG  
mDdit3-FwdCAACAGAGGTCACACGCACA  
mDdit3-RevGGCACTGACCACTCTGTTTC

**Supplementary table 2.** Description of the cohort of 41 patients undergoing cardiopulmonary bypass

Characteristic	All (n=41)	AKI (n=11)	No AKI (n=30)	p value
Age (years)	62±15	64.5±4.5	61.5±3	0.5
Men, n (%)	25 (60)	6 (54)	20 (66)	0.31
BMI (kg/cm <sup>2</sup> )	26±5	27±0.4	25±1	0.31
Preexisting medical condition, n (%)				
• Hypertension	20 (49)	7 (63)	14 (46)	0.5
• Diabetes	2 (4.7)	1 (1)	1 (8)	0.5
• Obesity	7 (16)	2 (18)	5 (16)	1
• Atherosclerotic disease	6 (14.2)	2 (18)	4 (16)	0.8
• CKD	9 (21)	4 (36)	5 (16)	0.3
Preoperative characteristics				
• eGFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	74±23	63±6	78.5±4	0.5
• Ejection fraction (%)	60±9.5	62±3	61.1±1.5	0.6
• Euroscore 2 <sup>§</sup>	2.5±3	3±0.5	2.5±0.5	0.5
Preoperative medications, n (%)				
• RAS inhibitors	17 (44)	4 (33)	14 (46)	0.4
• Diuretics	12 (28)	6 (23)	5 (41)	0.3
• Beta blockers	22 (52)	8 (66)	14 (46)	0.25
Indications, n (%)				
• CABG	10 (24)	5 (41)	6 (20)	0.15
• Mitral valve	8 (19)	6 (20)	2 (16)	0.8
• Aortic valve	24 (57)	8 (66)	16 (66)	0.45
• Ascending aorta	6 (14)	1 (8)	5 (16)	0.45
• Others	6 (14)	0	5 (16)	0.45
Operative parameters				
• CBP length (min)	99±23	110±10	95±6.5	0.25
• Aortic cross-clamp length (min)	75±31	80±9	71±5.5	0.25
• Whole procedure length (min)	296±45	309±12	287±8	0.1
• Fluid loading (ml)	1570±710	1240±201	1686±125	0.07
• Blood loss (ml)	3020±1382	3270±422	2908±268	0.45
• Cell Saver (ml)	795±625	693±180	843±120	0.5
• Per CBP urine output (ml/kg/h)	61±86	65±25	61±16	0.9
• Per procedure urine output (ml/kg/h)	142±106	162±31	138±20	0.5
Post-operative parameters				
• 24 hour fluids administration (ml) <sup>¶</sup>	2002±737	2145±210	1950±135	0.5
• Catecholamine use (days) <sup>§</sup>	0.5±1.1	1±0.5	0.5±1	0.05
• Dialysis, n (%)	3 (7)	3 (25)	0	0.004
• ICU stay (days)	3±3	5±1	2.8±0.6	0.04
• Hospital stay (days)	15±8	19±9	14±1.5	0.04
• Death, n (%)	2 (5)	2 (16)	0 (0)	0.02

Plus-minus values are means±standard error.

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

§ Euroscore 2, [www.euroscore.org/calc.html](http://www.euroscore.org/calc.html)

¶ Includes albumin, Ringer's lactate, plasmion, or G5%.

§ Includes norepinephrine, dobutamine or adrenaline.

AKI is defined according to the AKI-KDIGO definition

**Supplementary tables 3.** Parameters associated with uQ/T

**Supplementary table 3A.** Parameters associated with uQ/T the day after cardiopulmonary bypass

<b>Characteristic</b>	<b>Estimate</b>	<b>p value</b>
Sex (female)	-3.1	0.02
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	-1.9	0.5
Age (years)	15.5	0.07
eGFR at baseline (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	-36.5	0.004
Left ventricular ejection fraction (%)	-4	0.4
CPB duration (minutes)	23.5	0.15
Aortic clamp time (minutes)	23.7	0.1
Procedure length (minutes)	30	0.2
Noradrenaline use	41	0.7
Intraoperative volume expansion (ml)	235	0.5
Intraoperative blood loss (ml)	773	0.2
Intraoperative time spent with MAP <60 mmHg (%)	0.04	0.2
Coronary bypass	1.8	0.25
Mitral valve surgery	-2.4	0.07
Aortic valve surgery	-0.3	0.7
Aortic surgery	0.5	0.7

**Supplementary table 3B.** Multivariate analysis of parameters associated with uQ/T the day after cardio pulmonary bypass.

<b>Characteristic</b>	<b>Estimate</b>	<b>95% CI</b>	<b>p value</b>
Sex (female)	-0.1	-0.17 to -0.02	0.01
Age (years)	0.003	-0.002 to 0.008	0.25
eGFR baseline (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	0.004	-0.007 to -0.0006	0.02
Aortic clamp duration (minutes)	0.001	-0.0008 to 0.004	0.24
Mitral valve surgery	-0.06	-0.04 to 0.1	0.4

Model F ratio 4.85; p=0.0018

BMI denotes body mas index

eGFR denotes estimated glomerular filtration rate (CKD-EPI formula)

MAP denotes mean arterial pressure

**Supplementary tables 4.** Multivariate analysis of parameters associated with AKI occurrence in the week after cardio pulmonary bypass.

**Supplementary table 4A.** Model including parameters associated with AKI at day 1 in the suppl. table 2

Model Chi2: 13.8 p=0.007

<b>Characteristic</b>	<b>Estimate</b>	<b>95% CI</b>	<b>p value</b>
Whole procedure length (min)	-0.01	-0.03 to 0.008	0.27
Fluid loading (ml)	0.001	-0.00006 to 0.003	0.06
Catecholamine use (days)	0.003	-0.002 to -0.01	0.4
uQ/T at day 1	-4	-9 to -1.4	0.003

**Supplementary table 4B.** Model including parameters associated with uQ/T at day 1 in the suppl. table 3B

Model Chi2: 8.9; p=0.03

<b>Characteristic</b>	<b>Estimate</b>	<b>95% CI</b>	<b>p value</b>
Sex (female)	-0.15	-0.1 to 0.7	0.7
eGFR baseline (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	0.02	-0.01 to 0.06	0.3
uQ/T at day 1	-3.2	-7.4 to 0.006	0.049

**Supplementary tables 5.** Clinical characteristics of the cohort of 237 kidney transplant recipients

**Supplementary table 5A.** Demographic and clinical characteristics of the cohort of kidney transplant recipients who had a urine sample analysis 10 days after transplantation.

<b>Characteristic</b>	<b>n=237</b>
Age (yrs)	50.5±15.4
Male sex-n (%)	148 (62)
Cause of ESRD-n (%)	
• Primary GN	56 (24)
• Diabetes	28 (12)
• Cystic/hereditary	45 (19)
• Secondary GN	15 (6.5)
• Hypertension	14 (6)
• Interstitial nephritis	16 (7)
• Miscellaneous	12 (5)
• Uncertain	43 (18.5)
Donor age (yrs)	54 ±19
Living donor-n (%)	57 (24)
Extended criteria donor-n (%)	89 (49)
Retransplantation-n (%)	36 (15)
Preformed anti HLA DSA-n (%)	100 (42)
Cold ischemia time (hours)	16.4±10
Delayed graft function-n (%)	53 (23)
Serum creatinine at 10 days (μmol/L)	260±238

Plus-minus values are means±standard error.

ESRD denotes end stage renal disease, GN glomerulonephritis, DSA donor specific antibodies.

Extended criteria donors (ECD) are normally aged 60 years or older, or over 50 years with at least two of the following conditions: hypertension history, serum creatinine > 133 μmol/L or cause of death from cerebrovascular accident.

**Supplementary table 5B.** Initial immunosuppressive regimens of the cohort of kidney transplant recipients who had a urine sample analysis 10 days after transplantation.

<b>Characteristic</b>	<b>n=237</b>
Basiliximab-n (%)	94 (39)
ATG-n (%)	131 (55)
Tacrolimus-n (%)	188 (80)
Cyclosporine-n (%)	44 (18)
IMPDHi-n (%)	244 (100)
MTORi-n (%)	3 (8)
Steroids-n (%)	244 (100)
Anti CD20 immunotherapy-n (%)	29 (12)
Intravenous polyvalent immunoglobulins-n (%)	122 (51)

ATG denotes antithymocyte globulins, IMPDHi inhibitor of Inosine Monophosphate Deshydrogenase, MTORi inhibitor of Mechanistic Target of Rapamycin.

**Supplementary table 6.** Metabolites discriminating cluster 2 versus cluster1+3. Among 237 kidney transplant recipients. 3 groups of patients (clusters) have been identified according to their urinary metabolome measured 10 days after transplantation.

<b>Metabolite</b>	<b>Fold change</b>	<b>p value</b>
Histidine	0.3	5.3e-14
Quinolinic acid	2.1	3.7e-10
Ribose	2.3	1.5e-09
Quinolate/Tryptophan	6.7	1.5e-08
5-Hydroxylysine	0.4	3.9e-08
Amino adipate	2.5	1.3e-06
Riboflavin	3.1	4.8e-05
Cystathionine	2.5	0.0001
Lysine	0.4	0.0002
Pyridoxal	2.1	0.0007
Pantothenate	0.4	0.02



**Supplementary table 7. Demographic and clinical characteristics of a non-selected cohort of 55 patients with a chronic kidney disease (CKD).**

<b>Characteristic</b>	<b>n=55</b>
Age (years)	65±17
Men, n (%)	39 (70)
BMI (kg/cm <sup>2</sup> )	27±5
Hypertension, n (%)	42 (72)
Diabetes, n (%)	19 (34)
Kidney transplant, n (%)	19 (34)
Cause of kidney disease (in native kidneys)	
• Primary glomerulonephritis	8
• Amyloidosis	5
• AAN	4
• Chronic tubulointerstitial nephropathy	4
• ADPKD	3
• Malformative uropathy	3
• MGRS	2
• Diabetes	4
• Hypertensive	1
• HUS	1
• Alport syndrome	1
eGFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	41±27
Serum creatinine (μmol/l)	229±167
Proteinuria (g/mmol)	0.15±0.3
Albuminuria (mg/mmol)	0.55±18

Plus-minus values are means±standard error

BMI denotes body mass index; AAN: ANCA associated nephropathy; ADPKD: autosomal dominant polycystic kidney disease; MGRS: monoclonal gammopathy of renal significance; HUS: hemolytic and uremic syndrome; eGFR: estimated Glomerular filtration rate by the CKD-EPI formula.

**Supplementary tables 8.** Intracellular metabolites associated with ER stress in HK2 cells

**Supplementary table 8A.** Metabolites that best discriminate Tunicamycin-treated cells from vehicle treated cells. Cells were incubated 8 h with vehicle or Tunicamycin. In bold are shown metabolites that are common to brefeldin A treated cells.

Metabolite	Fold change	p value
<b>Quinolinic acid</b>	<b>6.5</b>	<b>0.06</b>
<b>Asparagine</b>	<b>6.2</b>	<b>2.9e-06</b>
Cystine	3.1	0.09
Tyrosine	2.7	0.01
Folate	2.4	0.002
S-Adenosyl-L-methionine	2.3	0.03
Acetyl-glutamine	2.2	0.04
<b>UDP-GlcNAc</b>	<b>2.1</b>	<b>4e-06</b>
Cytidine	2	0.08
Fumarate	0.4	0.02
<b>Glyceraldehyde 3-phosphate</b>	<b>0.3</b>	<b>0.004</b>
<b>L-Dihydroorotic acid</b>	<b>0.3</b>	<b>0.07</b>
Glucose	0.3	0.07
Propionyl-carnitine	0.3	0.002
<b>N-carbamoyl-L-aspartic acid</b>	<b>0.19</b>	<b>0.0004</b>
Orotic acid	0.15	7.8e-05
Proline	0.15	0.02

**Supplementary table 8B.** Metabolites that best discriminate brefeldin A-treated cells from vehicle treated cells. Cells were incubated 8 h with vehicle or brefeldin A. In bold are shown metabolites that are common to tunicamycin treated cells.

	Fold change	p value
<b>Quinolinic acid</b>	<b>6.9</b>	<b>0.02</b>
<b>Asparagine</b>	<b>4.9</b>	<b>9.1e-12</b>
Acetyl CoA	2.8	0.004
Adenosine	2.6	1.1e-05
Glycerol 3-phosphate	2.5	1e-06
NADH	2.3	0.02
<b>UDP-GlcNAc</b>	<b>2.3</b>	<b>9.8e-07</b>
Creatine	2.2	0.0007
Orotic acid	0.4	0.0002
<b>Glyceraldehyde 3-phosphate</b>	<b>0.4</b>	<b>0.0005</b>
Citrulline	0.3	0.0004
Acetyl-lysine	0.3	0.0002
Argininosuccinate	0.3	3.5e-05
<b>L-Dihydroorotic acid</b>	<b>0.3</b>	<b>8.1e-05</b>
Fructose	0.3	0.02
Hydroxy-L-proline	0.3	0.0007
<b>N-carbamoyl-L-aspartic acid</b>	<b>0.2</b>	<b>0.0008</b>

## **AXE 2. Suivi de l'IRA par les métabolites de la voie des kynurénines**

### **Etude 1. Mise au point et validation d'une technique de quantification des métabolites de la voie des kynurénines dans le plasma et l'urine par LC-MS/MS et suivi de l'activité de la voie lors d'IRA consécutive à une chirurgie cardiaque sous CEC**

*Validation of a liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of tryptophan and 10 key metabolites of the kynurenine pathway in plasma and urine: Application to a cohort of acute kidney injury patients.*

*Nadour Z, Simian C, Laprévote O, Lorient MA, Larabi IA, Pallet N.*

*Clinica Chimica Acta.2022 Sep; 534: 115-127*

#### **CONTEXTE ET OBJECTIF DE L'ETUDE**

L'objectif de cette étude était, dans un premier temps, de développer et valider une méthode en LC-MS/MS permettant de quantifier simultanément dans le plasma et l'urine le NA et le NAM, ainsi que neuf (09) métabolites clés de la voie des kynurénines, le TRP, la KYN, le KA, le XA, la 3-HK, le 3-HANA, le QA, le NaMN et le PIC. Ensuite, nous avons évalué la pertinence clinique du suivi de l'activité de la voie des kynurénines dans les urines, sur une cohorte de 41 patients ayant subi une chirurgie cardiaque sous CEC (cohorte HEGP).

#### **METHODES ET RESULTATS**

Dans un premier temps, nous avons développé une méthode de dosage de métabolites de la voie des kynurénines dans le plasma et l'urine par LC-MS/MS, et avons évalué ses performances analytiques selon les standards internationaux.

Afin de déterminer la valeur pronostique et/ou diagnostique des métabolites de la voie des kynurénines dans l'IRA post chirurgie cardiaque sous CEC, nous avons utilisé les mêmes échantillons urinaires de la cohorte HEGP de 41 patients, pour lesquels des urines ont été prélevées avant la CEC, à la fin de l'intervention, et un jour après la chirurgie. Parmi ces patients, 27 % ont développé une IRA à la suite de l'intervention. La quantification du TRP et du QA par LC-MS/MS a confirmé l'augmentation significative du ratio urinaire QA/TRP ( $p = 0,003$ ) à 24 h après l'intervention chez les patients ayant développé une IRA par rapport aux patients sans IRA. Ce résultat montre que l'élévation du ratio QA/TRP est un marqueur précoce de la survenue de l'IRA après chirurgie cardiaque et confirme les résultats de l'étude princeps de Mehr et *al.* de 2018 qui a montré une augmentation du ratio urinaire QA/TRP chez les patients ayant développé une IRA 24 h après l'intervention cardiaque. De plus, nous avons observé chez les patients ayant développé l'IRA, un ratio urinaire PIC/TRP plus élevé à 24 h après l'intervention ( $p = 0,006$ ) par rapport aux contrôles. Ce résultat suggère que l'élévation de ce ratio pourrait être un autre marqueur précoce prédictif de la survenue de l'IRA après chirurgie cardiaque.

## **CONCLUSION**

Nous avons développé et validé une méthode LC-MS/MS fiable permettant de quantifier simultanément plusieurs métabolites de la voie des kynurénines dans le plasma et l'urine. Cette méthode a été appliquée à l'étude de l'activité de la voie des kynurénines dans les maladies rénales, et trouve tout son intérêt pour explorer à l'avenir d'autres conditions médicales associées à une perturbation de cette voie. A travers ce développement analytique, nous avons montré et confirmé la pertinence clinique du ratio QA/TRP comme biomarqueur urinaire précoce de la survenue d'une IRA après chirurgie cardiaque sous CEC. De plus, le PIC urinaire semble être un autre biomarqueur non invasif potentiel qui pourrait être prédictif de la survenue de l'IRA.

## **Publication n° 2**

Validation of a liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of tryptophan and 10 key metabolites of the kynurenine pathway in plasma and urine: Application to a cohort of acute kidney injury patients

**Nadour Z**, Simian C, Laprévotte O, Lorient MA, Larabi IA, Pallet N.

**Clinica Chimica Acta.2022 Sep; 534: 115-127**



## Validation of a liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of tryptophan and 10 key metabolites of the kynurenine pathway in plasma and urine: Application to a cohort of acute kidney injury patients

Zahia Nadour<sup>a,b,\*</sup>, Christophe Simian<sup>a</sup>, Olivier Lapr evote<sup>a</sup>, Marie-Anne Lorient<sup>a,b</sup>, Islam Amine Larabi<sup>c</sup>, Nicolas Pallet<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Chemistry, Georges Pompidou European Hospital, AP-HP, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France

<sup>b</sup> Paris University, INSERM UMR51138, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l' cole de médecine, 75006 Paris, France

<sup>c</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, Paris-Saclay University (Versailles Saint-Quentin-En-Yvelines University), Inserm U-1173, Raymond Poincaré Hospital, AP-HP, 104 Boulevard Raymond Poincaré, 92380 Garches, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Kynurenic acid  
Kynurenine pathway  
Quinolinic acid  
Picolinic acid  
Acute kidney injury  
Mass spectrometry  
Tryptophan

### ABSTRACT

A sensitive and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and validated for the simultaneous determination of tryptophan (Trp) and ten metabolites of kynurenine pathway, including kynurenine (Kyn), 3-hydroxy-kynurenine (3-HK), kynurenic acid (KA), xanthurenic acid (XA), 3-Hydroxy-anthranilic acid (3-HANA), quinolinic acid (QA), nicotinic acid mononucleotide (NaMN), picolinic acid (Pic), nicotinamide (NAM) and nicotinic acid (NA) in both plasma and urine. This LC-MS/MS method was used to predict the occurrence of acute kidney injury (AKI) in a cohort of patients with cardiac surgery under cardiopulmonary bypass (CPB). Urinary concentrations of Pic, as well as Pic to Trp and Pic to 3-HANA ratios were highly predictive of an AKI episode the week after CPB, indicating that Pic could be a predictive biomarker of AKI. Thus, monitoring the kynurenine pathway activity with this LC-MS/MS method is a clinically relevant tool to identify new biomarkers of kidney injury.

### 1. Introduction

The essential amino acid Tryptophan (Trp) is a precursor of numerous biologically active metabolites, and the kynurenine pathway (KP) is the primary route for its catabolism, accounting for approximately 95% of dietary Trp degradation [1]. The KP leads to de novo biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), which is also produced from nicotinamide (NAM) and nicotinic acid (NA) via the salvage pathway and Preiss Handler pathway, respectively.

Trp is metabolized by the rate-limiting enzymes hepatic tryptophan 2,3-dioxygenases (TDO) and extrahepatic indoleamine 2,3-dioxygenases (IDO) into *N*-formylkynurenine, which is further metabolized to kynurenine (Kyn). The KP is divided into three branches (Fig. 1).

In the de novo NAD<sup>+</sup> biosynthesis branch, Kyn is successively converted into 3-hydroxykynurenine (3-HK), 3-hydroxyanthranilic acid (3-HANA), 2-amino-3-carboxymuconic semialdehyde, quinolinic acid

(QA), nicotinic acid mononucleotide (NaMN), and finally to NAD<sup>+</sup> [1]. Quinolinic acid phosphoribosyltransferase (QPRT), a key enzyme in the de novo biosynthesis of NAD<sup>+</sup>, converts QA to NaMN [2]. Kyn can be directed in a second branch to produce picolinic acid (Pic) or acetyl-CoA [1]. The 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase (ACMSD) enzyme is responsible for redirecting KP metabolism away from NAD<sup>+</sup> synthesis toward Pic production or glycolysis [3]. Finally, a third subbranch of KP produces kynurenic acid (KA) and xanthurenic acid (XA) via kynurenine aminotransferases from two different precursors, Kyn and 3-HK, respectively.

Kyn metabolites are critical for energy metabolism, immune functions and neuromodulation [1]. Indeed, the KP generates numerous biologically active metabolites, including NAD<sup>+</sup>, the immunomodulator Pic, *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor agonist QA and antagonist KA, as well as immunosuppressive metabolites such as 3-HK and 3-HANA [1]. The KP activity has been linked to cancer [4,5], as well as

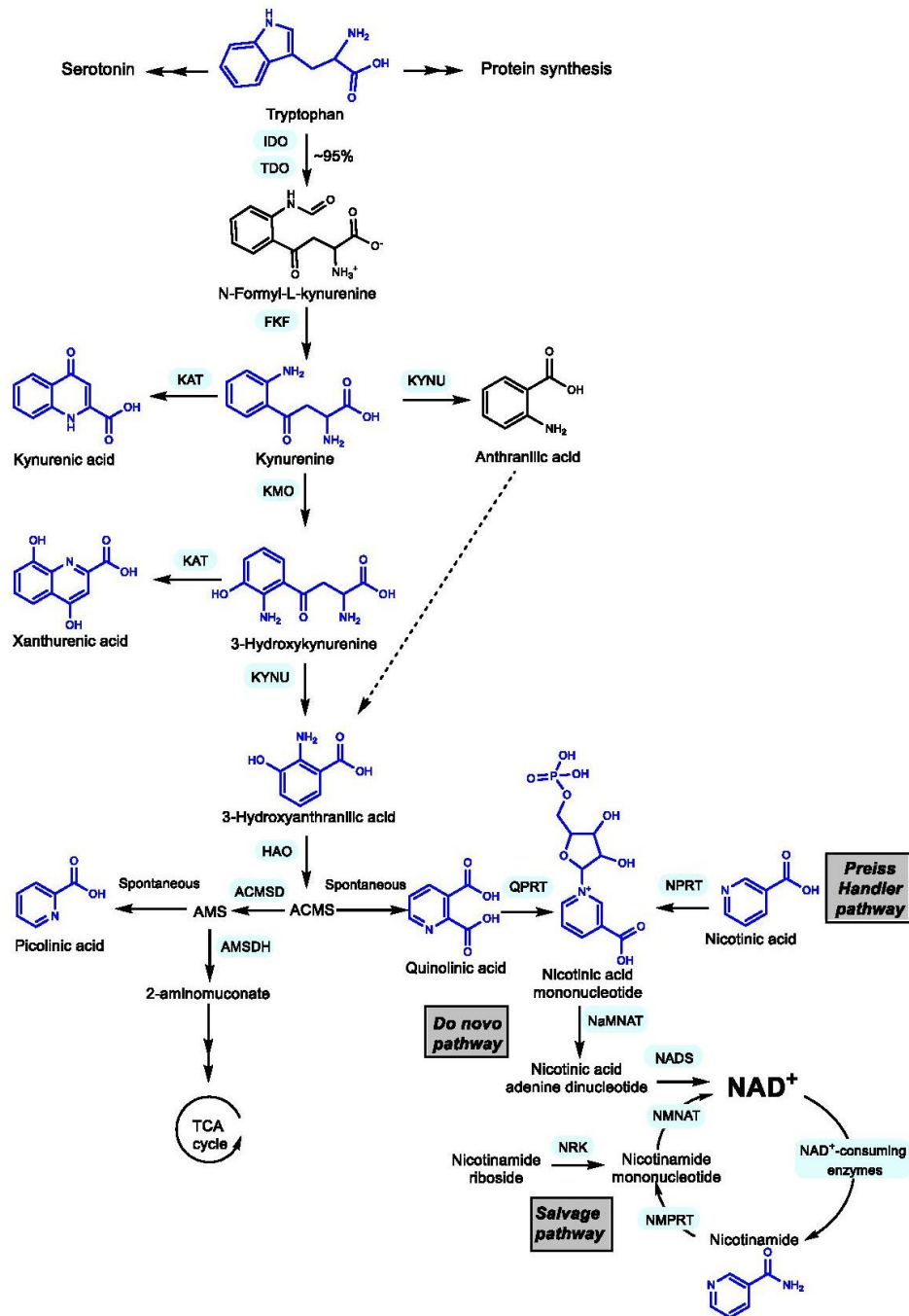
\* Corresponding author at: Laboratoire de Biochimie, Université de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France.  
E-mail address: [zahia.nadour@aphp.fr](mailto:zahia.nadour@aphp.fr) (Z. Nadour).

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.07.009>

Received 8 April 2022; Received in revised form 30 June 2022; Accepted 11 July 2022

Available online 20 July 2022

0009-8981/  2022 Elsevier B.V. All rights reserved.



**Fig. 1.** Tryptophan and its Kynurenine pathway branches. The blue colored compounds are the 11 studied metabolites. IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; TDO, tryptophan 2,3-dioxygenase; KAT, kynurenine aminotransferase; FKF, N-formyl kynurenine formamidase; KMO, kynurenine 3-monooxygenase; KYNU, kynurenase; HAO, 3-hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase; ACMSD, 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase; AMSDH, 2-aminomuconate semialdehyde dehydrogenase; QPRT, quinolinic acid phosphoribosyl transferase; NPRT, nicotinic acid phosphoribosyl transferase; NaMNAT, nicotinic acid mononucleotide adenyl transferase; NADS, NAD synthase; NMNAT, nicotinamide mononucleotide adenyl transferase; NMPRT, nicotinamide phosphoribosyl transferase; NRK, nicotinamide riboside kinase.

**Table 1**  
LC-MS/MS conditions for Trp, KP metabolites and their corresponding IS.

Compounds	Retention time (min)	Precursor Ion (m/z)	Products Ion (m/z)	Collision Energy (V)
Nicotinic acid mononucleotide	0.94	336.0	124.0*	-15
Picolinic acid	1.29	124.1	78.1*	-21
			51.1	-36
Nicotinic acid	1.44	124.1	80.1*	-23
			78.1	-14
Quinolinic acid	1.60	167.9	78.0*	-25
			124	-15
Nicotinamide	1.64	123.0	80.0*	-20
3-Hydroxy-kynurenine	2.21	225.0	208.1*	-9
			162.1	-20
Kynurenine	5.00	209.2	146.0*	-15
			192.1	-10
3-Hydroxy-anthranilic acid	5.80	154.0	136.1*	-15
			108.1	-22
Tryptophan	7.40	205.0	118.20*	-25
			188.2	-10
Xanthurenic acid	8.40	206.0	160.0*	-15
			188.0	-15
Kynurenic acid	8.65	190.1	116.0*	-32
			172.2	-12
Picolinic acid-D <sub>4</sub>	1.27	128.2	82.1*	-21
			54.1	-38
Nicotinic acid-D <sub>3</sub>	1.43	127.0	80.0*	-23
			83.0	-15
Quinolinic acid-D <sub>3</sub>	1.60	171.0	81.0*	-35
			127.0	-15
Nicotinamide-D <sub>4</sub>	1.64	127.0	84.0*	-24
			83.0	-15
3-Hydroxy-kynurenine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>15</sup> N	2.21	228.2	210.1*	-9
			163.1	-18
Kynurenine-D <sub>4</sub>	5.00	213.2	140.0*	-15
			196.0	-10
3-Hydroxy-anthranilic acid-D <sub>3</sub>	5.80	157.0	139.1*	-15
			111.1	-22
Tryptophan-D <sub>5</sub>	7.32	210.0	122.0*	-35
			192.0	-10
Xanthurenic acid-D <sub>4</sub>	8.40	208.4	164.0*	-35
			192.0	-15
Kynurenic acid-D <sub>5</sub>	8.65	195.2	121.2*	-15
			177.2	-10

\*Quantifying ion.

a variety of disorders including cardiovascular disease [6,7], osteoporosis [8], neurological and psychological disorders [9,10] and kidney diseases [11,12]. The KP is involved in the pathophysiology of Acute Kidney Injury (AKI) and chronic kidney disease (CKD) [11]. CKD is associated with low plasma Trp concentrations, whereas plasma Kyn, 3-HK, KA, XA, and QA concentrations are significantly elevated in this setting [13–15]. Accumulation of Trp metabolites may reflect a decline in kidney function [2,16]. Moreover, urinary Kyn and KA concentrations, as well as Kyn/Trp and QA/Trp ratios are associated with AKI, longer AKI duration, the need for renal replacement therapy and mortality [2,16]. Thus, the KP is a source of clinically relevant biomarkers of kidney injury, with potent diagnostic, prognostic and predictive properties.

A better understanding of the relationship between activity of the KP and the development of biomarkers of kidney injury for a routine use requires straightforward methods for quantifying metabolites in biological matrices such as plasma and urine [2,13–16]. In that regard, a number of LC-MS/MS methods have been developed to perform a simultaneous quantitative profiling of Trp and Kyn metabolites in different matrices under variable panels containing QA and/or Pic in plasma [17–24] and urine [17,24–26]. Recently, liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) has also been used for the same purpose [27]. However, to our knowledge, no LC-MS/MS method for assaying Trp and Kyn including QA, Pic, NA, and NAM has been developed simultaneously for both plasma and urine matrices.

Our aim was to develop and validate a LC-MS/MS method for simultaneous determination in plasma and urine of Trp and 10 key KP

metabolites: Kyn, KA, XA, 3-HK, 3-HANA, QA, NaMN, Pic, NA, and NAM. We applied the method in a cohort of cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass (CPB) to find novel biomarkers predictive of the occurrence of AKI.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

3-hydroxyanthranilic acid (3-HANA), 3-hydroxy-kynurenine (3-HK), kynurenic acid (KA), kynurenine (Kyn), nicotinic acid (NA), nicotinamide (NAM), nicotinic acid mononucleotide (NaMN), picolinic acid (Pic), quinolinic acid (QA), tryptophan (Trp) and xanthurenic acid (XA) were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). 3-hydroxyanthranilic acid-D<sub>3</sub> (3-HANA-D<sub>3</sub>), 3-hydroxy kynurenine-<sup>13</sup>C<sub>2</sub><sup>15</sup>N hydrochloride salt (3-HK-<sup>13</sup>C<sub>2</sub><sup>15</sup>N), kynurenic acid-D<sub>5</sub> (KA-D<sub>5</sub>), kynurenine-D<sub>4</sub> (Kyn-D<sub>4</sub>), nicotinic acid-D<sub>3</sub> (NA-D<sub>3</sub>), nicotinamide-D<sub>4</sub> (NAM-D<sub>4</sub>), picolinic acid-D<sub>4</sub> (Pic-D<sub>4</sub>), quinolinic acid-D<sub>3</sub> (QA-D<sub>3</sub>), tryptophan-D<sub>5</sub> (Trp-D<sub>5</sub>) and xanthurenic acid-D<sub>4</sub> (XA-D<sub>4</sub>) were provided by Toronto Research Chemicals (North York, Canada). Methanol (MeOH) and formic acid in mass spectrometry (MS) grade were purchased from Biosolve Chimie (Dieuze, France). Dimethylsulfoxide (DMSO) was purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). MS grade water was produced in a local station, Milli-Q® IQ 7003 Water Purification System (St Quentin Fallavier, France).



**Table 2**  
Group characteristics of the cohort of patients undergoing cardiopulmonary bypass.

Characteristics	All (n = 41)	AKI (n = 11)	No AKI (n = 30)	p value
Age (years)				
Mean $\pm$ SD	62 $\pm$ 15	64.5 $\pm$ 4.5	61.5 $\pm$ 3	0.5
(Range)	(20–85)	(58–79)	(20–85)	
Gender (n)				
Female/Male	16/25	5/6	10/20	0.31
BMI (kg/cm <sup>2</sup> )				
Mean $\pm$ SD	26 $\pm$ 5	27 $\pm$ 0.4	25 $\pm$ 1	0.31
Preoperative eGFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )				
Mean $\pm$ SD	74 $\pm$ 23	63 $\pm$ 6	78.5 $\pm$ 4	0.5
Delta serum creatinine* (mmol L <sup>-1</sup> )	8 $\pm$ 24	31 $\pm$ 31	-1 $\pm$ 15	0.0011

BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; CPB, cardiopulmonary bypass

AKI is defined according to the AKI-KDIGO definition

\*Serum creatinine\* variation between the baseline and the maximum value in the week after CPB (mmol L<sup>-1</sup>)

### 2.2. Stock and working solutions, calibration curves and quality control preparation

Solutions of reference standards or stable isotope labelled internal standards (IS) were prepared individually at 1 or 2 mg mL<sup>-1</sup> in MeOH, 0.1% formic acid, or DMSO, depending on their solubility, subdivided and stored at -20 °C until use to avoid freezing and thawing. Two stock solutions (SS) were then prepared in MeOH by pooling different reference standards as follow: 1) SS-01 which contains tryptophan (500  $\mu$ M), kynurenine (240  $\mu$ M), and kynurenic acid (260  $\mu$ M) and 2) SS-02 which contains NaMN (8  $\mu$ M), 3-HANA (16  $\mu$ M), NA (20  $\mu$ M), Pic (20  $\mu$ M), NAM (20  $\mu$ M), 3-HK (22  $\mu$ M), XA (25  $\mu$ M) and QA (600  $\mu$ M). The stock solutions were kept at -20 °C for two months at the most. Three working solutions (WS) were prepared instantly in 0.1 % formic acid by serial dilution of SS-01 or SS-02 at 1: 10, 1: 100, and 1: 1000. Three other WS at the same concentrations were prepared to produce quality controls. Similarly, IS solutions were pooled into a methanolic working solution (WS-IS) as follow: 3-HANA-D<sub>3</sub> (0.6  $\mu$ M), 3-HK-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-<sup>15</sup>N (0.5  $\mu$ M), KA-D<sub>5</sub> (10  $\mu$ M), Kyn-D<sub>4</sub> (19  $\mu$ M), NA-D<sub>3</sub> (2  $\mu$ M), NAM-D<sub>4</sub> (1  $\mu$ M), Pic-D<sub>4</sub> (1  $\mu$ M), QA-D<sub>3</sub> (1  $\mu$ M), Trp-D<sub>5</sub> (96  $\mu$ M) and XA-D<sub>4</sub> (0.5  $\mu$ M), and stored at -20 °C for two months. Two calibration curves were used, one to quantify Trp, Kyn and KA, and the second one for measuring of QA, 3-HK, XA, Pic, 3-HANA, NA, NAM and NaMN. Seven calibration standards (CS) and three quality controls (QC) were prepared by spiking a convenient volume of WS to a final volume of 50  $\mu$ L of 0.1 % formic acid and treated in the same way as the samples. The calibration range has been chosen according to the metabolites concentrations described in human plasma and urine [22,28–32].

### 2.3. Sample preparation

50  $\mu$ L of pure plasma or urine samples diluted at 1:1 in 0.1 % formic acid in water were spiked with 25  $\mu$ L of WS-IS and precipitated with 250  $\mu$ L of ice-cold methanol. The solution was then homogenized and centrifuged for 10 min at 13,000 g at 4 °C. 200  $\mu$ L of the supernatant was then evaporated under nitrogen stream and the dry residue was reconstituted with 80  $\mu$ L of 0.1 % formic acid in water. 60  $\mu$ L were directly transferred to a 96-well plate for LC-MS/MS analysis of QA, 3-HK, XA, Pic, 3-HANA, NA, NAM and NaMN. To analyze Trp, Kyn and KA, 10  $\mu$ L were transferred to a 96-wells plate containing 90  $\mu$ L of 0.1 % formic acid in water. The 96-wells plate was homogenized, centrifuged for 3 min at 4000 g at 4 °C then analyzed by LC-MS/MS. The injection volume was 3  $\mu$ L.

### 2.4. LC-MS/MS conditions

The chromatographic system consisted of two LC-30 AD pumps (Nexera X2), connected to a CTO 20A oven and a SIL-30 AC autosampler (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France). Chromatographic separation was performed on an ACQUITY UPLC HSS T3 C18 column (100  $\times$  2.1 mm i.d., 1.8  $\mu$ m particle size, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) preheated at 40 °C. The elution was achieved using a gradient of 0.1 % formic acid in water (A) and 0.1 % formic acid in MeOH (B) at a flow rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup>. The initial condition was 0 % B for 3 min, followed by a ramp up to 40 % B in 10 min, and a second ramp up to 90% B in 1 min, then held at 90 % B for 1 min, then ramped back to the initial condition and held for 2 min to allow column equilibration. The total run time was 17 min. Compounds were detected using an LCMS-8060 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France) operating in positive electrospray ionization (ESI) mode. Nitrogen was used for nebulization and argon as collision gas. The interface parameters and common settings were as follows: interface voltage: 4 kV; nebulizing gas flow: 3 L min<sup>-1</sup>; heating gas flow: 15 L min<sup>-1</sup>; drying gas flow: 5 L min<sup>-1</sup>; interface temperature: 400 °C; desolvation line (DL) temperature: 250 °C; heat block temperature: 400 °C; collision gas pressure 170 kPa. Compounds were detected in a multiple reaction monitoring (MRM) mode, with two *m/z* transitions for each analyte. The MRM transition which gave the most intense signal was chosen for quantification (Table 1).

Data acquisition and data post-processing were performed using LabSolutions™ LCMS Software, version 5.97 SP1 (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France).

### 2.5. Method validation

The method was validated according to the guidelines on bio-analytical method validation issued from the Food and Drug Administration (FDA) in 2018 [33] and the European Medicines Agency (EMA) in 2011 [34] for the following parameters : carry-over, linearity, lower limit of detection (LOD), lower limit of quantification (LLOQ), intra-day and inter-day accuracy and precision, matrix effect, dilution integrity and stability. Blood and urine samples initially taken for routine testing were used after written informed consent from volunteers for method validation. Whole blood was collected in tubes containing spray-coated lithium heparin (BD Vacutainer® PST™, Becton Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France), and plasma was separated by centrifugation at 2000 g at + 4 °C for 8 min and stored at - 80 °C until analysis. Urine samples were collected in BD V-Monovette® Urine (sarstedt Company, Nümbrecht, Germany), centrifuged at 2000 g at + 4 °C for 8 min and stored at - 80 °C until analysis.

#### 2.5.1. Carry-over

To investigate the carry-over, a triplicate of blank sample was analyzed immediately after the highest CS (Upper Limit Of Quantification, ULOQ) at three different days.

#### 2.5.2. Linearity

Six calibration curves were prepared with 7 CS and assayed over a six-day period. Quantification was achieved by plotting the peak area ratios of each analyte to the IS versus concentrations. For NaMN, NAM-D<sub>4</sub> was used as the reference IS. Calibration curves were plotted using a linear regression analysis with a 1/x weighing factor. Linearity was assumed when the measured concentration of each CS was within 15 % of the nominal value, except for the LLOQ for which a 20 % deviation was considered acceptable.

#### 2.5.3. Lower limit of detection (LOD)

LOD was determined by evaluating serial dilutions of the LLOQ. LOD was defined as the lowest concentration that can be reliably detected with a signal-to-noise (S/N) ratio of at least 3.

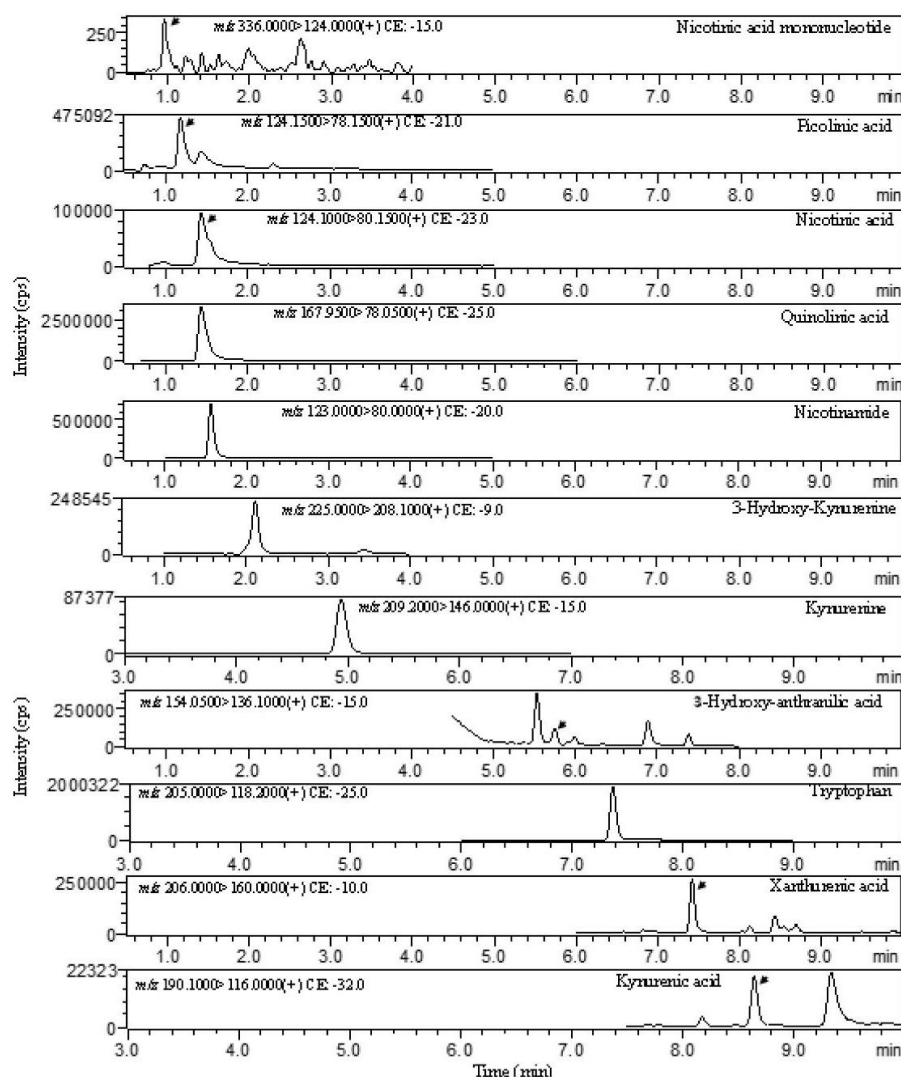


Fig. 2. Chromatograms of the 11 analytes of interest observed in a plasma specimen.

#### 2.5.4. Lower limit of quantification (LLOQ)

Sensitivity was assessed by measuring the LLOQ, which was defined as the lowest analyte concentration which can be quantified reliably with a signal-to noise (S/N) ratio of at least  $\geq 5$ . The bias and CV (%) should be  $\leq 20\%$ . For this purpose, 6 replicates of 0.1 % formic acid solutions spiked at the LLOQ were analyzed at three different days.

#### 2.5.5. Selectivity

According to FDA and EMA guidelines, the selectivity was assessed by calculating the ratios of the two product ions for each compound, the quantifier ion (Ref 1) and qualifier ion (Ref 2), and then by comparing these ratios obtained in real samples (plasma, urine) to those of reference standards. CV should be  $< 20\%$ .

#### 2.5.6. Accuracy and precision

The accuracy and precision were determined for the three QC levels. Six replicates of each QC were processed the same day for intra-day

assay. For inter-day assays, 6 replicates of each QC level were processed at three different days. Accuracy (bias) was expressed as the ratio of the difference between the theoretical concentration and the measured concentration to the theoretical concentration, while precision was measured as a coefficient of variation (CV %). A bias and CV within  $\pm 15\%$  were required.

#### 2.5.7. Matrix effect

Since Trp and the KP metabolites are endogenous compounds physiologically present in plasma and urine, the matrix effect (ME) and the extraction recovery (ER) were assessed using isotope labelled analogs (IS) which have similar physicochemical properties. For each IS, ME and ER were evaluated at two concentration levels low (L) and high (H). For each concentration level, 6 replicates were prepared in each matrix (plasma and urine) and 6 replicates in 0.1 % formic acid (blank).

Matrix effect was calculated as the ratio of the peak area of the internal standard spiked to the surrogate matrix (plasma or urine) before

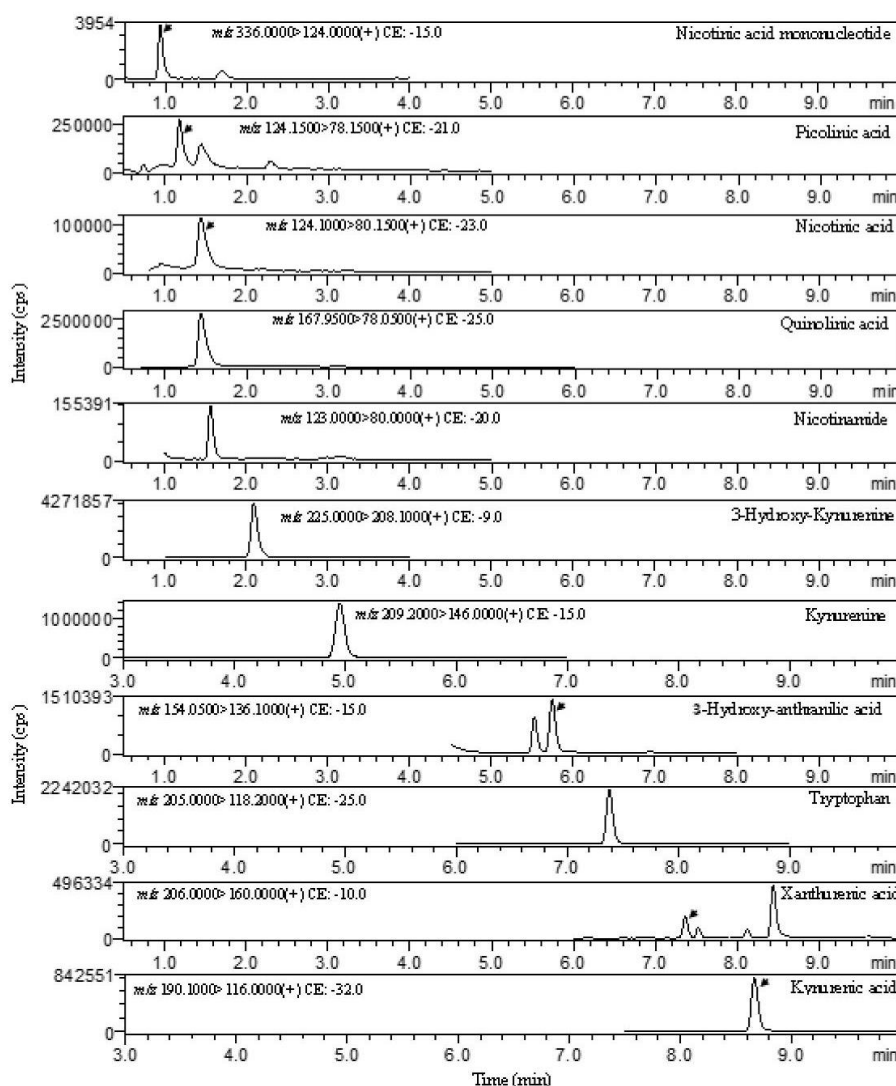


Fig. 3. Chromatograms of the 11 analytes of interest observed in a 2-fold diluted urine specimen.

protein-precipitation (PP) (A) to the corresponding peak area obtained with IS spiked in 0.1 % formic acid (B). The CV (%) computed from the 6 lots of each matrix and for each analyte should not be >15%, according to the EMA [34] guideline.

The extraction recovery was determined by dividing the peak area of the internal standard spiked to the surrogate matrix (plasma or urine) before PP (A) by the peak area of the internal standard added after PP (C).

$$\text{Matrix effect (\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

$$\text{Extraction recovery (\%)} = \frac{A}{C} \times 100$$

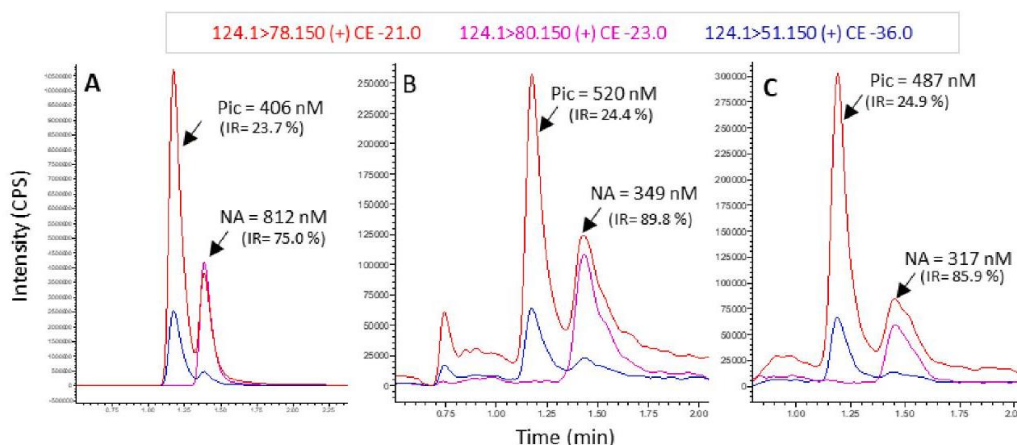
#### 2.5.8. Dilution integrity

Effect of dilution of samples was evaluated for each analyte by analyzing spiked matrices (plasma and urine) with an analyte concentration above the ULOQ and diluting the samples with 0.1 % formic acid.

Four dilutions were processed:  $\frac{1}{2}^{\text{nd}}$ ,  $\frac{1}{4}^{\text{th}}$ ,  $\frac{1}{6}^{\text{th}}$  and  $\frac{1}{16}^{\text{th}}$  for each analyte with 6 determinations per dilution factor. Accuracy and precision (CV) for dilution integrity have to be within 15 %.

#### 2.5.9. Stability

Postpreparative stability of the 11 studied compounds was evaluated by re-analyzing the three CQ levels, 6 plasma samples and 6 urine samples stored at +4 °C in the autosampler for two days (Supporting Information, Table S6). Stability of the samples in the freezer was evaluated by re-analyzing 3 urine and 3 plasma samples kept at +4 °C for five days, at -20 °C and -80 °C for 5 days, 3 weeks and 2 months and up to five freeze-thaw cycles. Three plasma and three urine samples were used for these stability tests (Supporting Information, Tables S7 and S8). When the new measured concentrations were similar to the ones obtained initially (bias  $\leq$  15 %), the analytes were considered stable.



**Fig. 4.** Extracted-ion chromatograms of Pic and NA showing the separation of the two isomers in 0.1 acid formic in water spiked with 406 nM Pic and 812 nM NA (A), unspiked human plasma (B) and unspiked human urine (C). NA: Nicotinic acid; Pic: Picolinic acid. The ion transitions used for quantification and identification are indicated on the top of the Figure. IR: ion ratio of Ref 2 vs Ref 1 (%). Pic: Ref 1 m/z = 124.1 > 78.1; Ref 2 m/z = 124.1 > 51.1; NA : Ref 1 m/z = 124.1 > 80.1 ; Ref 2 m/z = 124.1 > 78.1.

### 2.6. Application of the assay to clinical samples

To demonstrate the applicability of the validated method, a study was carried out on a cohort of patients who underwent cardiac surgery to test the performance of metabolites detection in urine in the prediction of AKI occurring in the week after CPB. From February 2017 to April 2017, 41 patients undergoing scheduled cardiac surgery with CPB were enrolled. For patients' characteristics, see Table 2. To ensure reliable results for the 11 metabolites evaluated in this analysis, the urine samples were frozen and thawed a maximum of twice.

Detailed information on the cohort is available in our previously published study [35]. AKI was diagnosed one week after CPB according to the KDIGO Clinical Practice Guideline for AKI criteria in measuring serum creatinine concentrations and urine output after the surgery. Urine samples (n = 123) were collected at baseline, 2 h and 24 h after the CPB in Corning 50 mL conical tubes and pretreated as described above within 4 h of collection. The urine samples used in this study have been part of a previously published analysis pertaining to develop AKI biomarkers [35,36]. Urinary concentrations of creatinine were determined by enzymatic method using AU 5800 analyzer (Beckman Coulter France S.A.S, Villepinte, France) in the accredited clinical chemistry laboratory of the Georges Pompidou European Hospital (Paris, France). Because a 24-hour urine collection was not possible, metabolites concentrations were expressed as a ratio to creatinine concentration in each sample to allow accurate quantification [37]. In order to detect a potential early biomarker of AKI, metabolite-to-parent ratios (MPR) were calculated and compared among the two subject groups (AKI vs noAKI).

### 2.7. Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.3.0 (GraphPad Software, Inc.). To examine differences in Trp and its related KP metabolites between the two patients' groups (AKI versus noAKI) at baseline, 2 h and 24 h after CBP, the Mann-Whitney *U* test was used, and the data are presented as median with the interquartile range. When the *p* value was <0.05, statistical significance was considered.

## 3. Results

### 3.1. Method validation

#### 3.1.1. Carry-over, selectivity, linearity and limits of detection and quantification

Chromatograms of the 11 compounds observed in plasma and urine samples are presented in Figs. 2 and 3, respectively.

At the retention time where the 11 compounds were expected to elute, the mean peak areas of blank samples measured after the highest CS (ULOQ) ranged from 1.8 to 16.9 % compared to the mean peak area of LLOQ samples. For IS, mean peak area of blank samples were all < 2 % of IS mean peak area (see Table S1). Therefore, contamination of blank samples from the highest CS (ULOQ) was not significant, indicating that no carry-over issue occurred during sample analysis. Critically, this method allowed chromatographic separation with satisfactory resolution of the two isomers Pic and NA in plasma and urine (Fig. 4).

As shown in Supplementary Table S2, the peak area ratios of the two product ion transitions in different plasma and urine samples of the AKI cohort were within 20% of the reference standards, which shows good selectivity of the developed method. For NAM and NaMN, as there was only one ion product, ion ratios were not determined. However, no interfering peaks were observed at NAM or NaMN retention times in both plasma or urine samples.

The method exhibited a good linearity for all analytes. The deviation from the theoretical value (bias) for each of the seven calibration standards (CS\_01-07) of each metabolite was within 15% ( $\pm 20\%$  for LLOQ) (see table S3). The correlation coefficients ( $R^2$ ) were higher than 0.995 for all the metabolites tested. Linear ranges and correlation coefficients are reported in Table 3.

According to analytes, LODs and LLOQs ranges were 1–60 nM, and 8–240 nM, respectively. Intra-day and inter-day bias and CV for the LLOQ were 0–16.7 %, and 2.6–14.9 % and all S/N ratios were well over 5 (Table 4 and Table S4).

**Table 3**  
Linearity settings and LOD of each metabolite.

Compounds	Linearity (nM)	R <sup>2</sup> ± SD	LOD (nM)	Plasma concentrations found in the literature (nM) (M ± SD)	Ref.
NaMN	8–1500	0.995 ± 0.004	1	10 ± 9 (n = 29)	[28]
Pic	40–4000	0.996 ± 0.002	2.5	92 ± 29 (n = 10)	[22]
NA	40–4000	0.996 ± 0.002	2.5	200 ± 100 (n = 29)	[28]
QA	240–120000	0.997 ± 0.002	60	405 ± 62 (n = 10)	[22]
NAM	20–4000	0.998 ± 0.002	2.5	98 ± 10 (n = 10)	[22]
3-HK	9–4500	0.997 ± 0.001	2.25	44 ± 9 (n = 10) 22 ± 11 (n = 100)	[22] [29]
Kyn	24–48000	0.998 ± 0.002	12	3000 ± 300 (n = 10)	[22]
3-HANA	16–3300	0.998 ± 0.001	8	1161 ± 320 (n = 100)	[29]
				942 ± 226 (n = 18)	[30]
				24 ± 7 (n = 100)	[29]
Trp	50–100000	0.998 ± 0.002	6	43700 ± 4300 (n = 10)	[22]
				54155 ± 8084 (n = 100)	[29]
				45038 ± 8084 (n = 18)	[30]
XA	10–5000	0.998 ± 0.001	2.5	150 ± 29 (n = 100)	[29]
				78 ± 18 (n = 18)	[30]
KA	26–52000	0.998 ± 0.001	16	56 ± 15 (n = 10)	[22]
				106 ± 38 (n = 100)	[29]
				35 ± 13 (n = 18)	[30]

NaMN, nicotinic acid mononucleotide ; Pic, picolinic acid; NA, nicotinic acid; QA, quinolinic acid; NAM, nicotinamide; 3-HK, 3-Hydroxy-kynurenine; Kyn, kynurenine; 3-HANA, 3-Hydroxy-anthranilic acid; Trp, tryptophan; XA, xanthurenic acid; KA, kynurenic acid

### 3.1.2. Accuracy and precision

Intra-day accuracy (bias) and precision (CV) investigated for the three QC ranged from 0.3 to 11.6 %, and from 1.8 to 10 %, respectively. Likewise, inter-day bias and CV ranges were 0.5–11.9 %, and 1.6–14.6 %, respectively (see Table 4).

### 3.1.3. Matrix effect

In plasma, ME ranged between 32.3 % and 119.9% and the extraction recovery was between 86.5 % and 108.2 %. In urine, ME and ER were found to be in the range 30.3 % to 106.0 % and 83.7 % to 113.6 %, respectively. All ME and ER were reproducible with CVs under 15 % in both matrices. Table 5 summarizes the results for each compound.

### 3.1.4. Dilution integrity

In plasma, the bias of the nominal concentration was between 0.8 % and 15.1 % for the four tested dilutions ( $1/2^{nd}$ ,  $1/4^{th}$ ,  $1/8^{th}$  and  $1/16^{th}$ ) and the precision ranged from 1.7 % to 9.1 %. Regarding urine, the bias ranged from 0.5 to 14.8 %, and the precision was between 1.0 % and 13.1 %.

The results are shown in Table S5.

### 3.1.5. Stability

All analytes were stable in the microplate retested two days following preparation and storage at 4 °C in the autosampler with bias < 15 % (see Table S6).

All compounds tested were stable in plasma and urine at 4 °C for 5 days, as well as in the freezer at – 20 °C and – 80 °C for 5 days, 20 days, and 2 months, respectively with nominal concentration ratio compared to the baseline (T0, room temperature) ranging between 85 and 115 % (Fig. 5).

In addition, most analytes were stable (bias < 15 %) over the five freeze/thaw (FT) cycles. However, after the 5th FT cycle, Pic plasma concentration decreased by 20.6 %, and after the 3rd FT cycle, XA plasma concentration decreased by 16.6 %, and 3-HANA was no longer stable in both plasma (46 % decrease) and urine (44 % decrease). Although the concentrations of 3-HANA in the plasma were close to the LLOQ (see Table S7), the results of its stability in the plasma are remarkably comparable to those obtained in the urine. Because the baseline concentrations of NaMN and NA in plasma samples were < LLOQ, their stability in this biological matrix was not evaluated.

### 3.1.6. Application of the method to a cohort of cardiac surgery patients

Urinary concentrations of Trp and KP key metabolites weighted to creatinine concentration ( $\mu\text{M mM}^{-1}$  Cr) and parent-to-metabolite ratios are summarized in Fig. 6 and Table S9.

Twenty-four hours after CPB, Trp concentrations were significantly lower in AKI patients (*i.e.* individuals who will have an AKI episode in the week following CPB) ( $1.65 \pm 1.79 \mu\text{M mM}^{-1}$  Cr) compared to noAKI patients ( $4.05 \pm 2.33 \mu\text{M mM}^{-1}$  Cr) ( $p < 0.01$ ). Furthermore, KA levels were significantly higher in AKI ( $1.25 \pm 0.59 \mu\text{M mM}^{-1}$  Cr) versus noAKI ( $0.74 \pm 0.39 \mu\text{M mM}^{-1}$  Cr) patients ( $p < 0.01$ ). Kyn concentrations were lower in AKI patients ( $0.38 \pm 0.42 \mu\text{M mM}^{-1}$  Cr) than in noAKI patients ( $0.62 \pm 0.36 \mu\text{M mM}^{-1}$  Cr) but the difference was not statistically significant ( $p = 0.0909$ ). Similarly, the urine Kyn/Trp ratio failed to achieve statistical significance ( $p = 0.3441$ ) (Table S9). The median ratios uKA/Trp, uKA/Kyn, uXA/3-HK and uQA/Trp between AKI and noAKI patients also increased significantly 24 h after CBP with  $p$ -values < 0.0001, 0.0008, 0.006, and 0.003 respectively, indicating an activation of the KP upon ischemic stress.

Pic urine median concentration was significantly lower 2 h after CBP in AKI patients ( $0.07 \pm 0.11 \mu\text{M mM}^{-1}$  Cr) versus noAKI ( $1.14 \pm 0.12 \mu\text{M mM}^{-1}$  Cr) patients ( $p < 0.05$ ), but 24 h after CBP, Pic levels in AKI patients ( $0.15 \pm 0.05 \mu\text{M mM}^{-1}$  Cr) were significantly higher compared to noAKI patients ( $0.09 \pm 0.04 \mu\text{M mM}^{-1}$  Cr) ( $p < 0.01$ ). The Pic/3-HANA ratio in AKI ( $1.21 \pm 1.36$ ) versus noAKI ( $0.76 \pm 1.02$ ) patients increased 24 h after CBP ( $p < 0.05$ ). In addition, the urine Pic/Trp ratio in AKI patients was significantly higher compared to noAKI patients ( $0.04 \pm 0.03$  versus  $0.02 \pm 0.02$ ,  $p = 0.005$ ).

## 4. Discussion

We successfully developed and validated a LC-MS/MS assay dedicated to the simultaneous quantification of Trp and 10 metabolites of KP in plasma and urine. This method is already implemented in the laboratory, and therefore ready to use in a routine setting. In a clinical perspective, our study opens important opportunities for the improvement of the care of individuals with a renal disease. The quantification of KP metabolites will allow stratifying the risk of evolution of the kidney disease. Furthermore, targeting KP is a promising therapeutic opportunity that could slow the progression of kidney diseases.

Trp and its metabolites are endogenous and physiological metabolites present in both urine and plasma matrices. In accordance with EMA, the matrix effect was evaluated using IS analogs, as they have similar physicochemical properties [38]. The matrix effect and extraction recovery were determined for both plasma and urine matrices. 50 %

**Table 4**  
Lower limit of quantification (LLOQ), intra-day and inter-day accuracy and precision of the method.

Compound	Level concentration	Theoretical concentration (nM)	Intra-day (n = 6)		Inter-day (n = 18)	
			BIAS (%)	CV (%)	BIAS (%)	CV (%)
NaMN	LLOQ	8	13.8	5.3	16.7	5.7
	QC (L)	9	-2.4	4.4	4.0	14.6
	QC (M)	90	-11.6	5.5	-8.0	13.2
	QC (H)	900	-7.0	5.4	-3.2	11.8
Pic	LLOQ	40	-8.7	14.2	-6.9	4.5
	QC (L)	60	-7.9	9.1	-2.1	12.7
	QC (M)	240	10.2	5.4	11.1	1.6
	QC (H)	2400	2.4	9.0	6.1	8.5
NA	LLOQ	40	-0.9	8.4	0	2.6
	QC (L)	60	-0.5	2.5	1.6	6.2
	QC (M)	240	-0.3	3.6	6.0	14.5
	QC (H)	2400	-1.3	5.6	5.3	14.4
QA	LLOQ	240	2.6	6.2	6.8	10.2
	QC (L)	360	6.0	5.3	9.0	6.2
	QC (M)	7200	6.1	1.8	8.9	7.2
	QC (H)	72,000	2.5	9.9	7.0	10.6
NAM	LLOQ	20	0.3	9	2.8	6.5
	QC (L)	24	-4.6	6.9	-1.3	7.3
	QC (M)	240	-3.1	2.8	3.5	14.3
	QC (H)	2400	-3.1	4.3	0.7	11.8
3-HK	LLOQ	9	-7.6	9	-4.3	7.9
	QC (L)	13.5	-3.9	8.4	-0.7	6.9
	QC (M)	270	-5.1	5.7	1.8	14.6
	QC (H)	2700	0.5	8.3	4.6	9.3
Kyn	LLOQ	24	0.9	13.4	2.1	3.6
	QC (L)	48	-2.9	10.0	3.0	12.9
	QC (M)	1920	-6.9	2.8	-1.9	13.7
	QC (H)	38,400	-8.0	4.6	-5.0	9.9
3-HANA	LLOQ	16	-3.5	13.7	2.1	14.4
	QC (L)	19.8	3.5	6.6	6.5	6.3
	QC (M)	198	-1.4	5.9	2.3	12.8
	QC (H)	1980	5.9	7.3	7.8	5.5
Trp	LLOQ	50	-0.6	8.1	5.2	12.2
	QC (L)	100	-5.6	6.1	-2.5	11.5
	QC (M)	4000	-3.9	5.1	-2.5	3.2
	QC (H)	80,000	-10.1	3.9	-5.7	11.0
XA	LLOQ	10	-5	11.3	-1.5	10
	QC (L)	15	10.9	3.3	11.9	2.0
	QC (M)	300	8.3	1.9	10.9	5.9
	QC (H)	3000	1.3	9.1	6.8	12.4
KA	LLOQ	26	-0.1	9.0	3.40	12.8
	QC (L)	52	5.9	7.5	9.1	8.4
	QC (M)	2080	5.4	3.3	3.3	5.5
	QC (H)	41,600	3.7	8.5	0.1	10.2

NaMN, nicotinic acid mononucleotide; Pic, picolinic acid; NA, nicotinic acid; QA, quinolinic acid; NAM, nicotinamide; 3-HK, 3-Hydroxy-kynurenine; Kyn, kynurenine; 3-HANA, 3-Hydroxy-anthranilic acid; Trp, tryptophan; XA, xanthurenic acid; KA, kynurenic acid.

of the compounds including Trp, Kyn, KA, XA and 3-HANA had a ME ranging between 82 and 120 % in plasma and between 69 and 106 % in urine (Table 5). These results are consistent with those previously described in serum (111–121%), plasma (86–117%) and urine (84 to 113 %) using a triple quadrupole [38,39]. Recently, a LC-HRMS method provided similar ME results for mouse serum (58 to 115 %) and urine (99 to 104 %) [27]. For the 5 remaining compounds, signal extinction was observed in both plasma and urine matrices, with a ME ranging from 30 to 80 %. Similar results have been reported for HK, PA, and QA in serum and urine (5 to 65 %).

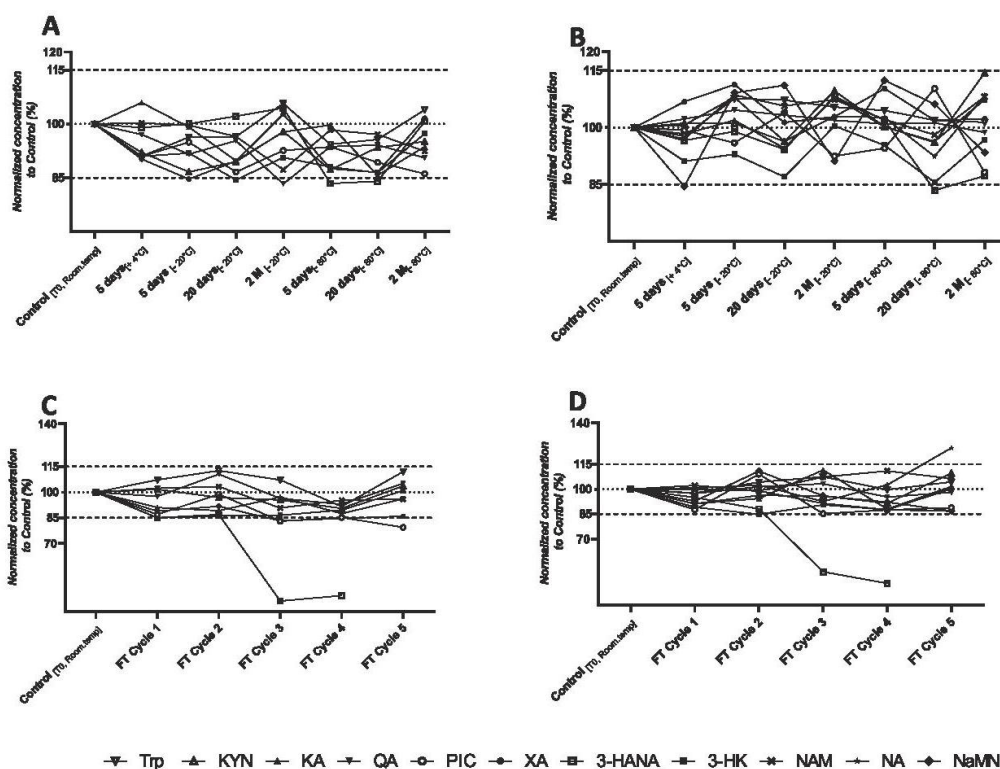
The signal extinction is a critical issue in quantitative ESI-MS [40]. This phenomenon is usually caused by the presence of non-volatile compounds such as salts and lipids in biological matrices, which prevents the ionization of the target analyte and the formation of the spray. To overcome this issue, sample purification processes by liquid-liquid extraction for example are required. However, these elaborate procedures are time-consuming and can cause poor recovery [40]. For all these reasons and to develop a convenient method for high throughput analysis, we performed a simple and rapid sample preparation process based solely on protein precipitation. In addition, the ME problems were often overcome by using isotope labeled internal standards, except for NaMN

for which an IS analog was unavailable. However, in the case where the matrix effect is strong, its correction by the internal standards stable isotope label may be insufficient. For this reason, evaluation by other methods such as parallelism and/or recovery test using spiked sample is recommended [33]. In our study, the extraction recovery ranging between 84 % and 114 % was found good for all the analytes in both plasma and urine spiked samples (see Table 5). Another way to assess the matrix effect is to test the dilution accuracy, also so called 'parallelism', by diluting different lots of plasma and urine samples with water [33]. As Table S5 indicates, all the analytes showed a good dilution accuracy (bias < 15%) of six spiked lots of plasma or urine, when diluted two-, four-, eight- and sixteen-times with water, which also supports the idea that there are no significant matrix effects for this assay. Furthermore, the dilution integrity test revealed that the majority of metabolites after higher dilutions had more accurate quantification (Table S5). In the present study, to minimize matrix effects plasma or urine samples could be diluted before sample preparation.

As Trp and its metabolites are endogenous, calibration standards and quality controls cannot be prepared directly from plasma or urine. The choice of a calibrator is challenging in the development and validation of a quantitative method for measuring an endogenous molecule. [41] In

**Table 5**  
Matrix effect (ME) and extraction recovery (ER) for each molecule at low and high concentration in plasma and urine.

Internal standards (IS)	Level	Concentration (nM)	Plasma				Urine			
			Matrix effect		Extraction recovery		Matrix effect		Extraction recovery	
			Mean (%)	CV (%)	Mean(%)	CV (%)	Mean (%)	CV (%)	Mean (%)	CV (%)
Picolinic acid-D <sub>4</sub>	L	39	43.2	14.0	108.2	12.5	53.7	9.8	107.0	10.7
	H	390	32.3	8.2	86.5	8.8	33.8	10.9	93.4	8.2
Nicotinic acid-D <sub>3</sub>	L	396	40.8	10.9	99.3	12.8	30.3	14.0	100.5	9.1
	H	792	46.6	5.3	91.2	8.7	35.2	10.2	99.0	9.5
Quinolinic acid-D <sub>3</sub>	L	2939	43.8	4.3	88.5	7.3	34.3	10.6	102.8	6.4
	H	5878	45.3	3.4	87.4	2.7	38.2	8.4	99.3	6.9
Nicotinamide-D <sub>4</sub>	L	198	47.7	5.8	98.6	11.1	34.5	13.9	95.2	11.4
	H	396	57.7	5.2	91.5	7.9	42.0	11.3	98.0	8.5
3-Hydroxy- kynurenine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>15</sup> N	L	110	66.1	10.1	97.6	8.9	80.1	14.2	103.6	3.1
	H	220	57.4	10.3	88.2	9.9	71.2	15.0	96.9	8.7
Kynurenine-D <sub>4</sub>	L	4710	82.5	3.1	98.3	5.6	91.2	11.5	105.3	12.2
	H	9420	87.2	6.7	92.8	6.6	85.7	9.8	83.7	8.8
3-Hydroxy-anthranilic acid-D <sub>3</sub>	L	160	119.9	8.2	107.5	11.9	106.0	13.8	113.0	7.5
	H	320	82.8	13.7	87.7	12.0	81.4	11.7	94.4	10.8
Tryptophan-D <sub>5</sub>	L	23,894	98.5	5.2	103.9	6.1	92.9	7.4	102.0	6.8
	H	47,788	96.8	4.6	102.0	6.1	96.7	8.4	98.4	12.0
Xanthurenic acid-D <sub>4</sub>	L	24	87.5	12.2	104.1	12.4	93.3	13.8	111.4	12.8
	H	120	81.9	6.8	113.0	4.6	69.1	11.6	113.0	13.4
Kynurenic acid-D <sub>5</sub>	L	515	89.4	5.7	101.9	8.4	94.3	4.3	113.6	6.4
	H	2575	87.5	4.5	95.8	4.5	79.4	6.1	95.2	4.3



**Fig. 5.** Stability profile of tryptophan and ten KP key metabolites in different storage conditions and up to five freeze-thaw cycles in plasma (A and C) and urine (B and D). M: month; FT: freeze-thaw.

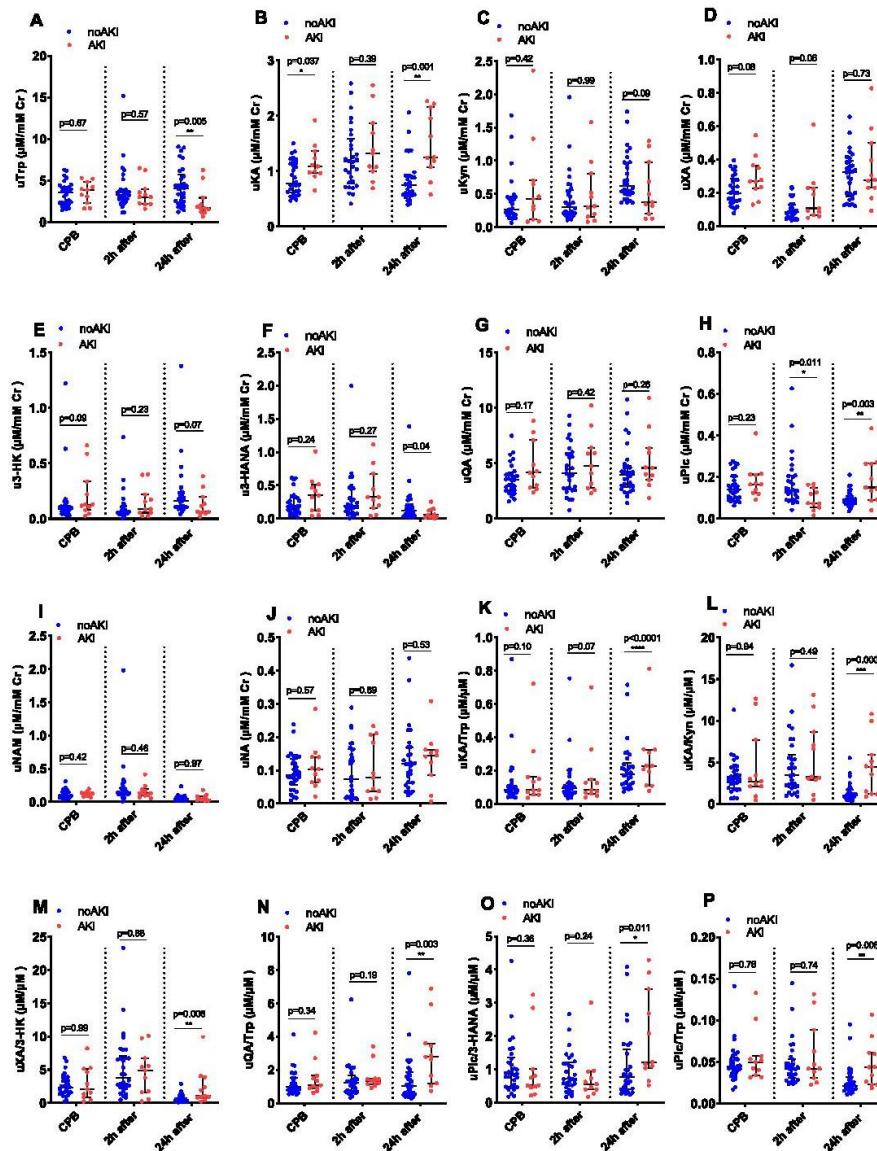


Fig. 6. Distribution of urinary metabolites levels measured in urine of AKI patients. (A-P) Distribution of urinary metabolites levels measured in urine at baseline (CPB), 2 hours and 24 hours after CPB, in no AKI (blue) and AKI (red) patients according to the occurrence of AKI during the week after CPB (n = 41 patients, 11 of whom subsequently developed AKI and 30 without AKI). Data displayed as median ± interquartile range and compared by Mann-Whitney U test. \*P < .05; \*\*P < .01; \*\*\*P < .001; \*\*\*\*P < .0001, CPB = during cardiopulmonary bypass.

order to test the effects of surrogate calibrators on the quantification of endogenous substances (Kyn and Trp) with mass spectrometry, calibrators in H<sub>2</sub>O, PBS, 1 % BSA or charcoal-stripped human plasma have been prepared, and ran under the same conditions.[42] According to Huang et al., the different calibrators had no significant effect on the measured values of Kyn and Trp. The strategy of using water as a blank matrix is largely applied for KP metabolites quantification in plasma, cerebrospinal fluid (CSF) and urine [21–23,27,43]. We choose this approach with the same calibration standards and quality controls for both matrices, plasma and urine.

The concentration of the analytes determined in plasma and urine can sometimes exceed the linearity limit of our developed method, especially for urinary QA. In this situation, sample should be diluted. Therefore, we investigated whether the dilution had a major impact. Dilution integrity for the 11 compounds in plasma and urine was observed after 1/2<sup>nd</sup>, 1/4<sup>th</sup>, 1/8<sup>th</sup> and 1/16<sup>th</sup> dilution. At each of the four dilutions, the accuracy and precision for the analytes were acceptable. During this experiment, we noticed that the bias was generally less important with higher dilutions. This could be explained by the fact that the matrix effect is attenuated when the sample is diluted, allowing to



reach better accuracy.

Trepci *et al.* [22] showed that Trp, Kyn, KA, Pic, NAM, and 3-HK were stable in plasma when left at room temperature for up to 24 h, whereas XA and 3-HANA in plasma should not be kept at room temperature more than 2–3 h. In our study, the analytes were stable in the refrigerator (+4 °C) for 5 days and in the freezer (-20 °C and -80 °C) for up to two months (CV < 15%), which is in line with previous results.[38] In both plasma and urine, freeze-thaw cycles had no effect over 5 cycles for NaMN, QA, NAM, 3-HK, Kyn, Trp and KA (NaMN and Na stability were not evaluated in plasma). Pic and NA were less stable after 4 freeze-thaw cycles. However, for 3-HANA and XA, our results suggest that plasma and urine should not be thawed more than twice. Previous studies derived same conclusion for plasma XA after four freeze-thaw cycles albeit 3-HANA (n = 6) was still stable after four freeze-thaw cycles and we suggest that further evaluation of its stability might be needed [22]. All analytes kept 2 days at +4 °C in the autosampler after preparation showed a good postpreparative stability in both plasma and urine (CV < 15%). In practice, this allows for the preparation of large batches.

Trp and 10 KP metabolites were successfully detected in all plasma samples used for stability study (Tables S6 and S7). In addition, with regards to the intervals concentrations given in the literature found in healthy adults [22,28–30] (Table 3), our approach is sensitive enough to quantify the metabolites of interest in plasma. NA and 3-HANA, however, were detected but seldom quantified in plasma. Additionally, NaMN was rarely detected (LOD = 1 nM) in the tested plasma samples. Based on plasma NaMN levels published in healthy adults (10 ± 9 nM) [28], the LLOQ of NaMN (8 nM) in our method seems not enough to allow measurement of low NaMN plasma concentrations in healthy subjects. In urine, all metabolites (except NaMN), were quantified in the samples used for the stability study (Tables S6 and S8) and in the HEGP CPB cohort (Fig. 6). To our knowledge, NaMN has never been examined in urine, and no data on its concentrations in urine are available. Using the current method, we aimed to measure NaMN to calculate NaMN/QA ratio, which might reflect the activity of the QPRT enzyme. NaMN was particularly challenging to quantify: matrix effect and stability was not evaluated, and the sensitivity of the method was not enough to quantify NaMN in plasma and urine. With further improvements, this method could however be used to determine NaMN in the future. The LC-MS/MS method allowed to quantify successively Trp and its related KP metabolites in urine samples from 41 patients at baseline, 2 h and 24 h after CBP. Our results revealed that the urine QA/Trp ratio, which can reflect the relative enzyme activity of QPRT, measured 24 h after CPB, was significantly higher in patients who will develop an AKI in the week following CPB compared to that in noAKI patients. This result is in accordance with our previous findings using another LC-MS/MS approach [35], which highlight the robustness of the current developed method. In addition, elevation of urine QA/Trp ratio in AKI patients agreed with the study described by Mehr *et al.* [2] who proposed that elevated urinary QA/Trp ratio is an indicator of reduced QPRT. Remarkably, the urinary Pic/3-HANA and Pic/Trp ratios were significantly higher at 24 h after CBP in AKI patients compared to noAKI patients. This result could reflect an elevated activity of ACMSD enzyme and could be used as a further indirect biomarker in AKI. A decrease of Pic/Trp ratio has been recently described in lupus nephritis (LN) and proposed as a urinary biomarker for LN diagnostic classification [44]. However, to our knowledge, there is no data on Pic levels in AKI patients, which opens existing research avenues. Other interesting KP metabolites results were identified in this study. 24 h after CBP, the XA/3-HK, KA/Kyn and KA/Trp ratios were increased in AKI patients compared to noAKI patients. Similar results were previously published [2,16,35]. For example, among critically ill patients with AKI, urinary Trp and Kyn concentrations and Kyn/Trp ratio were significantly lower in the group with late-/non recovery kidney function, together with high KA urinary levels [16]. Moreover, KA is associated with a higher AKI severity, longer AKI duration, the need for renal replacement therapy and 30-day mortality [16].

Besides the field of nephrology, monitoring the Trp-based metabolic pathway, especially the production of Kyn and its derivatives, is an issue of great interest in the field of immuno-oncology. Indeed, based on its effects on both tumor cell intrinsic malignant properties as well as anti-tumor immune responses, Trp catabolism has emerged as an important metabolic regulator of cancer progression. Reflecting the activity of IDO1/2 and TDO1, the production of Trp derived metabolites in body fluids could help stratifying patients for IDO1 inhibitors treatment with immune checkpoint inhibitors [45]. In line with this, the development of the panel assay in the plasma will also be carried out. Our preliminary results are very encouraging and illustrate the technical feasibility of monitoring this panel of metabolites in blood.

## 5. Conclusion

We developed and validated a reliable LC-MS/MS method for simultaneous determination of Trp and 10 metabolites of the KP in plasma and urine. This method has been successfully applied for prognostic purposes in patients after cardiac surgery, and to measure parent-to-metabolite ratios. Pic/Trp ratio appears to be a potential biomarker of AKI. Our LC-MS/MS method could be applied to both plasma and urinary profiling of KP activity in kidney diseases but also in medical conditions associated with KP deregulation.

### CRediT authorship contribution statement

**Zahia Nadour:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing – review & editing. **Christophe Simian:** Formal analysis. **Olivier Laprévotte:** Supervision. **Marie-Anne Lorient:** Supervision. **Islam Amine Larabi:** Writing – review & editing. **Nicolas Pallet:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing – review & editing.

### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.07.009>.

### References

- [1] A.-A.-B. Badawy, Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: regulatory and functional aspects, *Int. J. Tryptophan Res.* 10 (2017) 1–20, <https://doi.org/10.1177/1178646917691938>.
- [2] A. Poyan Mehr, M.T. Tran, K.M. Raito, D.E. Leaf, V. Washco, J. Messmer, A. Lerner, A. Rher, S.H. Kim, C.C. Khoury, S.J. Herzig, M.E. Trovato, N. Simon-Tillaux, M. R. Lynch, R.I. Thadhani, C.B. Qish, K.R. Khabbaz, E.P. Rhee, S.S. Waikar, A. H. Berg, S.M. Parikh, De novo NAD+ biosynthetic impairment in acute kidney injury in humans, *Nat. Med.* 24 (2018) 1351–1359, <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0138-z>.
- [3] E. Katsyuba, A. Mottis, M. Zietak, F. De Franco, V. van der Velpen, K. Gariani, D. Ryu, L. Cialabini, O. Matilainen, P. Liscio, M. Giacchè, N. Stokar-Regenscheit, D. Legouis, S. de Seigneux, J. Ivanisevic, N. Raffielli, K. Schoonjans, R. Pellicciari, J. Auwerx, De novo NAD+ synthesis enhances mitochondrial function and improves health, *Nature* 563 (2018) 354–359, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0645-6>.
- [4] K. Walczak, A. Wnorowski, W.A. Turski, T. Plech, Kynurenine acid and cancer: facts and controversies, *Cell. Mol. Life Sci.* 77 (2020) 1531–1550, <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03332-w>.
- [5] M. Ala, The footprint of kynurenine pathway in every cancer: a new target for chemotherapy, *Eur. J. Pharmacol.* 896 (2021) 173921, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173921>.
- [6] K.A. Polyzos, D.F.J. Ketelhuth, The role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in cardiovascular disease. An emerging field, *Hämostasologie* 35 (2015) 128–136, <https://doi.org/10.5482/HAMO-14-10-0052>.

- [7] P. Song, T. Ramprasath, H. Wang, M.-H. Zou, Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases, *Cell. Mol. Life Sci.* 74 (2017) 2899–2916, <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2504-2>.
- [8] A. Al Saedi, S. Sharma, M.A. Summers, K. Nurgali, G. Duque, The multiple faces of tryptophan in bone biology, *Exp. Gerontol.* 129 (2020), 110778, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110778>.
- [9] K. Ciapała, J. Mika, E. Rojewska, The kynurenine pathway as a potential target for neuropathic pain therapy design: from basic research to clinical perspectives, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 11055, <https://doi.org/10.3390/ijms222011055>.
- [10] W. Marx, A.J. McGuinness, T. Rocks, A. Ruusunen, J. Cleminson, A.J. Walker, S. Gomes-da-Costa, M. Lane, M. Sanches, A.P. Diaz, P.-T. Tseng, P.-Y. Lin, M. Berk, G. Clarke, A. O'Neil, F. Jacka, B. Stubbs, A.F. Carvalho, J. Quevedo, J.C. Soares, B. S. Fernandes, The kynurenine pathway in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia: a meta-analysis of 101 studies, *Mol. Psychiatry* 26 (2021) 4158–4178, <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00951-9>.
- [11] I. Zakrocka, W. Zaluska, Kynurenine pathway in kidney diseases, *Pharmacol. Rep.* 74 (2022) 27–39, <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00329-w>.
- [12] H.N. Wee, J.-J. Liu, J. Ching, J.-P. Kovalik, S.C. Lim, The kynurenine pathway in acute kidney injury and chronic kidney disease, *Am. J. Nephrol.* 52 (10–11) (2021) 771–787.
- [13] K. Pawlak, T. Domaniewski, M. Mysliwiec, D. Pawlak, The kynurenines are associated with oxidative stress, inflammation and the prevalence of cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease, *Atherosclerosis* 204 (2009) 309–314, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.08.014>.
- [14] V.C. Konje, T.M. Rajendran, K. Bellovich, C.A. Gadegebeku, D.S. Gipson, F. Afshinia, A.V. Mathew, the Michigan kidney translational core CPROBE investigator group, tryptophan levels associate with incident cardiovascular disease in chronic kidney disease, *Clin. Kidney J.* 14 (2021) 1097–1105, <https://doi.org/10.1093/ckj/sfaa031>.
- [15] S. Debnath, C. Velagapudi, L. Redus, F. Thameem, B. Kasinath, C.E. Hura, C. Locenzo, H.E. Abboud, J.C. O'Connor, Tryptophan metabolism in patients with chronic kidney disease secondary to Type 2 diabetes: relationship to inflammatory markers, *Int. J. Tryptophan Res.* 10 (2017), <https://doi.org/10.1177/1178646917694600>.
- [16] F. Aregger, D.E. Uehlinger, G. Fusch, A. Bahonjic, R. Pschowski, M. Walter, J. C. Scheffold, Increased urinary excretion of kynurenine acid is associated with non-recovery from acute kidney injury in critically ill patients, *BMC Nephrol.* 19 (2018) 44, <https://doi.org/10.1186/s12882-018-0841-5>.
- [17] W. Zhu, A.P. Stevens, K. Dettmer, E. Gottfried, S. Hoves, M. Kreutz, E. Holler, A. B. Canelas, I. Kerna, P.J. Oefner, Quantitative profiling of tryptophan metabolites in serum, urine, and cell culture supernatants by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 3249–3261, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5436-y>.
- [18] M.J. Schwarz, G.J. Guillemain, S.J. Teipel, K. Buerger, H. Hampel, Increased 3-Hydroxykynurenine serum concentrations differentiate Alzheimer's disease patients from controls, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 263 (2013) 345–352, <https://doi.org/10.1007/s00406-012-0384-x>.
- [19] K. Amhard, F. Pittet, B. Sperner-Unterwiesing, D. Fuchs, T. Kozal, H. Oberacher, A validated liquid chromatography–high resolution–tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitation of tryptophan, kynurenine, kynurenic acid, and quinolinic acid in human plasma, *Electrophoresis* 39 (2018) 1171–1180, <https://doi.org/10.1002/elps.201700400>.
- [20] M. Möller, J.L. Du Preez, B.H. Harvey, Development and validation of a single analytical method for the determination of tryptophan, and its kynurenine metabolites in rat plasma, *J. Chromatogr. B* 898 (2012) 121–129, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.04.030>.
- [21] S. Karakawa, R. Nishimoto, M. Harada, N. Arashida, A. Nakayama, Simultaneous analysis of tryptophan and its metabolites in human plasma using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Chromatography*, 40 (2019) 127–133, <https://doi.org/10.15583/jpchrom.2019.010>.
- [22] A. Trepci, S. Imbeault, V.L. Wyckelsma, H. Westerblad, S. Hermansson, D. C. Andersson, F. Piehl, T. Venckunas, M. Brazaitis, S. Kamandulis, L. Brundin, S. Erhardt, L. Schwidler, Quantification of plasma kynurenine metabolites following one bout of sprint interval exercise, *Int. J. Tryptophan Res.* 13 (2020) 1–12, <https://doi.org/10.1177/1178646920978241>.
- [23] R. Fuertig, A. Ceci, S.M. Camus, E. Bezard, A.H. Luippold, B. Hengerer, LC-MS/MS-based quantification of kynurenine metabolites, tryptophan, monoamines and neopterin in plasma, cerebrospinal fluid and brain, *Bioanalysis* 8 (2016) 1903–1917, <https://doi.org/10.4155/bio-2016-0111>.
- [24] I. Sadok, A. Gannian, M.M. Staniszevska, Chromatographic analysis of tryptophan metabolites, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 3020–3045, <https://doi.org/10.1002/jssc.201700184>.
- [25] S. Chen, C. Burton, A. Kaczmarek, H. Shi, Y. Ma, Simultaneous determination of urinary quinolinic acid, gentisic acid, 4-hydroxybenzoate, and  $\alpha$ -ketoglutarate by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 7 (2015) 6572–6578, <https://doi.org/10.1039/C5AY01643F>.
- [26] J.S. Oh, H.S. Seo, K.H. Kim, H. Pyo, B.C. Chung, J. Lee, Urinary profiling of tryptophan and its related metabolites in patients with metabolic syndrome by liquid chromatography–electrospray ionization/mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 5501–5512, <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0486-4>.
- [27] A. Lefèvre, S. Mavel, L. Nadal-Desbarats, L. Galineau, S. Attucci, D. Dufour, H. Sokol, P. Emond, Validation of a global quantitative analysis methodology of tryptophan metabolites in mice using LC-MS, *Talanta* 195 (2019) 593–598, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.094>.
- [28] J. Clement, M. Wong, A. Poljak, P. Sachdev, N. Braidy, The plasma NAD<sup>+</sup> metabolome is dysregulated in “Normal” aging, *Rejuvenation Res.* 22 (2019) 121–130, <https://doi.org/10.1089/rej.2018.2077>.
- [29] Y. Chen, H. Chen, G. Shi, M. Yang, F. Zheng, Z. Zheng, S. Zhang, S. Zhong, Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry quantitative profiling of tryptophan metabolites in human plasma and its application to clinical study, *J. Chromatogr. B* 1128 (2019), 121745, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121745>.
- [30] Q. Tong, J. Song, G. Yang, L. Fan, W. Xiong, J. Fang, Simultaneous determination of tryptophan, kynurenine, kynurenic acid, xanthurenic acid and 5-hydroxytryptamine in human plasma by LC-MS/MS and its application to acute myocardial infarction monitoring, *Biomed. Chromatogr.* 32 (4) (2018) e4156.
- [31] C. Hervé, P. Beyne, H. Jamault, E. Delacoux, Determination of tryptophan and its kynurenine pathway metabolites in human serum by high-performance liquid chromatography with simultaneous ultraviolet and fluorimetric detection, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 675 (1996) 157–161, [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00341-x](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00341-x).
- [32] S. Bonatrua, F. Aziat, R. Mandal, A.C. Guo, M.R. Wilson, C. Knox, T.C. Bjorn Dahl, R. Krishnamurthy, F. Saleem, P. Liu, Z.T. Dame, J. Podzer, J. Huynh, F.S. Yallou, N. Psychogios, E. Dong, R. Bogumil, C. Roehring, D.S. Wishart, P. Dzeja, The human urine metabolome, *PLoS ONE* 8 (9) (2013) e73076.
- [33] U.S. Food and Drug Administration, Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry, <https://www.fda.gov/media/70858/download>, 2018 (accessed January 28, 2022).
- [34] European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bio-analytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bio-analytical-method-validation_en.pdf), 2011 (accessed January 28, 2022).
- [35] Y. Bignon, A. Rinaldi, Z. Nadour, V. Poindessous, I. Nemazany, O. Lenoir, B. Fohlen, P. Weill-Raynal, A. Hertig, A. Karras, P. Galichon, M. Naesens, D. Anglicheau, P.E. Coppé, N. Pallet, Cell stress response impairs de novo NAD<sup>+</sup> biosynthesis in the kidney, *JCI Insight* 7 (2022) e153019.
- [36] B. Fohlen, Q. Tavernier, T.-M. Huynh, C. Caradenc, D. Le Corre, G. Bertho, B. Cholley, N. Pallet, Real-time and non-invasive monitoring of the activation of the IRE1 $\alpha$ -XBP1 pathway in individuals with hemodynamic impairment, *EBioMedicine* 27 (2018) 284–292, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.12.023>.
- [37] M. Moriarty, A. Lee, B. O'Connell, A. Kellher, H. Keedy, A. Furey, Development of an LC-MS/MS method for the analysis of serotonin and related compounds in urine and the identification of a potential biomarker for attention deficit hyperactivity/hyperkinetic disorder, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 2481–2493, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5322-7>.
- [38] N. Fabresse, I. Uteem, E. Lamy, Z. Massy, I.A. Larabi, J.-C. Alvarez, Quantification of free and protein bound uremic toxins in human serum by LC-MS/MS: Comparison of rapid equilibrium dialysis and ultrafiltration, *Clin. Chim. Acta* 507 (2020) 228–235.
- [39] J. Marcos, N. Renau, O. Valverde, G. Aznar-Lafín, I. Gracia-Rubio, M. Gonzalez-Sepulveda, L.A. Pérez-Jurado, R. Ventura, J. Segura, O.J. Pozo, Targeting tryptophan and tyrosine metabolism by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1434 (2016) 91–101, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.023>.
- [40] C. Ho, C. Lam, M. Chan, R. Cheung, L. Law, L. Lit, K. Ng, M. Suen, H. Tai, Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications, *Clin. Biochem. Rev.* 24 (2003) 3–12.
- [41] N.C. van de Merbel, Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 924–933, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.002>.
- [42] Y. Huang, A. Louie, Q. Yang, N. Massenkoff, C. Xu, P.W. Hunt, W. Gee, A simple LC-MS/MS method for determination of kynurenine and tryptophan concentrations in human plasma from HIV-infected patients, *Bioanalysis* 5 (2013) 1397–1407, <https://doi.org/10.4155/bio.13.74>.
- [43] L. Schwidler, A. Trepci, S. Krzyzanowski, S. Hermansson, M. Granqvist, F. Piehl, T. Venckunas, M. Brazaitis, S. Kamandulis, D. Lindqvist, A.D. Jones, S. Erhardt, L. Brundin, A novel, robust method for quantification of multiple kynurenine pathway metabolites in the cerebrospinal fluid, *Bioanalysis* 12 (2020) 379–392, <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0303>.
- [44] K. Anekthanakul, S. Manochewa, K. Chierwichai, P. Pongsoombat, S. Limjiasapong, K. Wanichthanarak, N. Jarayasopit, V.B. Mathema, C. Kuhakarn, V. Reutrakul, J. Phetcharaburan, A. Panya, N. Phonsatta, W. Visessanguan, Y. Pomyen, Y. Sirivatanakorn, S. Worawichawong, N. Sathirapongsasuti, C. Kitiyakara, S. Khoomrung, Predicting lupus membranous nephritis using reduced picolinic acid to tryptophan ratio as a urinary biomarker, *Sci. Data* 11 (2021) 103355.
- [45] C.A. Opitz, L.F. Somarribas Patterson, S.R. Mohapatra, D.L. Dewi, A. Sadik, M. Platten, S. Trump, The therapeutic potential of targeting tryptophan catabolism in cancer, *Br. J. Can.* 122 (2020) 30–44, <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0664-6>.

## Supporting Information

**Table S1:** Carry-over of the method with regard to the 11 compounds and their IS

**Table S2:** Selectivity test for the studied compounds by monitoring dual transitions ions

**Table S3:** Mean bias obtained of the seven calibration standards for the 11 studied compounds

**Table S4:** S/N of the method for the 11 metabolites of interest

**Table S5:** Dilution Integrity for the compounds in plasma and urine

**Table S6:** Postpreparative stability of the 11 studied compounds in water, plasma and urine stored 2 days at +4°C.

**Table S7:** Stability of the 11 studied compounds in plasma stored at +4°C, -20°C and -80°C, and after 5 freeze-thaw cycles

**Table S8:** Stability of the 11 studied compounds in urine stored at +4°C, -20°C and -80°C, and after 5 freeze-thaw cycles

**Table S9:** Statistical analysis of metabolite ratio in KP measured by LC-MS/MS, related to Discussion and Figure 6

**Table S1. Carry-over of the method with regard to the 11 compounds and their IS.**

Compounds	LLOQ area (mean ± SD) n=3	Interference		Internal standards (IS)	IS area (mean ± SD) n=3	Interference	
		Blank LLOQ area* (mean ± SD) n= 9	Ratio "Blank LLOQ / LLOQ" (%)			Blank IS area* (mean ± SD) n=9	Ratio "Blank IS / IS" (%)
NaMN	18884 ± 6979	577 ± 264	3.3	NAM-d3	5365651 ± 971914	2993 ± 3429	0.06
Pic	258698 ± 130726	4971 ± 3103	2.0	PIC-d4	8851828 ± 4871430	7720 ± 9104	0.12
NA	213700 ± 43309	3633 ± 1644	1.8	NA-d3	3748734 ± 1999433	464 ± 258	0.01
QA	429198 ± 172711	17422 ± 11015	5.3	QA-d3	4524085 ± 1548192	30142 ± 36308	0.62
NAM	384326 ± 18270	22038 ± 13425	5.8	NAM-d3	5365651 ± 971914	2993 ± 3429	0.06
3-HK	105461 ± 52770	2757 ± 1761	3.8	3-HK-13C21 5N	3634752 ± 1365830	3152 ± 7883	0.10
Kyn	21707 ± 8462	1603 ± 1080	6.9	Kyn-d4	3404054 ± 1215615	4626 ± 4190	0.12
3-HANA	157584 ± 22685	4719 ± 1847	3.3	3-HANA-d3	4779835 ± 1398771	1680 ± 632	0.04
Trp	32429 ± 17988	5537 ± 2998	16.9	Trp-d5	1367556 ± 484595	1253 ± 1046	0.08
XA	78258 ± 16068	4089 ± 3435	5.2	XA-d4	3235407 ± 1485304	10664 ± 8664	0.33
KA	19617 ± 5432	2473 ± 1644	11.7	KA-d5	2342046 ± 563030	2096 ± 2236	0.09

\* Areas of blank samples measured after the highest CS (ULOQ)

NaMN, nicotinic acid mononucleotide; Pic, picolinic acid; NA, nicotinic acid; QA, quinolinic acid; NAM, nicotinamide; 3-HK, 3-Hydroxy-kynurenine; Kyn, kynurenine; 3-HANA, 3-Hydroxy-anthranilic acid; Trp, tryptophan; XA, xanthurenic acid; KA, kynurenic acid

**Table S2. Selectivity test for the studied compounds by monitoring dual transitions ions.**

Sample	Trp			Kyn			KA			QA			Pic			NA			XA			3-HK			3-HANA		
	Conc. (nM)	ion ratio (%)	CV (%)	Conc. (nM)	ion ratio (%)	CV (%)	Conc. (nM)	ion ratio (%)	CV (%)	Conc. (nM)	ion ratio (%)	CV (%)	Conc. (nM)	ion ratio (%)	CV (%)	Conc. (nM)	ion ratio (%)	CV (%)	Conc. (nM)	ion ratio (%)	CV (%)	Conc. (nM)	ion ratio (%)	CV (%)	Conc. (nM)	ion ratio (%)	CV (%)
Std CS-4 <sup>a</sup> (n=8)	5000	291.2 ± 8.1	/	2400	297.3 ± 8.9	/	2600	58.3 ± 5.2	/	6000	43.6 ± 4.0	/	400	27.4 ± 1.1	/	400	75.4 ± 9.9	/	250	40.7 ± 2.1	/	225	35.6 ± 3.0	/	165	23.2 ± 1.3	/
P1	46165	285.9	1.1	3361	305.8	2.0	51	53.35	6.2	88.0	44.34	1.2	76	35.8	18.9	<LLOQ	ND	ND	21	40.0	1.4	53	40.5	9.0	16	22.3	2.9
P2	45193	290.8	0.1	2937	306.0	2.0	42	59.97	2.0	87.9	39.39	7.2	44	30.9	8.5	<LLOQ	ND	ND	18	37.1	6.6	56	35.4	0.5	14	24.4	3.7
P3	37855	303.5	2.9	2184	296.6	0.2	34	58.05	0.3	33.6	42.7	1.5	100	26.8	1.4	<LLOQ	ND	ND	12	34.7	11.2	49	34.4	2.5	13	23.8	1.9
P4	33089	281.9	2.3	1856	340.8	9.6	63	54.8	4.4	426	59.8	22.1	<LLOQ	ND	ND	<LLOQ	ND	ND	11	38.2	4.6	40	29.7	12.9	<LLOQ	ND	ND
P5	33217	283.7	1.9	2122	352.3	12.0	73	51.8	8.3	774	61.0	23.5	85	34.3	16.0	<LLOQ	ND	ND	<LLOQ	ND	ND	73	32.6	6.3	<LLOQ	ND	ND
P6	42367	287.8	0.8	4533	333.2	8.1	157	72.0	14.9	1383	48.0	6.7	73	21.5	16.9	<LLOQ	ND	ND	27	33.9	12.9	41	30.1	11.8	17	18.7	15.2
U1	18508	293.7	0.6	1228	291.1	1.5	5448	56.5	2.2	42902	40.4	5.4	876	25.8	4.0	1219	83.5	7.2	891	34.2	12.3	383	35.3	0.7	1167	23.6	1.4
U2	21443	289.6	0.4	1464	288.7	2.1	6276	57.6	0.8	53986	40.2	5.7	1132	23.7	10.0	1477	82.2	6.1	1095	33.9	13.0	380	30.0	12.2	1533	23.1	0.4
U3	11647	292.1	0.2	903	301.9	1.1	2498	56.8	1.8	7016	43.2	0.8	489	28.3	2.4	50	66.7	8.7	617	36.6	7.5	219	35.3	0.6	405	23.8	1.8
U4	4511	282.9	2.1	318	331.9	7.8	2485	59.8	1.8	19118	42.3	2.3	460	29.1	4.4	416	86.4	9.6	1141	34.7	11.3	217	36.1	1.0	949	23.7	1.7
U5	2241	290.2	0.2	149	292.7	1.1	1031	63.3	5.9	7667	42.1	2.4	198	26.0	3.5	158	87.2	10.2	374	37.4	6.1	67	43.9	14.8	507	23.7	1.7
U6	47344	292.8	0.4	8858	302.2	1.2	7924	54.5	4.7	52540	39.9	6.4	1051	25.1	6.0	1622	74.3	1.1	719	45.4	7.6	1471	31.6	8.4	1374	22.4	2.4
U7	9003	290.9	0.1	347	283.9	3.3	4581	55.4	3.5	10871	42.6	1.7	564	26.1	3.4	69	77.1	1.6	965	34.1	12.6	96	30.3	11.5	188	22.9	0.9
U8	3900	283.5	1.9	170	292.0	1.3	1591	58.6	0.4	5099	43.5	0.2	173	31.4	9.6	108	82.9	6.7	394	36.4	7.9	48	34.2	2.9	299	23.9	2.3
U9	12021	292.0	0.2	980	276.9	5.0	3019	57.8	0.6	8709	42.2	2.4	382	28.1	2.0	167	65.0	10.5	834	36.9	7.0	403	34.5	2.3	380	22.6	1.9
U10	14609	290.4	0.2	3484	298.3	0.2	3185	56.2	2.6	21201	39.9	6.3	422	25.2	5.9	706	68.5	6.8	325	42.1	2.3	253	34.8	1.6	510	22.8	1.2

Trp : Ref 1  $m/z= 205.0>118.2$  ; Ref 2  $m/z= 205.0>188.2$

Kyn : Ref 1  $m/z= 209.2>146.0$ ; Ref 2  $m/z= 209.2>192.1$

KA : Ref 1  $m/z= 190.1>116.0$  ; Ref 2  $m/z= 190.1>172.2$

QA : Ref 1  $m/z= 167.9>78.0$  ; Ref 2  $m/z= 167.9>124.0$

Pic:Ref 1  $m/z= 124.1>78.1$  ; Ref 2  $m/z= 124.1>51.1$

NA:Ref 1  $m/z= 124.1>80.1$  ; Ref 2  $m/z= 124.1>78.1$

XA:Ref 1  $m/z= 206.0>160.0$  ; Ref 2  $m/z= 206.0>188.0$

3-HK: Ref 1  $m/z= 225.0>208.1$ ; Ref 2  $m/z= 225.0>162.1$

3-HANA: Ref 1  $m/z= 154.0>136.1$ ; Ref 2  $m/z= 154.0>108.1$

Std CS-4: The fourth point calibration standard; P: plasma samples used for stability tests; U: urine samples from different HEGP CPB cohort subjects;

Conc.: concentration; Ion ratio (%) : ratio of peak area of the qualifier ion (Ref 2) to quantifier ion (Ref 1); CV: ion ratio deviation from reference value of the standard (%); ND: not determined; (°): ion ratio of Std CS-4 were expressed on Mean ± SD

**Table S3. Mean bias obtained of the seven calibration standards for the 11 studied compounds.**

Compound	Calibration standard (CS) points	CS-1	CS-2	CS-3	CS-4	CS-5	CS-6	CS-7
NaMN	theoretical concentration (nM)	8.0	15.0	30.0	75.0	150.0	750.0	1500.0
	Calibration N°1 (nM)	8.9	14.6	29.0	63.8	135.4	704.2	1536.9
	Calibration N°2 (nM)	8.2	15.5	27.3	70.0	138.8	749.3	1504.1
	Calibration N°3 (nM)	8.7	13.3	28.4	64.0	125.5	726.1	1601.5
	Calibration N°4 (nM)	8.5	15.0	27.2	68.0	129.4	773.7	1646.6
	Calibration N°5 (nM)	8.9	12.8	25.6	72.2	127.3	763.9	1525.6
	Calibration N°6 (nM)	7.6	13.2	25.6	66.6	133.7	725.6	1606.8
	Bias (%)	5.6	-6.4	-9.4	-10.1	-12.2	-1.3	4.7
Pic	theoretical concentration (nM)	40.0	80.0	200.0	400.0	800.0	2000	4000.0
	Calibration N°1 (nM)	44.1	86.6	176.2	346.2	765.9	2006.7	4122.0
	Calibration N°2 (nM)	38.9	71.4	227.5	364.1	747.5	2230.9	4097.9
	Calibration N°3 (nM)	44.0	93.7	198.2	354.5	704.8	2197.1	4038.3
	Calibration N°4 (nM)	47.8	75.9	199.0	351.7	804.8	2091.4	3544.7
	Calibration N°5 (nM)	44.5	84.5	192.6	352.8	800.8	2213.9	3946.4
	Calibration N°6 (nM)	47.8	73.7	182.1	374.2	750.3	2224.1	3962.3
	Bias (%)	11.3	1.2	-2.0	-10.7	-4.7	8.0	-1.2
NA	theoretical concentration (nM)	40.0	80.0	200.0	400.0	800.0	2000	4000.0
	Calibration N°1 (nM)	42.6	81.4	183.5	361.5	792.2	2117.5	4041.7
	Calibration N°2 (nM)	39.0	89.1	206.7	345.6	769.5	2114.0	3781.5
	Calibration N°3 (nM)	41.3	94.1	187.7	402.5	750.3	2245.4	3925.0
	Calibration N°4 (nM)	45.4	91.8	198.1	354.8	712.5	1994.5	4238.3
	Calibration N°5 (nM)	42.2	70.6	192.3	351.9	784.5	2051.1	4147.9
	Calibration N°6 (nM)	40.2	89.8	186.3	380.9	735.1	2072.6	4130.6
	Bias (%)	4.4	7.6	-3.8	-8.4	-5.3	5.0	1.1
QA	theoretical concentration (nM)	240.	600.	1200.	6000.	12000.	60000.	120000.
	Calibration N°1 (nM)	261.	673.	1247.	5886.	10635.	63193.	117674.
	Calibration N°2 (nM)	243.	657.	1233.	6107.	11289.	61737.	119338.
	Calibration N°3 (nM)	255.	607.	1205.	6651.	11638.	65504.	114069.
	Calibration N°4 (nM)	231.	670.	1083.	5339.	10501.	59850.	125507.
	Calibration N°5 (nM)	234.	637.	1282.	6594.	10404.	62972.	115249.
	Calibration N°6 (nM)	235.	628.	1198.	5633.	10398.	61240.	121431.
	Bias (%)	1.6	7.6	0.7	0.6	-9.9	4.0	-0.9
NAM	theoretical concentration (nM)	20.0	40.0	80.0	200.0	400.0	2000.0	4000.0
	Calibration N°1 (nM)	21.2	43.3	94.1	205.9	370.3	2064.0	3627.4
	Calibration N°2 (nM)	21.4	42.8	86.8	225.3	411.9	2071.0	3799.8

	Calibration N°3 (nM)	20.7	35.3	86.8	200.7	380.8	2035.8	4127.4
	Calibration N°4 (nM)	22.1	42.1	88.5	227.3	388.7	2127.1	3907.8
	Calibration N°5 (nM)	18.8	39.7	75.3	217.1	412.4	2059.5	4048.1
	Calibration N°6 (nM)	22.2	45.0	93.2	228.2	388.6	2150.9	3907.5
	Bias (%)	5.4	3.4	9.3	8.7	-2.0	4.2	-2.4
3-HK	theoretical concentration (nM)	9.0	25.0	50.0	225.0	450.0	2250.0	4500.0
	Calibration N°1 (nM)	8.8	23.3	44.3	225.0	395.8	2284.3	4523.8
	Calibration N°2 (nM)	9.5	20.5	44.6	252.0	444.1	2518.5	4459.9
	Calibration N°3 (nM)	8.8	22.8	43.0	191.5	381.5	2149.9	4653.5
	Calibration N°4 (nM)	8.5	23.8	43.2	233.2	382.9	2209.8	4540.1
	Calibration N°5 (nM)	9.3	23.5	42.5	203.3	382.2	2159.2	4715.1
	Calibration N°6 (nM)	9.1	23.8	43.0	227.8	384.5	2350.0	4430.2
	Bias (%)	-0.1	-8.3	-13.2	-1.3	-12.2	1.3	1.2
Kyn	theoretical concentration (nM)	24.0	240.0	480.0	2400.0	4800.0	24000.0	48000.0
	Calibration N°1 (nM)	25.9	255.1	478.6	2492.2	5323.4	25643.3	46207.7
	Calibration N°2 (nM)	26.0	258.2	481.1	2422.2	4260.8	24286.3	42860.0
	Calibration N°3 (nM)	20.8	261.4	463.6	2618.3	4872.2	24207.5	47929.9
	Calibration N°4 (nM)	21.6	244.3	515.4	2577.1	4908.7	20817.9	44784.5
	Calibration N°5 (nM)	28.5	270.6	528.9	2729.9	5005.1	23171.8	47491.5
	Calibration N°6 (nM)	27.3	262.3	542.3	2613.8	4558.2	23913.5	44528.2
	Bias (%)	4.3	7.8	4.5	7.3	0.4	-1.4	-4.9
3-HANA	theoretical concentration (nM)	16.0	33.0	66.0	165.0	330.0	1650.0	3300.0
	Calibration N°1 (nM)	16.6	32.1	64.8	146.5	296.0	1685.0	3282.9
	Calibration N°2 (nM)	17.9	29.9	64.1	155.9	292.0	1662.6	3344.4
	Calibration N°3 (nM)	14.7	34.6	59.1	165.7	321.8	1665.6	3313.5
	Calibration N°4 (nM)	16.2	29.1	67.4	153.6	283.6	1624.3	3332.1
	Calibration N°5 (nM)	17.5	30.1	64.4	172.2	285.0	1807.0	3246.3
	Calibration N°6 (nM)	17.6	33.2	58.5	151.1	286.3	1612.6	3374.2
	Bias (%)	4.7	-4.6	-4.4	-4.5	-10.9	1.6	0.5
Trp	theoretical concentration (nM)	50.0	500.0	1000.0	5000.0	10000.0	50000.0	100000.0
	Calibration N°1 (nM)	49.1	556.1	903.4	4966.0	10217.8	49566.4	90646.8
	Calibration N°2 (nM)	50.0	548.1	1018.6	5106.9	9576.3	51029.6	96049.9
	Calibration N°3 (nM)	46.8	554.0	854.1	5399.9	9093.4	47332.0	102301.1
	Calibration N°4 (nM)	42.8	558.9	843.0	5179.0	10014.5	50204.7	95999.4
	Calibration N°5 (nM)	38.4	518.8	930.8	5473.1	9733.9	48634.4	95950.9
	Calibration N°6 (nM)	40.5	561.0	1010.0	5624.0	10250.0	49917.0	92657.2

		1	3	8	0	0	
	Bias (%)	-10.8	9.9	-7.3	5.8	-1.9	-1.1 -4.4
XA	theoretical concentration (nM)	10.0	25.0	50.0	250.0	500.0	2500.0 5000.0
	Calibration N°1 (nM)	10.7	26.7	54.3	244.4	444.0	2545.7 4766.8
	Calibration N°2 (nM)	10.2	26.7	50.9	255.6	443.6	2597.8 4746.5
	Calibration N°3 (nM)	10.2	25.6	49.5	275.3	482.5	2636.7 4683.0
	Calibration N°4 (nM)	10.7	24.9	44.1	225.2	431.5	2410.2 5101.4
	Calibration N°5 (nM)	9.1	26.3	51.5	264.6	474.9	2363.2 4891.0
	Calibration N°6 (nM)	10.7	25.4	47.0	223.7	414.4	2423.8 4977.4
	Bias (%)	2.6	3.8	-0.9	-0.7	-10.3	-0.2 -2.8
KA	theoretical concentration (nM)	26.0	260.0	520.0	2600.0	5200.0	26000.0 52000.0
	Calibration N°1 (nM)	28.8	285.4	500.9	2692.7	5809.9	27367.1 51834.0
	Calibration N°2 (nM)	26.9	297.8	574.9	2957.3	5606.6	25246.8 45474.9
	Calibration N°3 (nM)	23.1	287.0	462.5	2694.1	5262.3	25750.6 53942.3
	Calibration N°4 (nM)	27.9	291.0	555.9	3021.0	5197.3	26263.3 52069.6
	Calibration N°5 (nM)	28.4	284.0	595.6	2759.3	4811.0	26530.9 47620.0
	Calibration N°6 (nM)	25.4	275.4	545.8	2892.4	5518.2	27385.6 51421.1
	Bias (%)	2.9	10.3	3.7	9.1	3.2	1.6 -3.1



**Table S4. S/N of the method for the 11 metabolites of interest.**

Compounds	LLOQ area (S) (mean $\pm$ SD) n=6	Blank Area (N) (mean $\pm$ SD) n=6	S/N (mean $\pm$ SD)
NaMN	16917 $\pm$ 9239	256 $\pm$ 216	49 $\pm$ 30
Pic	268396 $\pm$ 89214	5993 $\pm$ 4873	75 $\pm$ 59
NA	203034 $\pm$ 40877	7018 $\pm$ 4583	35 $\pm$ 17
QA	347901 $\pm$ 79667	6431 $\pm$ 4942	90 $\pm$ 60
NAM	403656 $\pm$ 31556	878 $\pm$ 300	497 $\pm$ 151
3-HK	92700 $\pm$ 11815	5156 $\pm$ 3457	22 $\pm$ 8
Kyn	22176 $\pm$ 8771	1256 $\pm$ 504	19 $\pm$ 9
3-HANA	133714 $\pm$ 44954	1596 $\pm$ 2890	25 $\pm$ 4
Trp	28573 $\pm$ 8092	1796 $\pm$ 766	17 $\pm$ 7
XA	87184 $\pm$ 14408	2654 $\pm$ 1545	45 $\pm$ 27
KA	23978 $\pm$ 10639	2317 $\pm$ 1073	13 $\pm$ 9

NaMN. nicotinic acid mononucleotide; Pic. picolinic acid; NA. nicotinic acid; QA. quinolinic acid; NAM. nicotinamide; 3-HK. 3-Hydroxy-kynurenine; Kyn. kynurenine; 3-HANA. 3-Hydroxy-anthranilic acid; Trp. tryptophan; XA. xanthurenic acid; KA. kynurenic acid

**Table S5. Dilution Integrity for the compounds in plasma and urine.**

Compounds	Dilution factor	Intra-day (n=6)					
		Plasma			Urine		
		Concentration (nM)	BIAS (%)	CV (%)	Concentration (nM)	BIAS (%)	CV (%)
Nicotinic acid mononucleotide	1	1492	/	/	1498	/	/
	2	1429 $\pm$ 95	4.1	6.6	1647 $\pm$ 63	-10.1	3.8
	4	1277 $\pm$ 45	14.5	3.4	1593 $\pm$ 72	-6.4	4.5
	8	1653 $\pm$ 30	-10.8	1.7	1516 $\pm$ 45	-1.3	2.9
	16	1644 $\pm$ 103	-10.1	6.3	1551 $\pm$ 116	-3.7	7.5
Picolinic acid	1	4411	/	/	5564	/	/
	2	4354 $\pm$ 301	-6.6	6.9	4191 $\pm$ 97	10.4	2.3
	4	4151 $\pm$ 106	-1.7	2.6	4403 $\pm$ 41	5.8	1.0
	8	4386 $\pm$ 130	-7.3	3.1	4386 $\pm$ 106	6.2	2.5
	16	4541 $\pm$ 195	-11.2	4.2	4476 $\pm$ 211	4.2	4.7
Nicotinic acid	1	4411	/	/	5564	/	/
	2	4598 $\pm$ 398	-12.9	8.7	4240 $\pm$ 260	9.4	6.1
	4	4378 $\pm$ 195	-7.5	4.5	4199 $\pm$ 227	10.2	5.4
	8	4516 $\pm$ 146	-10.8	3.3	5036 $\pm$ 658	-7.7	13.1
	16	4443 $\pm$ 292	-9.0	6.6	5085 $\pm$ 219	-8.6	4.4
Quinolinic acid	1	119842	/	/	124078	/	/
	2	105601 $\pm$ 8030	11.9	7.6	108694 $\pm$ 2710	12.4	2.5
	4	107091 $\pm$ 3459	10.6	3.2	117406 $\pm$ 2583	5.4	2.2
	8	112159 $\pm$	6.4	3.2	1319751 $\pm$ 2138	-5.1	1.6

		3578					
	16	116533 ± 7210	2.8	6.2	131975 ± 7585	-6.4	5.7
Nicotinamide	1	4446	/	/	6428	/	/
	2	4946 ± 360	-11.4	7.3	6313 ± 164	1.8	2.6
	4	4610 ± 180	-3.8	3.9	6928 ± 262	-7.8	3.8
	8	4905 ± 278	-10.3	5.7	6846 ± 205	-6.5	3.0
	16	2524 ± 227	-4.3	9.1	3657 ± 94	-4.5	2.6
3-Hydroxy-kynurenine	1	4482	/	/	4482	/	/
	2	3862 ± 263	13.8	6.8	3987 ± 89	11.1	2.3
	4	3840 ± 143	14.3	3.7	4714 ± 169	-5.2	3.6
	8	4206 ± 152	6.2	3.6	4746 ± 156	-5.9	3.3
	16	5014 ± 307	-3.9	6.2	4731 ± 403	2.0	8.6
Kynurenine	1	50468	/	/	48835	/	/
	2	43005 ± 1719	14.8	4.0	41742 ± 821	14.5	2.0
	4	42856 ± 1479	15.1	3.5	42837 ± 865	12.3	2.0
	8	46232 ± 3645	8.4	7.9	46472 ± 557	4.8	1.2
	16	46943 ± 2320	7.0	4.9	48619 ± 1791	0.5	3.0
3-Hydroxy-anthranilic acid	1	3265	/	/	3657	/	/
	2	3174 ± 242	2.8	7.6	3435 ± 52	6.0	1.6
	4	3239 ± 144	0.8	4.5	3918 ± 111	-7.2	2.8
	8	3389 ± 150	-3.8	4.5	4127 ± 183	-12.9	4.4
	16	3637 ± 215	-11.3	5.9	4107 ± 470	-12.3	11.4
Tryptophan	1	140322	/	/	115625	/	/
	2	122117 ± 4426	13.0	3.6	98561 ± 489	14.8	0.5
	4	132645 ± 4142	5.5	3.1	102345 ± 2624	11.5	2.6
	8	146389 ± 5386	-4.3	3.7	114968 ± 1968	0.6	1.7
	16	154179 ± 9519	-9.9	6.2	125417 ± 4764	-8.5	3.8
Xanthurenic acid	1	4884	/	/	4962	/	/
	2	4596 ± 327	5.9	7.1	5215 ± 63	-5.1	1.2
	4	4543 ± 156	6.9	3.4	5444 ± 68	-9.7	1.3
	8	4640 ± 117	5.0	2.6	5625 ± 127	-13.3	2.3
	16	4762 ± 361	2.4	7.6	5629 ± 517	-13.5	9.1
Kynurenic acid	1	52900	/	/	59291	/	/
	2	46778 ± 1411	11.6	3.0	59486 ± 1242	-0.3	2.1
	4	48681 ± 1961	8.0	4.0	59914 ± 1337	-1.0	2.2
	8	50489 ± 3875	4.6	7.7	62140 ± 1052	-7.8	1.7
	16	51853 ± 3325	2.0	6.4	63171 ± 2432	-6.5	3.8

**Table S6. Postpreparative stability of the 11 studied compounds in water, plasma and urine stored 2 days at +4°C.**

Compounds	Baseline (nM)															Concentrations compared to the baseline (%) MEAN±SD		
	CQ			PLASMA						URINE						Stored in the auto-sampler at +4°C for 48 h		
	L	M	H	P1	P2	P3	P4	P5	P6	U1	U2	U3	U4	U5	U6	CQ	PLASMA	URINE
NaMN	8	28	214	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	90.2 ± 5.3	ND	ND
Pic	60	252	2249	NQ	85	55	NQ	73	NQ	391	735	2061	540	436	NQ	97.9 ± 8.8	99.1 ± 5.4	97.0 ± 6.7
NA	62	265	1935	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	288	486	612	123	110	NQ	92.8 ± 4.2	ND	95.5 ± 10.3
QA	372	8040	64048	426	774	290	683	1383	769	13125	53032	40586	8189	15180	2256	101.1 ± 5.4	95.7 ± 4.6	91.9 ± 3.8
NAM	26	300	1980	239	377	197	217	560	272	406	327	687	328	195	59	101.0 ± 9.7	105.4 ± 10.1	107.2 ± 4.6
3-HK	15	253	2394	40	73	14	31	41	51	438	596	606	87	211	271	107.1 ± 11.0	103.2 ± 13.6	108.6 ± 8.0
Kyn	50	2219	40747	1856	2122	1198	2585	4533	2861	1008	1320	2253	558	749	1460	101.6 ± 10.4	104.6 ± 3.2	102.7 ± 5.0
3-HANA	16	225	1774	NQ	NQ	NQ	18	17	19	679	920	890	265	707	282	90.5 ± 8.1	103.4 ± 9.2	103.3 ± 3.9
Trp	88	4365	87718	33089	33217	43896	46085	42367	36563	17946	5586	34582	12946	11032	3086	89.0 ± 9.2	87.7 ± 4.9	87.0 ± 5.7
XA	16	332	2689	11	NQ	NQ	12	27	NQ	877	843	1860	479	858	19	91.9 ± 6.8	102.4 ± 6.2	99.3 ± 5.4
KA	46	2155	44980	63	73	NQ	44	157	69	4748	7703	10261	2883	4451	335	109.6 ± 2.4	96.9 ± 10.2	107.0 ± 5.4

ND: not determined; NQ: not quantified (< LLOQ)

**Table S7. Stability of the 11 studied compounds in plasma stored at +4°C, -20°C and -80°C and after 5 freeze-thaw cycles.**

Compounds	Baseline (nM) (n=3) RT	Concentrations compared to the baseline (%) MEAN±SD (n=3)											
		+4°C			-20°C			-80°C			-80°C		
		T0	Day 5	Day 5	Day 20	Month 2	Day 5	Day 20	Month 2	FT Cycle 1	FT- Cycle 2	FT- Cycle 3	FT- Cycle 4
NaMN	< LLOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pic	P1=76 P2=44 P3=100	90.9 ± 0.9	94.8 ± 4.5	87.0 ± 9.3	92.9 ± 10.4	93.8 ± 4.3	89.5 ± 8.0	86.3 ± 5.4	93.0 ± 1.4	99.4 ± 13.2	83.1 ± 3.3	85.6 ± 10.0	79.4 ± 1.9
NA	<LLOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
QA	P1=527 P2=526 P3=201	98.9 ± 22.6	92.4 ± 4.0	95.4 ± 4.9	91.7 ± 0.0	93.9 ± 9.9	94.1 ± 2.9	90.8 ± 8.3	98.4 ± 17.6	110.9 ± 11.8	96.4 ± 5.5	93.0 ± 6.5	105.2 ± 6.3
NAM	P1=177 P2=384 P3=82	100.1 ± 5.0	100.1 ± 10.5	96.7 ± 7.7	87.3 ± 2.7	104.9	103.8	92.7	103.0 ± 10.8	103.6 ± 11.9	90.8 ± 0.5	96.6 ± 19.8	97.7 ± 24.0
3-HK	P1=53 P2=56 P3=49	92.2 ± 17.5	92.2 ± 5.4	85.0 ± 2.4	90.7 ± 4.9	98.3 ± 2.0	97.1 ± 2.8	92.7 ± 9.4	86.0 ± 3.1	86.3 ± 4.8	86.5 ± 0.4	89.7 ± 5.9	101.1 ± 7.6
Kyn	P1=3361 P2=2937 P3=2184	99.4 ± 7.4	86.6 ± 2.4	89.8 ± 9.6	105.6 ± 3.4	87.1 ± 3.1	102.7 ± 3.1	95.5 ± 10.7	101.9 ± 2.3	97.2 ± 9.8	96.0 ± 13.5	90.7 ± 7.1	104.6 ± 16.5
3-HANA	P1=16 P2=14 P3=13	99.6 ± 14.9	100.7 ± 13.0	102.2 ± 4.9	94.3 ± 2.3	85.9 ± 9.9	89.4 ± 7.7	100.7 ± 0.4	85.4 ± 8.5	87.4 ± 13.7	54.1 ± 16.6	41.4 ± 15.0	NI
Trp	P1=46165 P2=45193 P3=37855	91.1 ± 1.2	96.1 ± 2.4	96.6 ± 6.2	105.2 ± 2.1	94.4 ± 0.9	95.7 ± 1.8	103.9 ± 3.3	107.5 ± 6.0	112.6 ± 3.3	107.3 ± 7.2	92.0 ± 10.9	112.1 ± 5.3
XA	P1=21 P2=18 P3=12	90.5 ± 5.8	84.7 ± 2.3	90.2 ± 11.4	102.9 ± 7.9	87.6 ± 5.3	86.8 ± 7.2	101.8 ± 7.2	89.3 ± 10.3	92.1 ± 10.2	83.4 ± 8.8	84.7 ± 2.0	86.0 ± 4.1
KA	P1=51 P2=42 P3=34	106.7 ± 16.0	99.3 ± 8.6	89.8 ± 4.4	98.4 ± 13.1	100.0 ± 9.5	96.5 ± 8.1	93.9 ± 8.2	90.6 ± 0.1	89.4 ± 8.2	98.8 ± 25.4	87.5 ± 4.0	96.3 ± 5.8

ND: not determined; RT: room temperature; FT: freeze-thaw; NI: not investigated (extensive loss at FT-Cycle 4);

NaMN. nicotinic acid mononucleotide; Pic. picolinic acid; NA. nicotinic acid; QA. quinolinic acid; NAM. nicotinamide; 3-HK. 3-Hydroxy-kynurenine; Kyn. kynurenine; 3-HANA. 3-Hydroxy-anthranilic acid; Trp. tryptophan; XA. xanthurenic acid; KA. kynurenic acid

**Table S8. Stability of the 11 studied compounds in urine stored at +4°C, -20°C and -80°C and after 5 freeze-thaw cycles.**

Compounds	Baseline (nM) (n=3) RT	Concentrations compared to the baseline (%) MEAN±SD (n=3)											
		+4°C			-20°C			-80°C			-80°C		
		T0	Day 5	Day 5	Day 20	Month 2	Day 5	Day 20	Month 2	FT Cycle 1	FT- Cycle 2	FT- Cycle 3	FT- Cycle 4
NaMN	U1=17.20 U2=10.84 U3<LLOQ	85.0 ± 12.4	109.3 ± 11.7	111.1 ± 1.9	91.5 ± 10.3	112.9 ± 15.6	106.3 ± 7.1	93.5 ± 1.1	92.8 ± 9.7	111.0 ± 7.3	96.1 ± 7.7	92.1 ± 0.3	88.0 ± 20.9
Pic	U1=577 U2=415 U3=221	100.1 ± 14.1	95.9 ± 4.5	104.2 ± 9.5	92.9 ± 10.4	94.4 ± 5.0	110.5 ± 8.0	88.5 ± 7.4	94.2 ± 1.1	109.4 ± 9.7	85.4 ± 7.3	87.6 ± 6.7	89.0 ± 8.5
NA	U1=277 U2=184 U3 <LLOQ	101 ± 11.9	108.0 ± 0.9	96.6 ± 7.5	105.6 ± 17.0	103.4 ± 11.4	92.4 ± 0.7	108.5 ± 2.9	101.0 ± 11.9	103.3 ± 19.1	93.1 ± 13.6	103.1 ± 15.5	124.9 ± 5.6
QA	U1=10812 U2=7069 U3=3631	102.1 ± 4.3	104.7 ± 4.4	103.3 ± 1.0	103.4 ± 13.9	100.8 ± 3.1	101.3 ± 2.6	98.8 ± 3.5	97.7 ± 9.7	101.6 ± 6.2	103.3 ± 5.8	95.2 ± 0.5	98.5 ± 11.0
NAM	U1=423 U2=164 U3=116	98.5 ± 2.9	98.7 ± 7.7	105.8 ± 6.3	107.5 ± 7.2	102.7 ± 12.5	106.8 ± 12.1	108.3 ± 6.5	102.7 ± 12.5	99.5 ± 11.9	107.3 ± 0.8	111.9 ± 17.3	106.6 ± 9.0
3-HK	U1=1763 U2=606 U3=219	91.2 ± 6.5	93.0 ± 2.3	87.1 ± 3.2	100.5 ± 5.0	95.2 ± 1.7	85.7 ± 7.1	96.8 ± 3.3	86.0 ± 3.1	85.0 ± 4.0	90.6 ± 1.9	87.9 ± 10.0	100.5 ± 9.8
Kyn	U1=2465 U2=1448 U3=342	101.3 ± 7.5	101.4	96.7 ± 10.1	109.7 ± 3.7	100.7 ± 5.7	96.3 ± 7.3	112.5 ± 2.9	91.7 ± 11.3	96.9 ± 14.5	96.1 ± 10.0	91.8 ± 10.2	109.8 ± 8.4
3-HANA	U1=2353 U2=1080 U3=328	96.9 ± 4.	99.2 ± 1.1	94.3 ± 2.3	90.5 ± 12.6	101.8 ± 5.0	88.6 ± 11.5	87.7 ± 12.0	94.8 ± 3.2	88.7 ± 14.9	56.0 ± 32.4	45.6 ± 18.9	NI
Trp	U1=19567 U2=7424 U3=6422	103.2 ± 4.8	107.2 ± 4.9	107.4 ± 4.9	105.7 ± 9.1	104.7 ± 6.8	102.2 ± 8.7	101.8 ± 11.3	97.4 ± 5.4	104.3 ± 4.2	108.0 ± 13.6	99.9 ± 8.2	104.6 ± 7.9
XA	U1=414 U2=528 U3=332	107.3 ± 7.9	111.3 ± 3.3	93.8 ± 2.3	93.4 ± 3.4	110.4 ± 3.6	91.2 ± 0.1	102.9 ± 13.7	100.3 ± 7.8	99.6 ± 15.0	91.6 ± 7.7	88.1 ± 11.3	86.7 ± 0.2
KA	U1=1473 U2=3512 U3=1165	98.1 ± 3.8	102 ± 3.7	94.6 ± 4.0	108.1 ± 4.3	100.3 ± 5.5	96.5 ± 5.8	107.4 ± 2.9	91.6 ± 11.8	94.3 ± 1.4	111.7 ± 8.4	88.0 ± 3.5	101.7 ± 8.1

RT: room temperature; FT: freeze-thaw; NI: not investigated (extensive loss at FT-Cycle 4)

NaMN. nicotinic acid mononucleotide; Pic. picolinic acid; NA. nicotinic acid; QA. quinolinic acid; NAM. nicotinamide; 3-HK. 3-Hydroxy-kynurenine; Kyn. kynurenine; 3-HANA. 3-Hydroxy-anthranilic acid; Trp. tryptophan; XA. xanthurenic acid; KA. kynurenic acid

**Table S9. Statistical analysis of metabolite ratio in KP measured by LC-MS/MS, related to Discussion and Figure 6.**

HEGP CPB cohort	CPB				2 hours after CPB				24 hours after CPB			
	Median-noAKI (n=30)	Median-AKI (n=11)	Corrected P-VALUE	Log 2(FC)	Median-noAKI (n=30)	Median-AKI (n=11)	Corrected P-VALUE	Log 2(FC)	Median-noAKI (n=30)	Median-AKI (n=11)	Corrected P-VALUE	Log 2(FC)
[uQA/Kyn] <sup>a</sup>	9.290	8.974	0.9660	-0.04993	10.100	16.210	0.5501	0.68253	5.336	9.490	0.0193	0.83065
[uQA/KA] <sup>a</sup>	3.936	3.145	0.7990	-0.32367	3.485	2.947	0.6116	-0.24191	4.989	3.241	0.0149	-0.62231
[uQA/3-HK] <sup>a</sup>	33.990	27.950	0.8223	-0.28226	47.460	54.450	0.9287	0.19822	24.770	46.110	0.0149	0.89649
[uQA/XA]	16.890	14.300	0.8467	-0.24015	14.160	14.300	0.9762	0.01419	51.490	33.090	0.1645	-0.63790
[uQA/3-HANA]	16.570	15.850	0.9565	-0.06409	19.320	15.130	0.8113	-0.35268	32.950	117.500	0.0325	1.83431
[uQA/Pic]	22.400	22.660	1.0116	0.01665	28.700	27.480	0.7202	-0.06267	46.030	65.430	0.0909	0.50738
[uQA/NA]	38.260	43.070	1.1257	0.17085	48.130	48.380	0.9422	0.00747	33.930	32.540	0.9422	-0.06035
[uQA/NAM]	35.010	28.210	0.8058	-0.31156	27.440	27.670	0.3593	0.01204	70.530	98.010	0.2492	0.47469
[uPic/Kyn]	0.509	0.386	0.7586	-0.39868	0.442	0.371	>0.9999	-0.25328	0.129	0.168	0.2874	0.38669
[uPic/KA] <sup>a</sup>	0.181	0.128	0.7056	-0.50303	0.121	0.116	0.7388	-0.06473	0.130	0.062	0.0011	-1.05963
[uPic/3-HK]	1.514	1.392	0.9194	-0.12121	2.232	1.246	0.424	-0.84103	0.595	0.816	0.0699	0.45537
[uPic/XA] <sup>a</sup>	0.791	0.614	0.7764	-0.36515	0.498	0.584	0.6954	0.22969	0.961	0.633	0.0103	-0.60203
[uPic/NA]	1.755	2.283	1.3009	0.37946	2.069	2.369	0.9422	0.19534	0.716	0.751	0.6954	0.06928
[uPic/NAM]	1.618	1.358	0.8393	-0.25273	0.853	1.180	0.2615	0.46800	1.733	1.373	0.3593	-0.33594
[uNAM/Trp]	0.029	0.036	1.2510	0.32303	0.046	0.043	0.5913	-0.08190	0.012	0.036	0.0426	1.56783
[uNAM/Kyn]	0.375	0.291	0.7776	-0.36285	0.504	0.316	0.7608	-0.67372	0.067	0.114	0.2038	0.75932
[uNAM/KA] <sup>a</sup>	0.123	0.111	0.8991	-0.15344	0.151	0.100	0.034	-0.59938	0.076	0.040	0.0043	-0.93936
[uNAM/3-HK]	0.515	0.411	0.7987	-0.32424	0.819	0.543	0.0968	-0.59238	0.425	0.902	0.0367	1.08417
[uNAM/XA] <sup>a</sup>	0.530	0.511	0.9647	-0.05184	0.602	0.457	0.1934	-0.39727	0.695	0.395	0.0247	-0.81626
[uNAM/3-HANA]	0.515	0.411	0.7987	-0.32424	0.819	0.543	0.0968	-0.59238	0.425	0.902	0.0367	1.08417

[uNAM/NA]	1.168	1.506	1.2894	0.36668	0.019	1.967	0.5135	6.70912	0.026	0.321	0.6954	3.62464
[uNA/Trp]	0.026	0.027	1.0208	0.02966	0.019	0.026	0.5135	0.44259	0.034	0.069	0.1096	1.02540
[uNA/Kyn]	0.240	0.199	0.8307	-0.26761	0.182	0.148	0.6954	-0.30206	0.144	0.269	0.2492	0.89685
[uNA/KA]	0.110	0.078	0.7077	-0.49876	0.058	0.066	0.9422	0.18467	0.159	0.073	0.0494	-1.13036
[uNA/3-HK]	0.849	0.594	0.6994	-0.51579	0.910	0.587	0.653	-0.63249	0.472	1.239	0.0799	1.39385
[uNA/XA]	0.472	0.383	0.8112	-0.30189	0.241	0.329	0.9422	0.44670	1.399	0.941	0.1834	-0.57244
[uNA/3-HANA]	0.407	0.438	1.0779	0.10828	0.327	0.251	0.5135	-0.38032	0.785	1.682	0.0459	1.09996
[uHANA/Trp]	0.057	0.079	1.3685	0.45264	0.056	0.091	0.1834	0.69951	0.036	0.030	0.6741	-0.24016
[u3-HANA/Kyn]	0.593	0.728	1.2263	0.29434	0.797	0.561	0.8279	-0.50588	0.149	0.095	0.2145	-0.64931
[u3-HANA/KA] <sup>a</sup>	0.238	0.345	1.4484	0.53442	0.165	0.234	0.4949	0.50281	0.159	0.032	0.0007	-2.29544
[u3-HANA/3-HK]	2.536	1.721	0.6786	-0.55931	3.464	1.999	0.8506	-0.79316	0.766	0.535	0.3441	-0.51605
[u3-HANA/XA] <sup>a</sup>	0.802	1.188	1.4820	0.56758	0.558	1.112	0.5714	0.99482	1.589	0.503	0.0008	-1.65863
[uXA/Trp] <sup>a</sup>	0.057	0.070	1.2256	0.29344	0.086	0.094	0.424	0.13363	0.024	0.073	0.0014	1.58715
[uXA/Kyn] <sup>a</sup>	0.664	0.790	1.1892	0.25002	0.813	1.134	0.5325	0.48063	0.129	0.189	0.0228	0.55509
[uXA/KA]	0.238	0.221	0.9278	-0.10813	0.237	0.214	0.5714	-0.14417	0.105	0.101	0.5325	-0.05461
[u3-HK/Trp]	0.025	0.041	1.6708	0.74058	0.018	0.026	0.1556	0.51465	0.043	0.046	0.5518	0.10737
[u3-HK/Kyn]	0.296	0.400	1.3499	0.43282	0.220	0.287	0.0215	0.38108	0.231	0.206	0.6542	-0.16415
[u3-HK/KA] <sup>a</sup>	0.100	0.131	1.3121	0.39190	0.063	0.068	0.7388	0.10309	0.212	0.050	0.0011	-2.08578
[uKyn/Trp]	0.084	0.082	0.9827	-0.02517	0.095	0.083	0.9422	-0.19976	0.180	0.228	0.3441	0.34184
[uCr]	6.850	5.400	0.7883	-0.34314	4.800	7.300	0.2839	0.60486	9.150	8.600	0.7553	-0.08944

Log<sub>2</sub>(FC): Log<sub>2</sub> fold change; (a): p-value < 0.05 at 24h after CPB

Parent-to-metabolite ratios were expressed in  $\mu\text{M } \mu\text{M}^{-1}$ . uCr: urinary creatinine expressed in  $\text{mmol L}^{-1}$

## **Etude 2. Suivi de l'activité de la voie des kynurénines dans un modèle porcin de glomérulonéphrite aiguë extra-capillaire**

*Time course profiling of the kynurenine pathway activity in a pig model of crescentic glomerulonephritis.*

*Nadour Z, Dang J, Resmini L, Poindessous V, Tharaux PL, Pallet N*

*Am J Physiol Renal Physiol. Manuscrit soumis juillet 2023 (F-00188-2023)*

### **OBJECTIF DE L'ETUDE**

La GNC est l'expression histologique d'un spectre de maladies rénales auto-immunes et inflammatoires agressives de multiples étiologies, résultant de l'accumulation de cellules inflammatoires et de fibrine dans le glomérule [310]. La vascularite à ANCA est la cause la plus courante de GNC dans le monde [310]. Expérimentalement, le modèle le plus largement utilisé pour la GNC associée aux ANCA est la néphrite sérique néphrotoxique (NTN), dans laquelle des anticorps hétérologues anti-GBM (membrane basale glomérulaire) agissent comme un antigène stimulant dans les glomérules. Ce modèle entraîne des lésions similaires et fournit des informations sur les mécanismes de la GNC associée aux ANCA. Au cours de la GNC, la voie des kynurénines est activée dans le rein, et l'IDO joue un rôle protecteur en régulant la réponse immunitaire et en prévenant l'inflammation excessive [246,311,312]. Étant donné que les métabolites du TRP produits dans le rein sont libérés dans l'urine et la circulation sanguine, la quantification des métabolites de la voie des kynurénines pourrait constituer une approche cliniquement intéressante pour suivre l'activité de la GNC dans le rein. L'objectif de cette étude est de décrire les variations de la voie des kynurénines dans le plasma et l'urine dans un modèle porcin de GNC à la recherche de biomarqueur spécifique de la maladie.

### **METHODES ET RESULTATS**

Pour étudier l'activité de la voie des kynurénines au cours de la GNC, nous avons réalisé une étude longitudinale sur une cohorte de 12 cochons avec GNC pendant un mois après l'induction de la maladie avec deux injections successives de sérum néphrotoxique (NTS). Le porc domestique (*Sus scrofa domesticus*) offre une opportunité pour comprendre la maladie humaine, car il est proche de l'Homme sur le plan de son système immunitaire et de sa physiologie rénale. Des augmentations temporaires de la créatinine et de l'urée plasmatiques, ainsi que de la protéinurie étaient observées au 7<sup>ème</sup> jour après l'induction de la GNC. L'analyse histologique des biopsies rénales au 28<sup>ème</sup> jour a confirmé la présence de lésions glomérulaires et tubulaires, et d'inflammation interstitielle avec fibrose rénale. Ces résultats permettaient de s'assurer de la validité du modèle porcin de GNC.

Nous avons quantifié par LC-MS/MS dans les échantillons plasmatiques et urinaires des cochons étudiés, le TRP et 7 autres métabolites de la voie des kynurénines : la KYN, la 3-HK,



le KA, le XA, le 3-HANA, le QA et le PIC. Les échantillons sanguins et urinaires étaient réalisés avant l'induction de la GNC (jour 0), puis au 7<sup>ème</sup> jour, 14<sup>ème</sup> jour, 21<sup>ème</sup> jour et 28<sup>ème</sup> jour après l'induction de la GNC. Nous avons montré que les variations plasmatiques de TRP, KYN, 3-HK, et QA n'étaient pas statistiquement significatives, ce qui suggère que la mesure de ces métabolites dans le plasma n'est pas informative pour le suivi de l'activité de la GNC. Par ailleurs, les niveaux du ratio urinaire KYN/TRP au 7<sup>ème</sup> jour étaient significativement augmentés par rapport au niveau basal (jour 0), ce qui suggérait une activité élevée de l'IDO aux premières phases de la GNC. De plus, le ratio urinaire KYN/TRP était indépendant des niveaux de la protéinurie, ce qui fait de lui un marqueur potentiel de la phase précoce de la GNC.

Nous avons ensuite étudié l'impact de la GNC sur l'activité de 4 enzymes critiques de la voie des kynurénines dans le rein en phase tardive de la maladie. Pour cela, l'expression transcriptionnelle des enzymes IDO, KMO, QPRT et ACMSD était mesurée dans les reins entiers de 8 cochons sacrifiés au 28<sup>ème</sup> jour après l'induction de la GNC. Nous avons constaté une augmentation non significative des niveaux du transcrit *ido* en corrélation avec la créatininémie et la sévérité de la maladie au 28<sup>ème</sup> jour après l'induction de la maladie (estimée par le pourcentage de fibrose rénale). Malgré l'absence de signification statistique, cette tendance à l'augmentation des niveaux du transcrit *ido* pourrait laisser supposer une possible corrélation entre la gravité des lésions rénales chroniques et une augmentation de l'activité de l'IDO. Les niveaux de *kmo* et *qprrt* n'étaient pas corrélés à la fonction et aux lésions rénales, tandis que l'expression de *acmsd* était diminuée de manière significative dans les reins les plus atteints. Comme l'ACMSD convertit l'AMCS en PIC, ces résultats suggèrent une redirection de la voie des kynurénines vers la synthèse *de novo* du NAD en phase tardive de la GNC.

## CONCLUSION

Cette étude a confirmé l'activation de la voie des kynurénines lors de la GNC sur un modèle porcin. Elle a mis en évidence, pour la première fois, que le suivi plasmatique des métabolites de la voie des kynurénines est peu utile dans le contexte de la GNC, tandis que l'analyse de l'urine représente une source potentielle de marqueurs de l'activité de la maladie glomérulaire. Plus précisément, une augmentation du ratio KYN/TRP dans l'urine pourrait refléter une activité inflammatoire précoce de la maladie.

### **Publication n° 3**

Time course profiling of the kynurenine pathway activity in a pig model of crescentic glomerulonephritis

**Zahia Nadour**, Julien Dang, Léa Resmini, Virginie Poindessous, Pierre-Louis Tharaux, Nicolas Pallet.

**Soumis dans: American Journal of Physiology-Renal Physiology (Juillet, 2023)**

1 **Time course profiling of the kynurenine pathway activity in a pig model of**  
2 **crescentic glomerulonephritis**

3 Zahia Nadour<sup>1,2</sup>, Julien Dang<sup>3</sup>, Léa Resmini<sup>3</sup>, Virginie Poindessous<sup>1</sup>, Pierre-Louis Tharaux<sup>3</sup>,  
4 Nicolas Pallet<sup>1,2,4</sup>

- 5 1. Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM U1138, Université Paris Cité, Paris, France  
6 2. Department of Clinical Chemistry, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Georges Pompidou  
7 European Hospital, Paris, France  
8 3. Paris Cardiovascular Centre (PARCC), Inserm, Université Paris Cité, 56 rue Leblanc, F-  
9 75015, Paris, France  
10 4. Department of Nephrology, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Georges Pompidou  
11 European Hospital, Paris, France

12

13 Zahia Nadour and Julien contributed equally  
14 Pierre-Louis Tharaux and Nicolas Pallet are co senior authors

15

16

17

18

19

20

21

**Correspondence**

22 Pr. Nicolas Pallet  
23 INSERM UMRS1138, Centre de Recherche des Cordeliers  
24 15 rue de l'Ecole de Médecine  
25 75006 Paris, France  
26 Phone: +33156092435; Fax: +33156093393  
27 E-mail: Nicolas.pallet@aphp.fr

28

29 **Running head:** The kynurenine pathway in glomerulonephritis

30 **Abstract**

31 The kynurenine (KYN) pathway (KP) is activated during acute kidney diseases including  
32 crescentic glomerulonephritis (CGN), an immune-mediated life-threatening syndrome  
33 characterized by a rapid loss of renal function. The non-invasive measurement of metabolites  
34 of the KP could have clinical diagnostic or prognostic value but has never been studied  
35 systematically and with sensitive analytical tools in a clinically relevant model. We recently  
36 developed and validated a sensitive and rapid liquid chromatography-tandem mass  
37 spectrometry (LC-MS/MS) to measure a comprehensive panel of Tryptophan (TRP)  
38 catabolism intermediates in blood and urine. We have developed a novel model of CGN in  
39 order to approach the biochemical and physiological parameters of humans as closely as  
40 possible. We show that over a period of 28 days after illness onset, monitoring plasma KP is  
41 not very informative as it likely reflects accumulation of uremic retention solutes, and does  
42 not make it possible to follow the activity of the disease over time. Conversely, the urinary  
43 metabolic profile is remarkable with an early and transient increase in urinary KYN (alone or  
44 relative to that of TRP). Urinary KYN/TRP ratio levels are independent of proteinuria and  
45 could reflect the activity of inflammatory lesions in the injured kidney. These findings suggest  
46 that increased urinary KYN/TRP ratio in patients with CGN could reflect early disease  
47 activity.

48 **Note and noteworthy**

49 The kynurenine pathway (KP) is activated in the kidney upon crescentic glomerulonephritis  
50 (CGN). A comprehensive metabolic profiling of KP metabolites over time in the plasma and  
51 urine of pigs with CGN has never been done. We show that an increased urine KYN/TRP  
52 ratio reflect early disease inflammatory activity and a decreased urine QA/TRP ratio reflect  
53 increased metabolic flux through the NAD<sup>+</sup> *de novo* synthesis pathway. Monitoring the KP  
54 activity in plasma is of no interest.

55

56 **Keywords**

57 Crescentic glomerulonephritis, kynurenine, pig, kidney injury, tryptophan

58

59

## 60 Introduction

61 Kidneys are one of the main organs involved in the formation, degradation and excretion of  
62 tryptophan (TRP) end-products. Data from experimental models and clinical studies have  
63 implicated the kynurenine pathway (KP) activity as a critical determinant of kidney health and  
64 disease on its ability to respond to various stressors in numerous models of acute and  
65 chronic kidney injuries, of, but not limited to, autoimmune and inflammatory origins [1–3].

66 The KP starts with tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) in the liver and indoleamine 2,3-  
67 dioxygenase (IDO) elsewhere in the body, which catalyzes the first and rate-limiting step of  
68 TRP catabolism in mammals [4] (**Figure S1**). IDO1 is mainly expressed in cells of the  
69 immune system, but also in renal epithelial cells, and its expression is induced by  
70 inflammatory cytokines. IDO1 catalyzes the cleavage of the TRP pyrrole ring to N-formyl  
71 kynurenine, driving the production of kynurenine (KYN). KYN is metabolized to kynurenic  
72 acid (KA) by kynurenine aminotransferase (KAT). KYN as well as KA are activating ligands of  
73 aryl hydrocarbon receptor (AhR), a potent immunosuppressive transcription factor promoting  
74 an immunosuppressive state in the inflammatory microenvironment, mainly through the  
75 stimulation of the differentiation of T cells to the immunosuppressive FoxP3-positive Tregs  
76 [5]. Kynurenine 3-monooxygenase (KMO) is a rate-limiting enzyme for the downstream  
77 catabolism of KYN to 3-hydroxykynurenine (3-HK). A decline in the activity of KMO increases  
78 the levels of KYN and KA and promotes AhR-induced immunosuppression. Kynureninase  
79 (KYNU) converts 3-HK to 3-hydroxyanthranilic acid (3-HANA) which is metabolized to  
80 quinolinic acid (QA) or picolinic acid (PIC) from the metabolic intermediate 2-amino-3-  
81 carboxymuconic semialdehyde (ACMS). QA is a uremic retention solute that exerts  
82 neurotoxic effects in inflammatory conditions. On the other hand, it is the substrate for the *de*  
83 *nov*o synthesis of the cytoprotective molecule Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>)  
84 through the bottleneck enzyme quinolinolate phosphoribosyl transferase (QPRT). PIC  
85 functions are less understood, but it could have antagonistic properties towards the toxic  
86 effects of QA. Cellular QA and PIC levels depend on the activity of amino-β-  
87 carboxymuconate-semialdehyde-decarboxylase (ACMSD), which is highly expressed in the  
88 kidney, and channels the production of PIC from ACMS. The non-enzymatic rearrangement  
89 of ACMS into QA occurs when ACMSD is saturated with substrate allowing the production of  
90 QA. ACMSD is therefore a key enzyme directing KYN metabolism towards PIC and taking it  
91 away from *de novo* NAD<sup>+</sup> production.

92 Crescentic glomerulonephritis (CGN) is the histological expression of a spectrum of  
93 aggressive kidney diseases of multiple etiologies that results from infiltration of inflammatory  
94 cells into the glomerular tuft and accumulation of cells and fibrin in Bowman's space [6]. It is

95 usually diagnosed when more than 50% of the glomeruli are affected and clinically manifests  
96 as rapidly progressive glomerulonephritis [6]. Anti-glomerular basement membrane (anti-  
97 GBM) glomerulonephritis (GN), also known as Goodpasture's syndrome, is one of the  
98 earliest recognized autoimmune diseases in humans and cause of CGN. The responsible  
99 antigen has been identified as the  $\alpha 3$  chain of type IV collagen of the GBM [7–9]. The most  
100 widely used model for CGN is nephrotoxic serum nephritis (NTN), in which heterologous anti-  
101 GBM antibodies act as a stimulating antigen in the glomeruli. This model shares clinical  
102 features with human anti-GBM disease, including proteinuria, hematuria, and linear  
103 deposition of IgG along the GBM [10,11]. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-  
104 associated vasculitis is the most common cause of CGN worldwide [12]. Experimentally, the  
105 most widely used model for ANCA-associated CGN is NTN, which results in similar lesions,  
106 but does not recapitulate ANCA-associated CGN mechanisms. Previous studies have shown  
107 that the KP is activated in the kidney upon CGN and that IDO1 plays a protective role in CGN  
108 by regulating immune responses and preventing excessive inflammation [13–15]. Since the  
109 metabolites of TRP produced in the kidney are released in urine and in the circulation,  
110 monitoring the KP is a clinically relevant approach to follow the activity of CGN in the kidney.

111 In this study, we used a novel pig model of CGN to investigate the activity of the KP over one  
112 month after the beginning of the disease. The domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) provides  
113 a valuable opportunity to gain insights into the human disease and it is close to the man with  
114 regard to renal anatomy and physiology, and the porcine immune system is well  
115 characterized and highly resembles that of human [16–18]. To do this, we applied a recently  
116 developed and validated sensitive and rapid liquid chromatography-tandem mass  
117 spectrometry (LC-MS/MS) method for the simultaneous determination of TRP and 7  
118 metabolites of KYN pathway [19], including KYN, 3-HK, KA, xanthurenic acid (XA), 3-HANA,  
119 QA, and PIC in both plasma and urine.

## 120 **Methods**

### 121 ***Animal experiments***

122 Fourteen (14) female wild-type domestic pigs (*Sus scrofa domesticus*) and six sheep were  
123 used in this study. All animal procedures were performed following the European Community  
124 guidelines (L358–86/609EEC) and were approved by the Institut National de la Santé et de  
125 la Recherche Médicale and the Ministry for Higher Education and Scientific Research  
126 (APAFIS#25526-2020061917538762). The animals were housed individually in the Center  
127 for Biomedical Research facilities from the National Veterinary School of Maison-Alfort  
128 (France) (authorization G-94-046-02).

129

130 ***Preparation of sheep anti-pig GBM serum (Nephrotoxic serum)***

131 Sheep nephrotoxic serum (NTS) containing polyclonal anti-pig glomerular basement  
132 membrane (GBM) antibodies were obtained by xeno-immunization as previously described in  
133 rodents [20]. Whole kidneys were obtained from two healthy pigs. Cortical tissues were  
134 dissected and digested in type I collagenase (17100-017, GIBCO). The tissue samples were  
135 then filtered through several sieves. Samples with adequate purification (>80% of glomeruli)  
136 were mixed, centrifuged, and resuspended in ultrapure water to induce hypotonic cell  
137 swelling and lysis and to eliminate intracellular proteins from the supernatant. The remaining  
138 proteins, essentially from GBM, were dissociated from the cellular debris by ultrasonication  
139 (Vibra-Cell, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA) on ice. Six sheep were immunized  
140 with the GBM extract by four weekly intradermal injections (1 mg of proteins, in complete  
141 Freund's adjuvant), followed by one intravenous infusion (1 mg of proteins, without Freund's  
142 adjuvant) 4 weeks after the last intradermal injection.

143 Serum was taken from living sheep one week later before to be sacrificed after anesthesia.  
144 Immunofluorescence tested each individual serum for GBM specificity in the pig's kidney  
145 section. Specific sera were pooled and centrifuged. Finally, the supernatant was heat-  
146 inactivated in a water bath and filtered twice with 0.45 and 0.20 µm membranes  
147 consecutively. Aliquots of NTS were stored frozen (– 80°C) until the experiment.

148 ***Induction of crescentic glomerulonephritis***

149 We used the accelerated anti-GBM CGN model as described in rodents [20]. Two to three-  
150 month-old pigs (n =12) were pre-immunized with a subcutaneous injection of 500 µg of  
151 purified sheep IgG (I5131, Sigma) diluted in 1 mL of sterile PBS and 1 mL of complete  
152 Freund's adjuvant (F5881, Sigma), 7 days before the beginning of the protocol. Each  
153 individual received an intramuscular injection of NTS on two consecutive days (0.15 mL/kg of  
154 body weight on day 0 and 0.3 mL/kg of body weight on day 1 to induce an accelerated CGN  
155 model. The animals were sacrificed after anesthetized on day 28. The kidney tissue  
156 specimens were collected and stored in a – 80 °C after liquid nitrogen quick-freezing.

157 ***Plasma and urine samples***

158 Blood and urine samples were collected from pigs by ear vein under anesthesia and  
159 Transurethral catheter placed under anesthesia at the beginning of the study. The collection  
160 of blood and urine was done at day 0 and then once a week (days 7, 14, 21, and 28). Blood  
161 samples were collected into spray-coated lithium heparin containing tubes (BD Vacutainer®  
162 PSTTM, Becton Dickinson and Com pany, Le Pont de Claix, France). Samples were  
163 centrifuged at 2000 g at + 4 °C for 8 min and, and the plasma samples were stored at – 80  
164 °C. The urine was sampled directly from the catheter with a syringe into BD V-Monovette®

165 Urine (Sarstedt Company, Nümbrecht, Germany), then centrifuged at 2000 g at + 4 °C for 8  
166 min, and stored at – 80 C.

### 167 ***Biochemistry analyses***

168 The urine and plasma measurements were performed at the Clinical Chemistry Department  
169 of the Georges Pompidou European Hospital (Paris, France). Blood concentrations of  
170 creatinine and urea and urinary concentrations of creatinine and, proteins were determined  
171 by enzymatic methods using AU 5800 analyzer (Beckman Coulter France S.A.S, Villepinte,  
172 France).

### 173 ***Targeted metabolites analysis by LC-MS/MS***

174 Plasma metabolites analysis could only be performed on 8 NTS pigs, and urine metabolites  
175 analysis was done on 11 NTS pigs (**Table S1**). The protocol has been previously described  
176 [19]. 50 µL of pure plasma or urine samples diluted at 1:1 in 0.1 % formic acid in water were  
177 spiked with 25 µL of internal standard solution and precipitated with 250 µL of ice-cold  
178 methanol. The solution was then homogenized and centrifuged for 10 min at 13,000 g at 4°C.  
179 200 µL of the supernatant was then evaporated under nitrogen stream and the dry residue  
180 was reconstituted with 80 µL of 0.1 % formic acid in water. 60 µL were directly transferred to  
181 a 96-well plate for LC-MS/MS analysis of QA, 3-HK, XA, PIC, and 3-HANA. To analyze TRP,  
182 KYN and KA, 10 µL were transferred to a 96-wells plate containing 90 µL of 0.1 % formic  
183 acid in water. The 96-wells plate was homogenized, centrifuged for 3 min at 4000 g at 4°C  
184 then analyzed by LC-MS/MS. 3 µL of injected volume was separated on an ACQUITY UPLC  
185 HSS T3 C18 column (100 × 2.1 mm i.d., 1.8 µm particle size, Waters, Saint-Quentin-en  
186 Yvelines, France) preheated at 40°C. The metabolites were separated over a gradient from 0  
187 % of 0.1 % formic acid in water to 90 % of 0.1 % formic acid in MeOH at a flow rate of 0.5 mL  
188 min<sup>-1</sup> for 17 minutes. Compounds were detected using an LCMS-8060 triple quadrupole  
189 mass spectrometer (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France) as described [19].  
190 Data acquisition and data post-processing were performed using LabSolutions™ LCMS  
191 Software, version 5.97 SP1 (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France).

### 192 ***Pig kidney histological staining***

193 Paraffin-embedded sections were stained using standard histology procedures [21,20].  
194 Kidney morphology was assessed through Masson's trichrome staining and Sirius red  
195 staining. The extent of fibrosis was quantified in fixed kidney sections stained with Sirius red  
196 (**Table S2**) using the following formula: Percentage of fibrotic area (stained positively with  
197 Sirius red) = (Area of Fibrotic Tissue / Total Analyzed Tissue Area) x 100.

198

199



200 ***Pig Kidney mRNA extraction and RT-qPCR***

201 Kidney biopsies from sacrificed pigs were conserved in 5 mL conical tubes at -80°C. Two (2)  
202 mm<sup>3</sup> of kidney biopsy were disrupted and homogenized in 600 µL of RLT buffer (Qiagen)  
203 using TissueLyser II (Qiagen). Supernatants were stored at – 80°C until mRNA extraction.  
204 Total RNA was extracted from the Supernatants using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and  
205 reverse-transcribed into cDNAs using TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied  
206 Biosystems) according to the manufacturer's protocols. Transcript expression levels were  
207 quantified through SYBR Green RT-qPCR using a Kit QuantStudio 12K (Applied  
208 Biosystems). The fold changes for each tested gene were normalized to the ribosomal  
209 protein L13a housekeeping gene. The relative expression levels were calculated using the 2<sup>-</sup>  
210  $\Delta\Delta CT$  method [22]. Primer sequences are listed in **Table S3**.

211 ***Statistical analyses***

212 Graphs and statistical analyses were generated using GraphPad Prism 9 Software  
213 (GraphPad Software, Inc.). Data are reported as median ± 95% confidence interval. Number  
214 of samples assayed in each experiment is indicated in the Figure Legends. ANOVA (Mixed  
215 effects model analysis) was used to perform repeated measures over time with missing  
216 values and was followed by a Dunnett's multiple comparisons test for multiple comparisons  
217 against the control condition (Day 0). Pearson correlation coefficient was used to measure of  
218 linear correlation between two sets of data. A p value < 0.05 was considered to represent a  
219 statistically significant difference.

220 **Results**

221 **Pig CGN model validation**

222 Twelve (12) pigs were included in the study (**Table S1**). One pig did not have any plasma  
223 and urine collection available for KP metabolic profiling. Three other pigs did not have any  
224 plasma collection available for KP metabolic profiling. Therefore, 8 pigs were analyzed for  
225 monitoring of kidney function parameters and KP monitoring, both in blood or urine. In this  
226 cohort, 2 pigs died between day 25 and day 28, and blood and urine samples could not be  
227 collected for KP metabolite profiling at day 28. The cause of death is unknown, but their last  
228 plasma creatinine was 2089 µmol/l and 3630 µmol/l respectively.

229 Kidney function parameters (plasma creatinine, plasma urea and proteinuria) were measured  
230 at day 0, 7, 14, 21 and 28 days after NTS injection (day 0) (**Figure 1A**). NTS injection  
231 triggered a significant and transient raise in plasma creatinine et urea with a peak at day 7  
232 and a partial resolution thereafter (**Figure 1 B and C**), albeit the response was  
233 heterogenous. As expected, NTS injection was followed by the appearance of a high-flow

234 proteinuria, testifying to the glomerular lesions induced by the inflammatory reaction (**Figure**  
235 **1D**). This proteinuria was maximal on average at day 7 and tends to persist during follow-up,  
236 although less severe. Glomerular injury was confirmed by histological analysis of Masson's  
237 trichrome-stained and Sirius red's renal biopsies from sacrificed NTS pigs on day 28. Pigs  
238 immunized with sheep anti-pig GBM serum exhibited extracapillary proliferation (crescentic  
239 glomerulonephritis), as well as signs of tubular and glomerular lesions and interstitial  
240 inflammation (**Figure 1E, Table S2**). These results indicate that NTS injection in pig was  
241 responsible for a CGN a variable severity, with an acute kidney injury (AKI) and high-grade  
242 proteinuria.

#### 243 **Blood metabolic profiling of KP intermediates after CGN induction**

244 Numerous metabolites (KA, XA, 3-HANA, and PIC) were detected in plasma, but could not  
245 be quantified with our highly sensitive LC-MS/MS method (not shown, and **Table S4** for limits  
246 of detection and quantification). Serum TRP and KYN levels decreased at day 7 and  
247 returned to normal levels after that (**Figure 2A and 2B**). Conversely 3-HK and QA levels  
248 were increased on day 7 and returned to normal values thereafter (**Figure 2C and 2D**).  
249 These variations were not statistically significant, maybe due to a lack of power, but are  
250 consistent with similar profiles described in acute or chronic renal failure of various etiologies,  
251 in line with the fact that KP intermediates are known uremic retention solutes [23]. The  
252 plasma KYN/TRP ratio, an equivocal marker IDO activity, was not affected by CGN (**Figure**  
253 **2E**).

#### 254 **Urine metabolic profiling of KP intermediates after CGN induction**

255 In urine, all the 8 KP metabolites targeted by our method were successfully quantified and  
256 were expressed as a ratio to urinary creatinine. Urine TRP, KYN, KA, 3-HK and QA levels  
257 peaked at day 7 and subsequently decreased, but only urine TRP and urine KYN levels at  
258 day 7 were significantly increased compared to baseline (**Figure 3A to H**). We thus  
259 monitored the urine KYN/TRP ratio, which may reflect IDO activity in the kidney [15]. urine  
260 KYN/TRP ratio was significantly increased at day 7 and returned to baseline values after  
261 (**Figure 4A**), suggesting that IDO activity is high at the early phases of CGN. Importantly, the  
262 urine KYN/TRP ratio was independent of proteinuria levels (as TRP and KYN bind to albumin  
263 [24] (**Figure 4H**). In turn, ratio to TRP with urine metabolites downstream of KYN, XA/TRP  
264 and 3-HANA/TRP, were decreased, which may be indicative of a decreased in KMO activity,  
265 as described in inflammatory reactions (**Figure 4 C to E**). Finally, we observed that urine  
266 QA/TRP and urine PIC/TRP levels were decreased in the early phase of CGN (**Figure 4F**  
267 **and G**), which may reflect an increased activity of QPRT and reduced activity of ACMSD in  
268 the early phase of CGN.

269

## 270 **KP enzymes expression in whole kidneys in the late phase of CGN**

271 We next tested if CGN affects KP enzymes activity in the kidney. To do this, we measured  
272 the transcriptional expression of 4 critical enzymes of this pathway: IDO, KMO, QPRT and  
273 ACMSD in the whole kidneys of 8 pigs sacrificed at day 28. We observed that *ido* transcripts  
274 levels were significantly increased with plasma creatinine and renal fibrosis, suggesting that  
275 the severity of the chronic renal lesions is correlated with increased IDO activity (**Figure 5A**  
276 **and B**). *kmo* and *qprrt* levels did not seem to be affected by kidney injury (**Figure 5C to F**).  
277 Finally, we observed a robust decrease in *ACMSD* expression in the most chronically injured  
278 kidneys (as reflected by plasma creatinine and renal fibrosis levels) (**Figure 5G and H**). As  
279 *ACMSD* converts ACMS to PIC, this suggest that the KP may be channeled to *de novo* NAD<sup>+</sup>  
280 synthesis in the late phase of CGN.

## 281 **Discussion**

282 CGN is a potentially life-threatening kidney disease that requires early diagnosis and  
283 treatment. In this study, we performed for the first time a comprehensive metabolic profiling  
284 of KP metabolites over time in plasma and urine of pigs with NTS-induced CGN. We show  
285 that the urine KYN/TRP ratio is a biomarker of the early phase of CGN activity, and that  
286 monitoring of plasma KP intermediates is poorly informative.

287 The domestic pig is close to human with regard to kidney anatomy and physiology, and  
288 immune system. Most of the proteins and cells of the immune system immune cells identified  
289 in both species are similar. Interestingly, pigs sometimes develop spontaneous systemic  
290 necrotizing vasculitis with CGN, either secondary to viral infections and possibly mediated by  
291 immune complexes [25]. Critically, animal non-congenic genetic backgrounds partly explain  
292 the various responses to NTS observed in this study, which strengthens our results because  
293 it mimics the disease severity heterogeneity of patients presenting with CGN.

294 Our results indicate that monitoring KP in plasma in this porcine model may not be a  
295 promising source of biomarkers of CGN activity because half of the metabolites of the panel  
296 could not be quantified, albeit the LC-MS/MS method is highly sensitive, and the levels of the  
297 quantifiable ones were not significantly impacted. It is not easy to interpret the variations  
298 observed here (relative decrease in plasma TRP and KYN) and increase in 3-HK and QA. A  
299 decrease in plasma TRP is classically observed in many models of AKI and chronic kidney  
300 disease (CKD), attributed primarily to IDO consumption, and often associated with an  
301 increase in concentrations of downstream metabolites, including KYN and QA. More  
302 specifically, high serum KYN levels with decreased TRP concentrations were found in

303 patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis, one of the causes of  
304 CGN in human [26]. However, the major difficulty in this situation is that the metabolites of  
305 KP are also mostly considered as uremic retention solutes or even uremic toxins and  
306 therefore the deconvolution of the impacts of increased IDO activity and a reduced renal  
307 clearance is not possible, as CGN promotes both IDO activity and kidney failure in the same  
308 time.

309 On the other hand, our results indicate that monitoring urine KP metabolites may provide  
310 useful information on the activity of CGN. Since the turnover of KP metabolites is highly  
311 determined by tubular excretion [14], they may serve as promising biomarkers of tissue KP  
312 activity in diagnosis and prognosis of CGN. An important result in our study is that the  
313 kinetics of the levels of most urinary metabolites affected by CGN is transient (in this model  
314 with a single trigger). This means that (1) inflammatory disease activity is not self-sustaining  
315 over the long term; (2) elevated urinary metabolites are markers of inflammatory activity in  
316 the kidney, and therefore could alert on the need of the initiation of immunosuppressive  
317 therapy, and (3) baseline values do not indicate the absence of CGN. Critically, our data  
318 support the notion that urine KYN/TRP ratio reflects IDO activity, and as such could be a  
319 potent non-invasive biomarker of the early phase of CGN. These findings are supported by  
320 experimental evidence. For example in a mouse model of CGN induced by NTS, an  
321 increased IDO activity was suspected by increased KYN/TRP ratio in kidney tissue and  
322 upregulated *IDO* gene expression in glomeruli and tubular epithelial cells [15]. Moreover,  
323 inhibiting IDO-mediated TRP catabolism using a 1-methyl tryptophan (1-MT) resulted  
324 increased glomerular crescent formation, macrophage infiltration, and intrarenal cell  
325 proliferation, significantly stimulating nephritis progression.

326 Metabolites in KP may contribute to the pathogenesis of CGN by modifying immune  
327 responses or by directly affecting kidney cell function. KYN suppresses T effector cell  
328 proliferation, and promotes the development of regulatory T cells [27]. The roles of specific  
329 KP metabolites may differ and have not been fully characterized. Elevated KYN level was  
330 found to promote mesangial cells proliferation, while the excess of 3-HK significantly  
331 suppresses mesangial cells proliferation [28]. In contrast, QA may increase mesangial cell  
332 proliferation and collagen synthesis. There is limited information on the role of PIC, which is  
333 an endogenous neuroprotectant, a natural iron and zinc chelator, which exerts  
334 immunomodulatory effects and can suppress the proliferation of CD4+ T cells [29].

335 Finally, our findings highlight the potent impact of CGN on the final steps of the TRP  
336 catabolic pathway, which involves the production of QA and PIC, and drives *de novo*  
337 synthesis of NAD<sup>+</sup>, which is a cytoprotective pathway. In the early phase of CGN, elevated

338 urine QA/TRP levels are compatible with an increased activity of QPRT, and potentially the  
339 production of intermediates for NAD<sup>+</sup> synthesis. Previous metabolomic studies suggested an  
340 elevated urine QA/TRP ratio as an indicator of reduced QPRT activity, and a predictor of  
341 septic/ischemic AKI and other adverse outcomes in critically ill patients [30]. As we observed  
342 that urine QA/TRP ratio levels were significantly decreased (rather than increased) in the  
343 early phase of CGN, this suggests that the interpretation of variation in urine QA/TRP ratio  
344 during AKI depends on its etiology. In addition, a decreased urine PIC/TRP ratio may  
345 reflect decreased ACMSD activity [29]. As ACMSD drives ACMS away from QA production  
346 and *de novo* NAD<sup>+</sup> synthesis, these results are in line with an increased metabolic flow  
347 through the *de novo* NAD<sup>+</sup> biosynthetic pathway.

348 This study has some limitations. The number of pigs included in the study was relatively  
349 small, which may limit the power of the study. Moreover, it was not possible to collect  
350 samples and perform explorations on all studied pigs. Finally, it is important to note that  
351 transcript measurements were not performed at the early phase of the disease, where  
352 metabolites were significantly different from day 0, which may limit the understanding of the  
353 disease progression.

354 In conclusion, we show for the first time, with a detailed analysis of KP metabolites in blood  
355 and urine overtime in a CGN model in pigs, that plasma monitoring in this context is of little  
356 use but that urine analyzes are a potential source of markers of activity of the glomerular  
357 disease. In particular, increased urine KYN/TRP ratio may reflect early disease  
358 inflammatory activity, and a decreased urine QA/TRP ratio may reflect increased metabolic  
359 flux through the *de novo* NAD<sup>+</sup> synthesis pathway.

#### 360 **Supplementary material**

361 Supplementary Figure 1

362 Supplementary Table 1

363 Supplementary Table 2

364 Supplementary Table 3

365 Supplementary Table 4

366 **Data availability statement:** complementary data can be provided by Nicolas Pallet or  
367 Pierre Louis Tharaux upon request

#### 368 **Study approvals**

369 Animal experiments were conducted according to French veterinary guidelines and those  
370 formulated by the European Commission for experimental animal use (L358–86/609EEC).

371 **Acknowledgments:** none

372 **Funding:** This project has been funded by a grant from the Département Médico Universitaire  
373 (DMU) Biophygen.

374 **Conflict of interest statement:** the authors have declared that no conflict of interest exists  
375

376 **Author contributions**

377 Zahia Nadour performed LC-MS/MS experiments

378 Julien Dang and Léa Resmini generated the NTS model

379 Virginie Poindessous performed qPCR

380 Pierre-Louis Tharaux and Nicolas Pallet designed the study and wrote the manuscript

381

382 **References**

383 [1] A. Mor, B. Kalaska, D. Pawlak, Kynurenine Pathway in Chronic Kidney Disease:  
384 What's Old, What's New, and What's Next?, *Int. J. Tryptophan Res.* 13 (2020)  
385 117864692095488. <https://doi.org/10.1177/1178646920954882>.

386 [2] I. Zakrocka, W. Załuska, Kynurenine pathway in kidney diseases, *Pharmacol. Rep.* 74  
387 (2022) 27–39. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00329-w>.

388 [3] H.N. Wee, J.-J. Liu, J. Ching, J.-P. Kovalik, S.C. Lim, The Kynurenine Pathway in Acute  
389 Kidney Injury and Chronic Kidney Disease, *Am. J. Nephrol.* 52 (2021) 771–787.  
390 <https://doi.org/10.1159/000519811>.

391 [4] A. Mellor, Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity, *Biochem.*  
392 *Biophys. Res. Commun.* 338 (2005) 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.232>.

393 [5] A. Salminen, Role of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) and kynurenine pathway in  
394 the regulation of the aging process, *Ageing Res. Rev.* 75 (2022) 101573.  
395 <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101573>.

396 [6] M.S. Parmar, K. Bashir, Crescentic Glomerulonephritis, in: *StatPearls*, StatPearls  
397 Publishing, Treasure Island (FL), 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430727/>  
398 (accessed March 28, 2023).

399 [7] R.J. Butkowski, J.P. Langeveld, J. Wieslander, J. Hamilton, B.G. Hudson, Localization  
400 of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen., *J. Biol.*  
401 *Chem.* 262 (1987) 7874–7877. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47648-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47648-X).

402 [8] R. Kalluri, V.H. Gattone, M.E. Noelken, B.G. Hudson, The alpha 3 chain of type IV  
403 collagen induces autoimmune Goodpasture syndrome., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994)  
404 6201–6205. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.13.6201>.

405 [9] J. Saus, J. Wieslander, J.P. Langeveld, S. Quinones, B.G. Hudson, Identification of the  
406 Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV, *J. Biol. Chem.* 263 (1988)  
407 13374–13380.

- 408 [10] C.D. Pusey, Anti-glomerular basement membrane disease, *Kidney Int.* 64 (2003) 1535–  
409 1550. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00241.x>.
- 410 [11] Y. Du, Y. Fu, C. Mohan, Experimental anti-GBM nephritis as an analytical tool for  
411 studying spontaneous lupus nephritis, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 56 (2008) 31–40.  
412 <https://doi.org/10.1007/s00005-008-0007-4>.
- 413 [12] A.E. Berden, F. Ferrario, E.C. Hagen, D.R. Jayne, J.C. Jennette, K. Joh, I. Neumann,  
414 L.-H. Noël, C.D. Pusey, R. Waldherr, J.A. Bruijn, I.M. Bajema, Histopathologic classification  
415 of ANCA-associated glomerulonephritis, *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 21 (2010) 1628–1636.  
416 <https://doi.org/10.1681/ASN.2010050477>.
- 417 [13] I. Zakrocka, W. Zaluska, Kynurenine pathway in kidney diseases, *Pharmacol. Rep.* 74  
418 (2022) 27–39. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00329-w>.
- 419 [14] H.N. Wee, J.-J. Liu, J. Ching, J.-P. Kovalik, S.C. Lim, The Kynurenine Pathway in Acute  
420 Kidney Injury and Chronic Kidney Disease, *Am. J. Nephrol.* (2021) 1–17.  
421 <https://doi.org/10.1159/000519811>.
- 422 [15] W. Hou, S. Li, Y. Wu, X. Du, F. Yuan, Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase-  
423 mediated tryptophan catabolism accelerates crescentic glomerulonephritis, *Clin. Exp.*  
424 *Immunol.* 156 (2009) 363–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03902.x>.
- 425 [16] W. Chareerntantanakul, J.A. Roth, Biology of porcine T lymphocytes, *Anim. Health Res.*  
426 *Rev.* 7 (2006) 81–96. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001235>.
- 427 [17] F. Meurens, A. Summerfield, H. Nauwynck, L. Saif, V. Gerdts, The pig: a model for  
428 human infectious diseases, *Trends Microbiol.* 20 (2012) 50–57.  
429 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.11.002>.
- 430 [18] K.H. Mair, C. Sedlak, T. Käser, A. Pasternak, B. Levast, W. Gerner, A. Saalmüller, A.  
431 Summerfield, V. Gerdts, H.L. Wilson, F. Meurens, The porcine innate immune system: An  
432 update, *Dev. Comp. Immunol.* 45 (2014) 321–343. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.022>.
- 433 [19] Z. Nadour, C. Simian, O. Laprévotte, M.-A. Lorient, I.A. Larabi, N. Pallet, Validation of a  
434 liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for simultaneous  
435 quantification of tryptophan and 10 key metabolites of the kynurenine pathway in plasma and  
436 urine: Application to a cohort of acute kidney injury patients, *Clin. Chim. Acta.* 534 (2022)  
437 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.07.009>.
- 438 [20] J.L. Morgado-Pascual, B. Suarez-Alvarez, V. Marchant, P. Basantes, P.-L. Tharaux, A.  
439 Ortiz, C. Lopez-Larrea, M. Ruiz-Ortega, S. Rayego-Mateos, Type IV Collagen and SOX9 Are  
440 Molecular Targets of BET Inhibition in Experimental Glomerulosclerosis, *Int. J. Mol. Sci.* 24  
441 (2022) 486. <https://doi.org/10.3390/ijms24010486>.
- 442 [21] A.B. Farris, C.D. Adams, N. Brousaides, P.A. Della Pelle, A.B. Collins, E. Moradi, R.N.  
443 Smith, P.C. Grimm, R.B. Colvin, Morphometric and Visual Evaluation of Fibrosis in Renal  
444 Biopsies, *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 22 (2011) 176–186.  
445 <https://doi.org/10.1681/ASN.2009091005>.
- 446 [22] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-  
447 Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method, *Methods.* 25 (2001) 402–408.  
448 <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- 449 [23] M.H. Rosner, T. Reis, F. Husain-Syed, R. Vanholder, C. Hutchison, P. Stenvinkel, P.J.  
450 Blankestijn, M. Cozzolino, L. Juillard, K. Kashani, M. Kaushik, H. Kawanishi, Z. Massy, T.L.  
451 Sirich, L. Zuo, C. Ronco, Classification of Uremic Toxins and Their Role in Kidney Failure,  
452 *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 16 (2021) 1918–1928. <https://doi.org/10.2215/CJN.02660221>.
- 453 [24] A.A.-B. Badawy, G. Guillemin, The Plasma [Kynurenine]/[Tryptophan] Ratio and  
454 Indoleamine 2,3-Dioxygenase: Time for Appraisal, *Int. J. Tryptophan Res.* 12 (2019)  
455 117864691986897. <https://doi.org/10.1177/1178646919868978>.

- 456 [25] P. Hélie, R. Drolet, M.C. Germain, A. Bourgault, Systemic necrotizing vasculitis and  
457 glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec, *Can. Vet. J. Rev. Veterinaire*  
458 *Can.* 36 (1995) 150–154.
- 459 [26] K.-M. Chavele, D. Shukla, T. Keteepe-Arachi, J.A. Seidel, D. Fuchs, C.D. Pusey, A.D.  
460 Salama, Regulation of myeloperoxidase-specific T cell responses during disease remission  
461 in antineutrophil cytoplasmic antibody–associated vasculitis: The role of Treg cells and  
462 tryptophan degradation, *Arthritis Rheum.* 62 (2010) 1539–1548.  
463 <https://doi.org/10.1002/art.27403>.
- 464 [27] A. Sharabi, G.C. Tsokos, T cell metabolism: new insights in systemic lupus  
465 erythematosus pathogenesis and therapy, *Nat. Rev. Rheumatol.* 16 (2020) 100–112.  
466 <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0356-x>.
- 467 [28] H. Yoshimura, T. Sakai, Y. Kuwahara, M. Ito, K. Tsuritani, Y. Hirasawa, T. Nagamatsu,  
468 Effects of kynurenine metabolites on mesangial cell proliferation and gene expression, *Exp.*  
469 *Mol. Pathol.* 87 (2009) 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.02.002>.
- 470 [29] A.A.-B. Badawy, Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and  
471 Functional Aspects, *Int. J. Tryptophan Res. IJTR.* 10 (2017) 1178646917691938.  
472 <https://doi.org/10.1177/1178646917691938>.
- 473 [30] A. Poyan Mehr, M.T. Tran, K.M. Ralto, D.E. Leaf, V. Washco, J. Messmer, A. Lerner, A.  
474 Kher, S.H. Kim, C.C. Khoury, S.J. Herzig, M.E. Trovato, N. Simon-Tillaux, M.R. Lynch, R.I.  
475 Thadhani, C.B. Clish, K.R. Khabbaz, E.P. Rhee, S.S. Waikar, A.H. Berg, S.M. Parikh, De  
476 novo NAD<sup>+</sup> biosynthetic impairment in acute kidney injury in humans, *Nat. Med.* 24 (2018)  
477 1351–1359. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0138-z>.

478

479

480

481



## 482 Figures legends

### 483 **Figure 1. Validation of the model of CGN in pigs**

484 **A.** Graphical description of the CGN model. 12 pigs were pre-immunized with a  
485 subcutaneous injection of purified sheep IgG, 7 days before the beginning of the protocol.  
486 Each individual received an intramuscular injection of NTS on two consecutive days to  
487 induce an accelerated CGN model. Blood and urine were collected at day 0, day 7, day 14,  
488 day 21 and day 28.

489 **B, C, D.** Serial measurement of plasma urea, plasma creatinine and proteinuria overtime in  
490 pigs after NTS injection. (n= 9 to 12 per group). Bars represent median  $\pm$  95% confidence  
491 interval. p values were computed with an ANOVA (mixed model analysis) followed by a  
492 Dunnett's multiple comparison test.

493 **E.** Representative images (left, Sirius red staining, and right, Masson's Trichrome staining)  
494 showing kidney lesions associated with CGN in the late phase (day 28) in NTS pigs:  
495 glomerular crescents (\*), interstitial inflammation and fibrosis (\*\*), tubular dilation and atrophy  
496 (\*\*\*) in pigs challenged with NTS after 28 days.

### 497 **Figure 2. Blood metabolic profiling of KP intermediates after CGN induction**

498 Serial measurement of plasma TRP, KYN, 3-HK, QA and KYN/TRP in pigs after NTS  
499 injection (n= 6 to 8 per group). Bars represent median  $\pm$  95% confidence interval. p values  
500 were computed with an ANOVA (mixed model analysis) followed by a Dunnett's multiple  
501 comparison test.  
502

### 503 **Figure 3. Urine metabolic profiling of KP intermediates after CGN induction**

504 Serial measurement of urine TRP, KYN, KA, 3-HK, XA, 3-HANA, PIC and QA in pigs after  
505 NTS injection (n= 8 to 11 per group). Bars represent median  $\pm$  95% confidence interval. p  
506 values were computed with an ANOVA (mixed model analysis) followed by a Dunnett's  
507 multiple comparison test.  
508

### 509 **Figure 4. Time-course monitoring of KP urine metabolites ratio during CGN**

510 **A-G.** Serial measurement of urine KYN/TRP, KA/TRP, 3-HK/TRP, XA/TRP, 3-HANA/TRP,  
511 PIC/TRP and QA/TRP in pigs after NTS injection (n= 8 to 11 per group). Bars represent  
512 median  $\pm$  95% confidence interval. p values were computed with an ANOVA (mixed model  
513 analysis) followed by a Dunnett's multiple comparison test.  
514

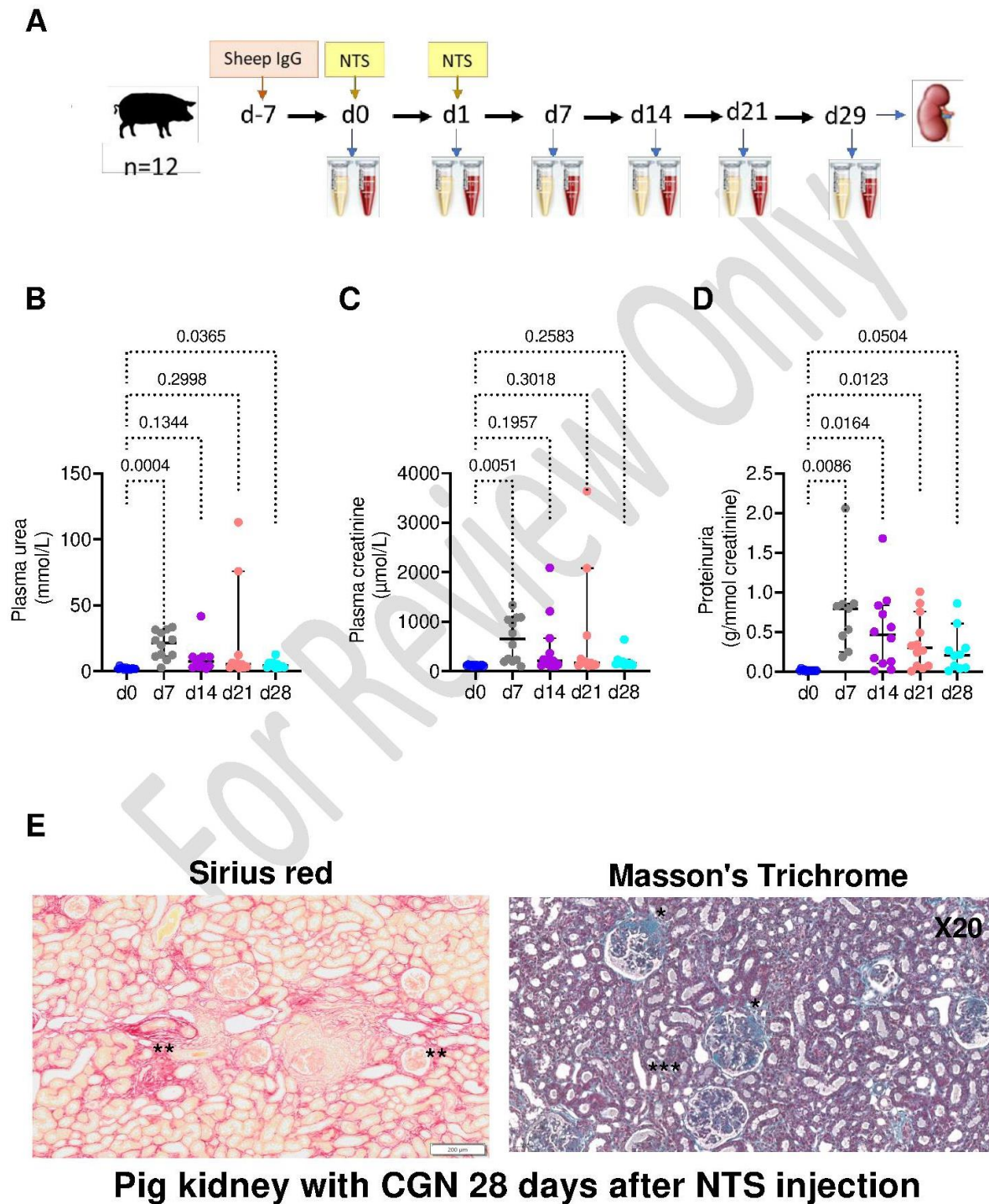
515 **H.** Correlation analysis (Pearson correlation) between urine KYN/TRP and proteinuria in 8  
516 pigs for which urine samples were available for both metabolic profiling and urine protein  
517 dosage.  
518

### 519 **Figure 5. Kidney expression of KP enzymes transcripts in the late phase of CGN**

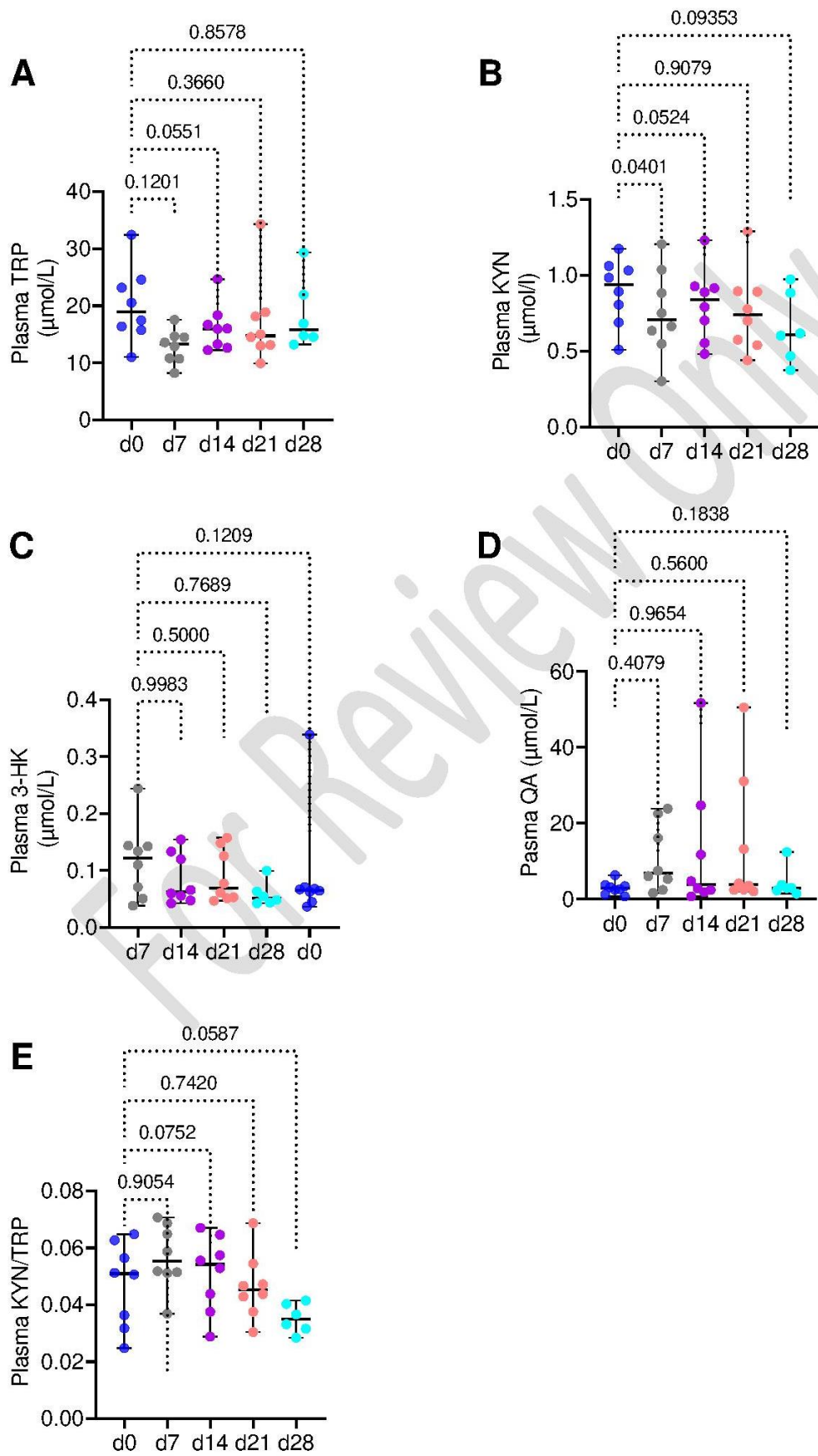
520 **A-H:** Correlation analysis (Pearson correlation) between *ido*, *kmo*, *qprt* and *acmsd*  
521 transcripts measured by q-PCR in the kidney cortex of 8 pigs 28 days after NTS injection and  
522 plasma creatinine or percentage of renal fibrosis.

523 **I.** Correlation analysis (Pearson correlation) between plasma creatinine and percentage of  
524 renal fibrosis in pigs at day 28 after NTS injection.  
525

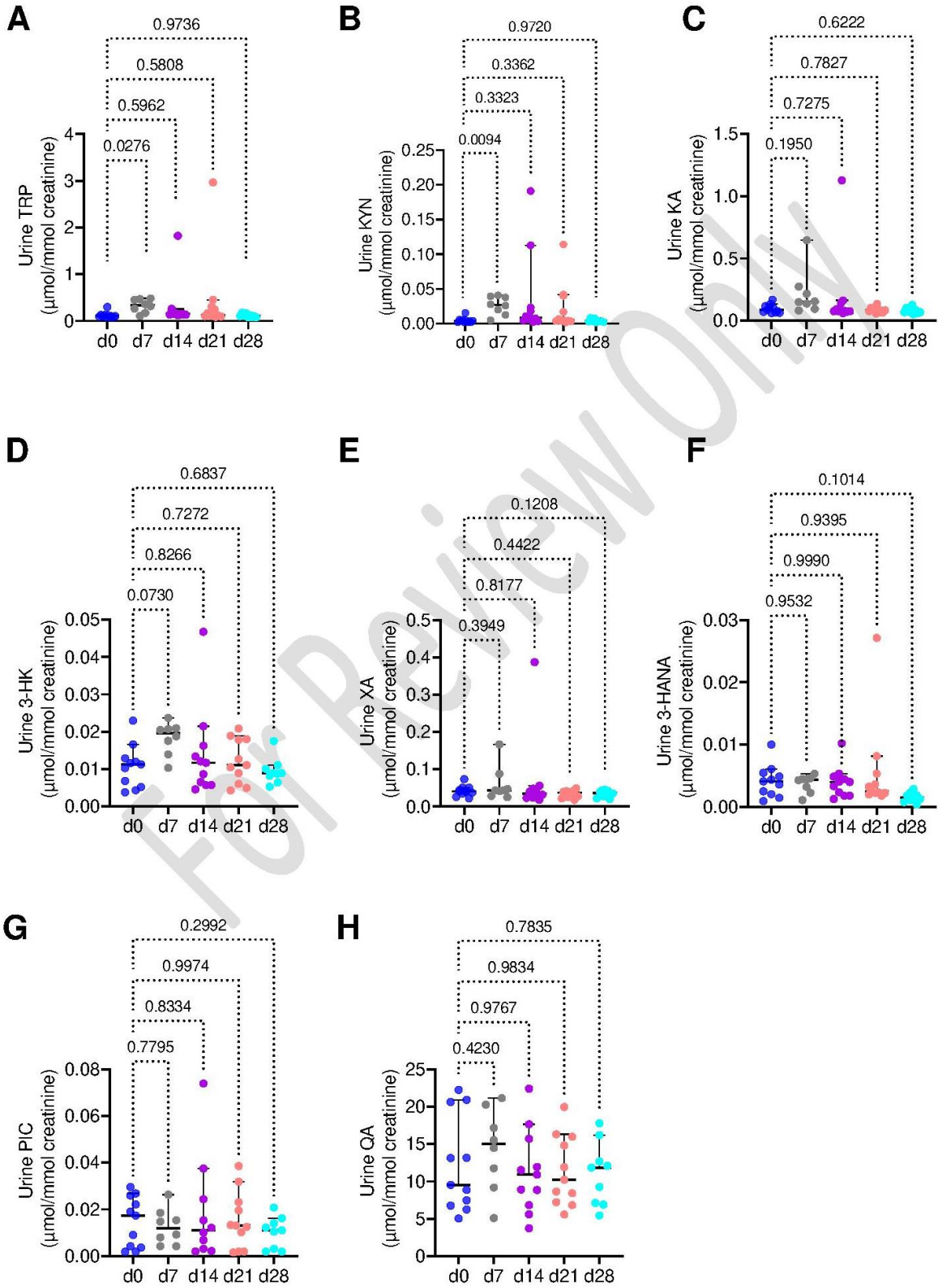
**FIGURE 1**



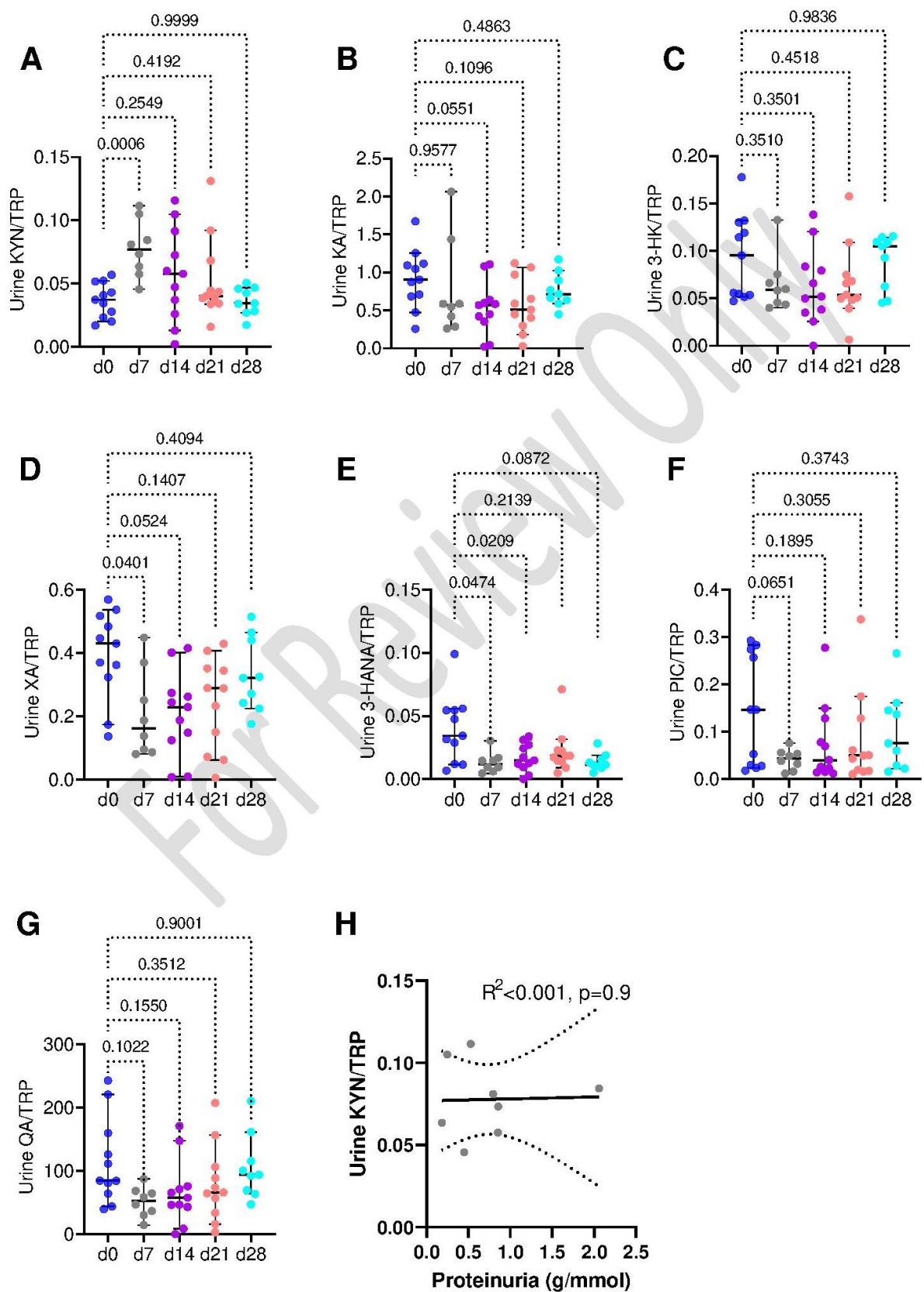
**FIGURE 2**



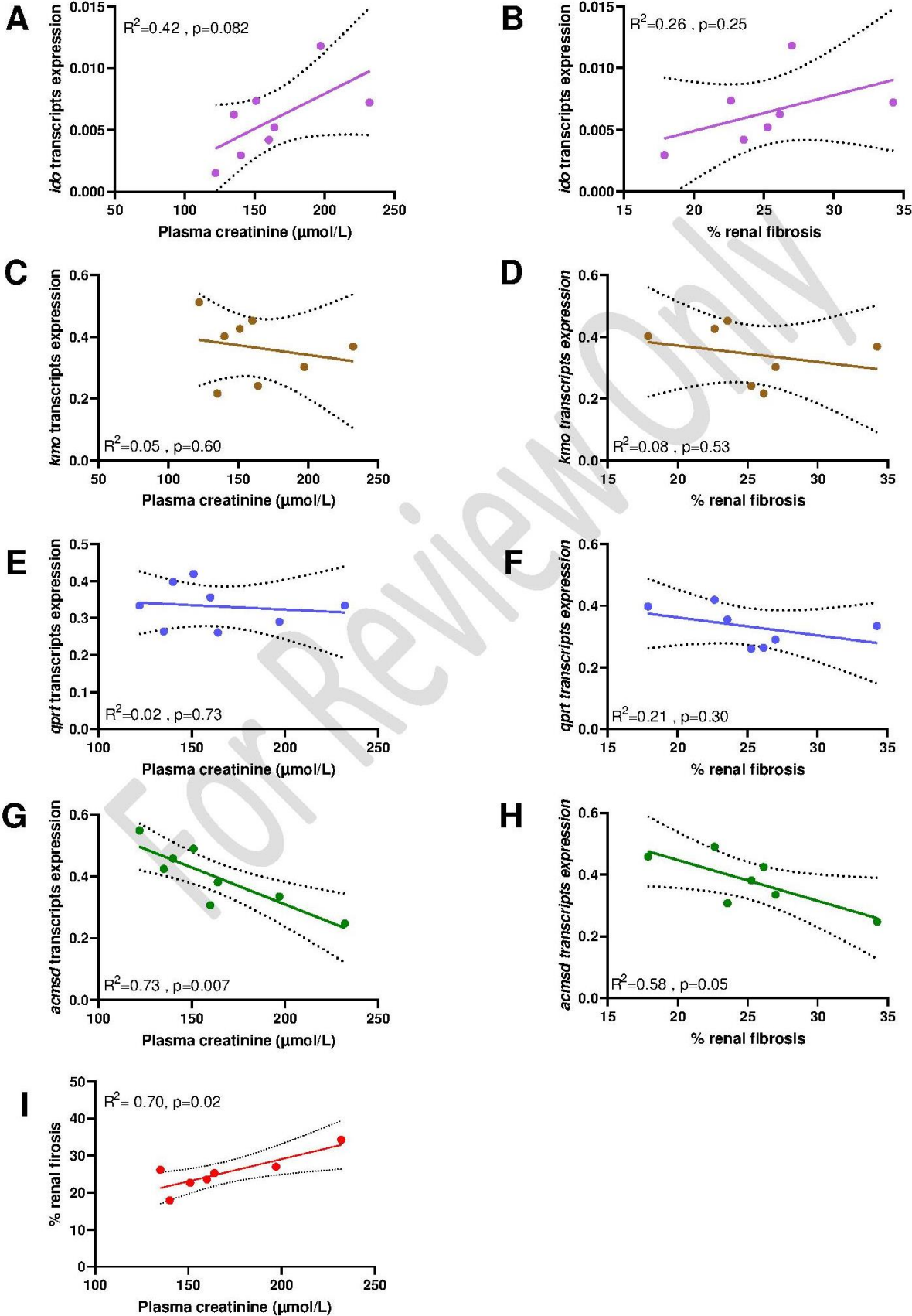
# FIGURE 3



**FIGURE 4**



# FIGURE 5



## Supplementary figures Legends

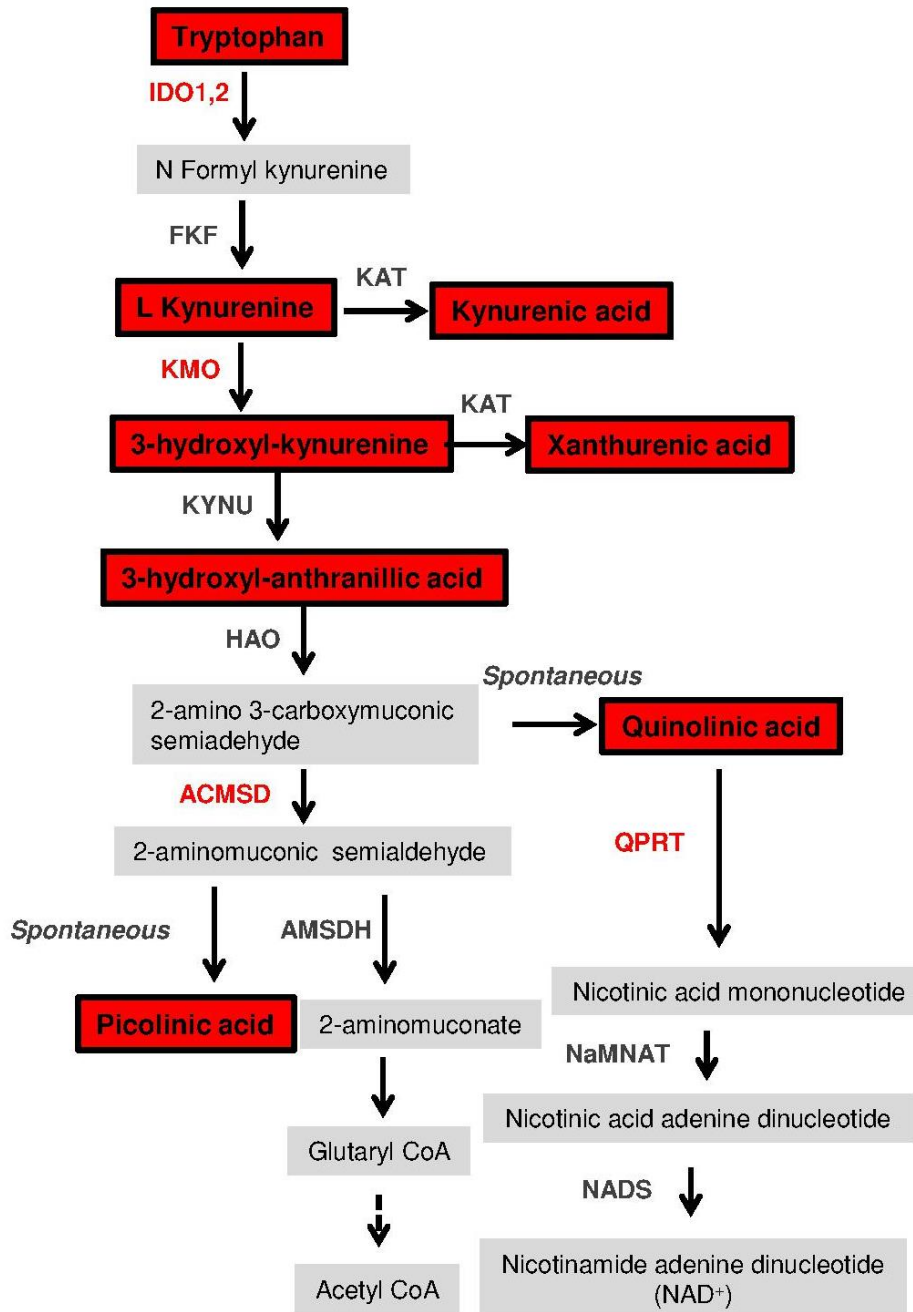
### Supplementary figure 1. Tryptophane catabolism pathway.

IDO. Indoleamine 2,3-dioxygenase; FKFB. N-formyl kynurenine formamidase; KAT. Kynurenine aminotransferase; KMO. Kynurenine 3- monooxygenase; KYNU. Kynureninase; HAO. 3-hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase; ACMSD. 2-amino-3-carboxymuconate-6- semialdehyde decarboxylase; AMSDH. 2-aminomuconate semialdehyde dehydrogenase; QPRT. Quinolinic acid phosphoribosyl transferase; NaMNAT. Nicotinic acid mononucleotide adenylyl transferase; NAS. NAD synthase.

In red are showed the metabolites measured in the study

For Review Only

Supplementary figure 1. Tryptophan catabolism through the kynurenine pathway





**Supplementary Table 1. Summary of analyses conducted on each pig in the study cohort**

Pigs	Body weight (Kg)					Plasma Biochemistry analysis					Urine Biochemistry analysis					Plasma Metabolites LC-MS/MS analysis					Urine Metabolites LC-MS/MS analysis					Kidney histological staining	Kidney transcript analysis	Day of death	
	d0	d7	d14	d21	d28	d0	d7	d14	d21	d28	d0	d7	d14	d21	d28	d0	d7	d14	d21	d28	d0	d7	d14	d21	d28	d29	d29		
N°1	30	33	30,5	31	ND	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	D	D	D	D	D	29
N°2	28.5	33.5	29	30.5	ND	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	D	D	D	D	D	29
N°3	24	26	26.5	28.5	30	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	29
N°4	28	31	30.5	32	ND	D	D	D	ND	D	D	N	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	D	N	D	D	D	D	D	D	29
N°5	22	26	29	25	ND	D	D	D	D	ND	D	D	D	D	ND	D	D	D	D	ND	D	D	D	D	ND	ND	ND	ND	25
N°6	24	28.5	29.5	28.5	ND	D	D	D	D	ND	D	D	D	D	ND	D	D	D	D	ND	D	D	D	D	ND	ND	ND	ND	28
N°7	22.5	24	ND	28.5	29.5	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	29
N°8	24.5	28	26	27	27.5	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	29
N°9	26	29.5	31.5	35	36	D	D	D	D	D	D	ND	D	D	D	D	D	D	D	D	D	ND	D	D	D	D	D	D	29
N°10	25	28.5	28.5	29.5	32	D	D	D	D	D	D	ND	D	D	D	D	D	D	D	D	D	ND	D	D	D	D	D	D	29
N°11	28	31.5	31	32.5	34.5	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	29
N°12	25	26	26	28	30	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	29

D: determined; ND: not determined

**Supplementary Table 2. Assessment of fibrosis in pig kidney sections stained with Sirius red**

Pig	Day of death	Tissue Area Analyzed ( $\mu\text{m}^2$ )	Tissu Fibrose Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Fibrose Positive Tissue (%)
N°1	29	81201600	27813698	34.25
N°2	29	212065664	57255276	27.00
N°4	29	114940392	29041180	25.27
N°7	29	54956780	7882451,5	14.34
N°8	29	70482160	31382904	44.53
N°9	29	39216372	7014429,5	17.89
N°10	29	151918544	34390612	22.64
N°11	29	240344256	56614784	23.56
N°12	29	88355944	23094822	26.14

For Review Only

**Supplementary Table 3. *Sus scrofa* RT-qPCR primers**

<b>Pig RT-qPCR primers</b>
pQPRT-Fwd GCCCACACACTACCTTCTCT
pQPRT-Rev CACGTGACAACCGATACCTG
pIDO-Fwd CTCCGTCCGTGAGTTTGTTT
pIDO-Rev CTGGCTTGCAGGAATCACAA
pACMSD-Fwd AACTCTTCCCTGTGTACGCA
pACMSD-Rev ATCCGTCCATCCATCTGCAT
pKMO-Fwd ATCACCTTGCTTGGACCTGA
pKMO-Rev TGACAGTCGAATAGGCACCA
pRPL13A-Fwd GGCCTTGTTTACTGCTGGTC
pRPL13A-Rev GGTTCACTCCTGCCAACAAC

FOR

**Supplementary Table 4. Limits of detection and quantification of Kynurenine pathway metabolites measured by LC-MS/MS**

<b>Metabolites</b>	<b>LOD (nM)</b>	<b>LLOQ (nM)</b>	<b>Linearity (nM)</b>
Tryptophan	6	50	100000
Kynurenine	12	24	48000
Kynurenic acid	16	26	52000
3-Hydroxy-kynurenic	2.25	9	4500
Xanthurenic acid	2.5	10	5000
3-Hydroxy-anthranilic acid	8	16	3300
Quinolinic acid	60	240	120000
Picolinic acid	2.5	40	4000

LOD: limit of detection

LLOQ: lowest limit of quantification

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

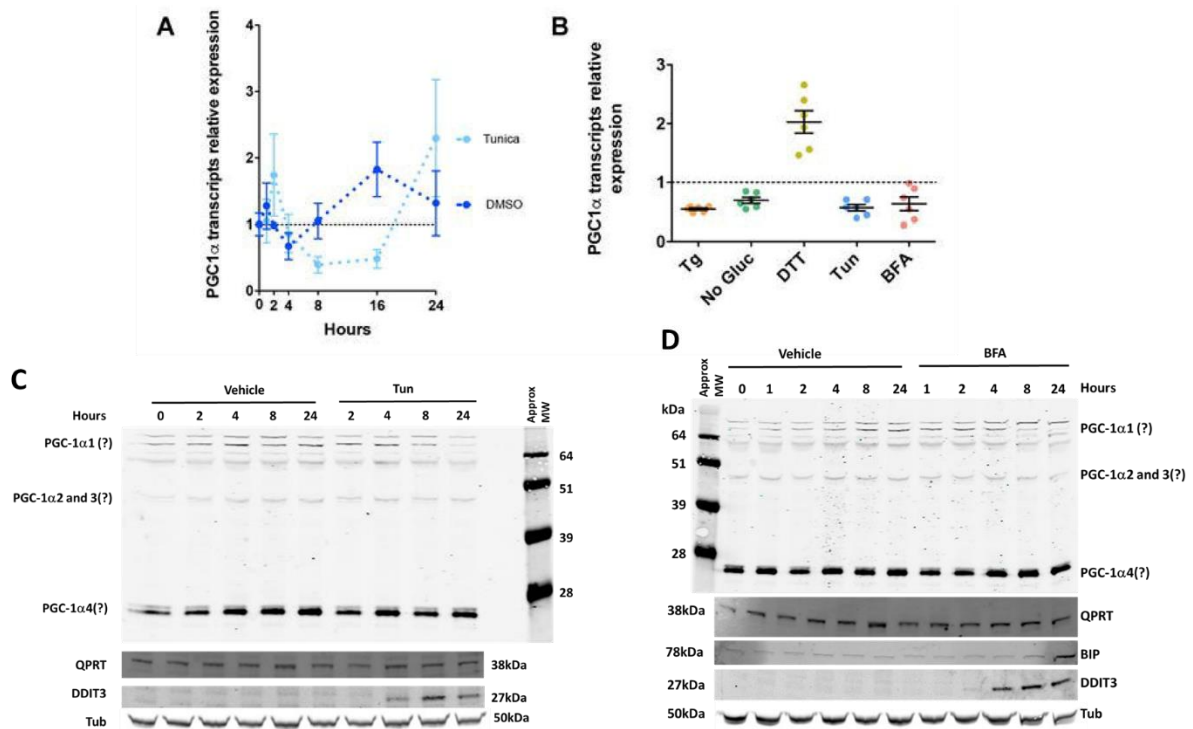
### **Implication du stress du RE dans la diminution de la biosynthèse *de novo* de NAD**

Le maintien du contenu de la cellule rénale en NAD est primordial pour son homéostasie énergétique et mitochondriale. Des niveaux réduits du NAD rénal lors d'une IRA ischémique, peuvent être dus à une biosynthèse *de novo* de NAD altérée associée à une réduction de l'expression et de l'activité de la QPRT [62]. Toutefois, les mécanismes moléculaires qui gouvernent la réduction de la QPRT au cours de lésions rénales aiguës demeuraient inconnus. Nous nous sommes intéressés dans **l'article 1** à l'étude de l'effet du stress du RE sur l'expression de la QPRT et le contenu en NAD. Nous avons montré que la réponse au stress du RE altérait la biosynthèse *de novo* de NAD en réprimant la transcription de *QPRT*, et diminuait ainsi le contenu cellulaire en NAD. En revanche, l'expression des enzymes liées à d'autres voies de synthèse du NAD n'était pas réduite dans les cellules rénales stressées. Au contraire, cette expression était même parfois augmentée, en particulier celle de l'enzyme NAMPT. Cette observation est intéressante, car le gène de la NAMPT est connu pour être activé en réponse à un stress génotoxique [313]. L'activation de la NAMPT peut être un mécanisme cellulaire pour maintenir des niveaux suffisants de NAD.

La diminution du NAD dans les cellules rénales étudiées, pouvait être due également à sa surconsommation par les PARPs. Une hyperactivation des PARPs, notamment PARP1, épuise le NAD et l'ATP cellulaires et dirige la cellule vers une voie non apoptotique notamment la nécrose cellulaire [314,315]. En revanche, si une apoptose est induite dans la cellule, les caspases activées clivent PARP1, d'environ 116 kDa, en deux fragments de 85 kDa et 24 kDa [314–316]. Ce clivage empêche l'épuisement du NAD par PARP1 qui est devenu inactif [316]. Dans les cellules HK-2 stressées par Tun ou BFA, la mise en évidence de PARPs clivées (fragment migrant à 96 kDa) sur l'immunoblot, associée à une faible activité des PARPs, mesurée par ELISA, par rapport au contrôle (cellules non stressées), suggèrent que les PARPs ne sont pas hyperactivées dans les cellules stressées, et donc ne sont pas responsables de la diminution du NAD dans ces cellules. La diminution de l'activité des PARPs ainsi que leur clivage sont validés par le témoin positif utilisant l'étoposide, qui est un activateur de caspases [317]. En revanche, dans les mêmes conditions de stress du RE, l'expression du transcrite de CD38 était augmentée dans les cellules rénales. Cette observation laisse penser que la consommation du NAD par cette enzyme aurait pu contribuer à la diminution du NAD, observée dans les cellules rénales stressées.

### Répression de QPRT dépendante de CHOP lors du stress du RE

Nous avons montré que le stress du RE réprimait la transcription de *QPRT*, et que CHOP était impliqué dans cette répression. Cependant, d'autres acteurs intégrés dans la réponse UPR, et qui sont nécessaires pour réprimer *QPRT* restent à déterminer. De plus, CHOP est également un répresseur de *PGC1α*, dans différents types cellulaires [61,318]. Il a été montré que CHOP exerçait son action répressive sur *PGC1α* en interagissant avec C/EBPβ, le régulateur transcriptionnel de *PGC1α*. Cette interaction réduit la liaison de C/EBPβ au promoteur de *PGC1α*, entraînant ainsi une diminution marquée de l'expression de *PGC1α* [61]. Etant donné, que *PGC1α* est un régulateur essentiel de la biogenèse et de la fonction mitochondriale rénale [60,319,320] et un activateur de *QPRT* [74,321], cela suggère que CHOP pourrait réprimer indirectement *QPRT* en réprimant son activateur, *PGC1α*. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré l'expression de *PGC1α* dans les cellules HK-2 stressées par différents inducteurs de stress (Tun, Tg, BFA, privation en glucose, DTT). L'expression transcriptionnelle de *PGC1α* était abaissée au même temps que celle de *QPRT*, à partir de la 8<sup>ème</sup> heure après l'induction du stress du RE (**Figure 27A**). La baisse de l'expression de *PGC1α* est observée avec tous les inducteurs du stress du RE, à l'exception du DTT (**Figure 27B**). En revanche, l'expression protéique de *PGC1α* était difficile à quantifier puisque nous avons obtenu plusieurs bandes sur l'immunoblot qui correspondent probablement aux différents isoformes connus de *PGC1α*, migrant à 115 kDa, 50 kDa, et 35 kDa approximativement [322]. La bande la plus haute correspondait probablement à l'isoforme *PGC1α* qui migre aux alentours de 110 kDa, et semblait être diminuée à 24h après l'induction du stress du RE par la Tun (**Figure 27**). Ces résultats suggèrent que le stress du RE réprimait *PGC1α* dans les cellules rénales HK-2 étudiées.



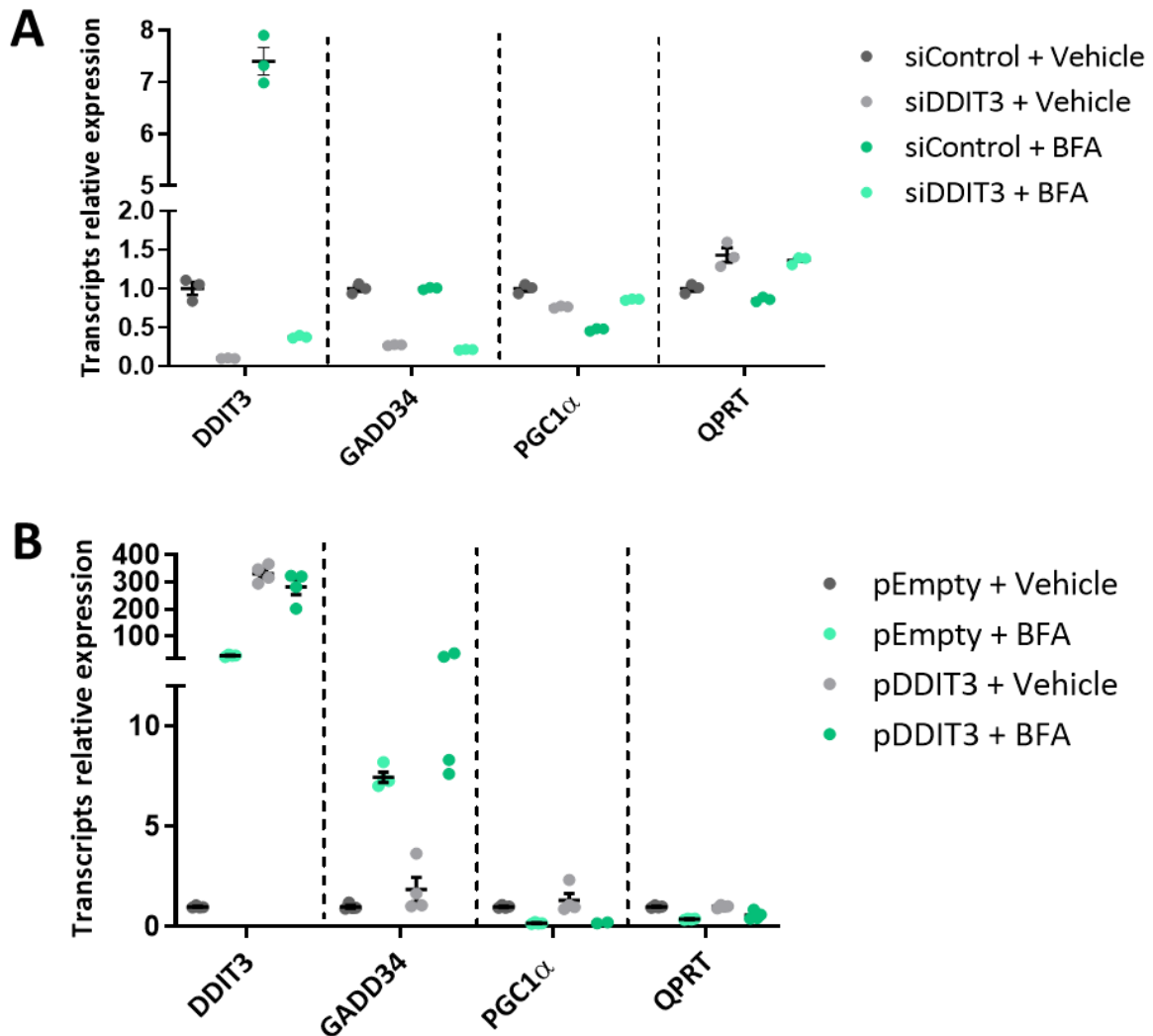
**Figure 27 : Effet du stress du RE sur l'expression de PGC1α dans les cellules HK-2.**

**A :** Courbes représentant les niveaux d'expression transcriptionnelle relative de PGC1α, mesurés par RT-qPCR dans les cellules rénales HK-2 non traitées (DMSO) ou traitées par 2,5 µg/ml de tunicamycine (Tun) pendant 1, 2, 4, 8, 16 ou 24 h. Les résultats, obtenus sur 3 ou 4 extractions d'ARN d'une même culture, sont représentés sous forme de moyenne ± SEM.

**B :** Histogrammes représentant l'expression relative de PGC1α, mesurée par RT-qPCR dans les cellules rénales HK-2 incubées pendant 8 h avec 0,25 µM de thapsigargine (Tg), dans un milieu sans glucose (no Gluc), avec 1 µM de dithiothreitol (DTT), avec 2,5 µg/ml de Tun, ou avec 5 µg/ml de bréfédine A (BFA), et comparées avec les cellules non traitées (DMSO). Les barres représentent la moyenne ± SEM.

**C, D :** Immunoblots représentant l'expression protéique de PGC1α, QPRT, BIP, DDIT3 et de la tubuline dans les cellules rénales HK-2, 24 h après incubation avec le DMSO (vehicle), 2,5 µg/ml de Tun ou 5 µg/ml de BFA. Chaque immunoblot est représentatif de 3 expériences indépendantes.

Nous avons ensuite étudié l'implication de CHOP dans la répression de PGC1α. L'ajout de siARN anti-CHOP (SiDDIT3) en présence du stress du RE a restauré en partie l'expression transcriptionnelle de PGC1α (**Figure 28A**). Dans les cellules rénales stimulées par les différents inducteurs de stress du RE, la répression de QPRT et PGC1α, régulateurs importants de la voie de synthèse *de novo* du NAD, dépendaient du facteur de transcription CHOP. Ensuite, nous avons testé si la surexpression de CHOP, seul sans le stress du RE, est suffisante pour la suppression de ces gènes. Nous avons alors surexprimé CHOP dans les cellules rénales grâce à des plasmides exprimant CHOP (pDDIT3), et aucune diminution significative n'était observée (**Figure 28B**). Ainsi, CHOP seul était insuffisant pour réprimer QPRT et PGC1α. C'est le cas également pour GADD34 qui n'est pas activé par CHOP dans les cellules non stressées (**Figure 28B**).



**Figure 28 : Effet de la down-régulation et de la surexpression de CHOP sur *PGC1 $\alpha$*  dans les cellules HK-2 en condition de stress de RE.**

En résumé, ces données non encore publiées suggèrent que QPRT et *PGC1 $\alpha$*  sont, du moins en partie, régulés par CHOP, et que l'effet de CHOP n'est possible qu'en condition de stress du RE.

Nos résultats sont compatibles avec ceux des études antérieures qui ont montré que CHOP, induit lors du stress du RE, pouvait réprimer *PGC1 $\alpha$*  dans différents types cellulaires [61,318]. De plus, l'expression de *PGC1 $\alpha$*  est réduite au cours de l'IRA associée au stress du RE, et sa surexpression permet d'atténuer l'atteinte rénale notamment en augmentant la synthèse du NAD par la voie *de novo* à partir du TRP [74,111,321,323]. Curieusement, une étude récente de 2022, a montré que la surexpression de *PGC1 $\alpha$* , 24 h après une IRA induite par IR, diminuait de manière significative l'expression des effecteurs de la réponse UPR dans le rein, notamment



celle de CHOP [324]. Il semble donc y avoir au cours de l'IRA liée au stress du RE une interconnexion complexe entre les processus métaboliques régulés par  $PGC1\alpha$ , notamment la synthèse *de novo* du NAD, et les voies de la réponse UPR. La diminution de la synthèse du NAD par répression de *QPRT* sous l'effet du stress du RE est évidente et implique CHOP, mais elle est probablement la finalité de plusieurs mécanismes concomitants, notamment la répression directe de *QPRT* ou/et la répression de son activateur  $PGC1\alpha$ .

L'action répressive de CHOP sur ses gènes cibles n'est pas claire, mais semble impliquée plusieurs mécanismes, soit sous l'effet de CHOP seul, soit en formant un hétérodimère avec d'autres protéines, notamment les C/EBPs [45]. De plus, le stress du RE est connu pour favoriser la formation d'hétérodimère entre CHOP et C/EBP $\beta$  [61]. Des études ont montré que CHOP, induit par le stress du RE, exerçait son action répressive en se liant aux promoteurs des gènes cibles sous forme d'hétérodimère qu'il forme avec ATF4 ou C/EBP $\beta$  [53,325]. Les séquences spécifiques liées par les hétérodimères CHOP-C/EBP contiennent un élément central unique PuPuPuTGCAAT(A/C)CCC [45]. Il est possible que l'action de CHOP sur les gènes *QPRT* et  $PGC1\alpha$  passe donc par son effet antagoniste sur C/EBP $\beta$  qui est connu comme régulateur positif de  $PGC1\alpha$  [61]. L'élucidation de ces mécanismes nécessiterait d'autres études supplémentaires. Pour établir le lien direct entre CHOP et *QPRT*, et CHOP et  $PGC1\alpha$ , des études spécifiques sur la régulation des gènes *QPRT* et  $PGC1\alpha$  par CHOP seraient nécessaires. Il serait intéressant de réaliser dans un premier temps, des essais de liaison de CHOP aux régions promotrices des gènes *QPRT* et  $PGC1\alpha$  dans les cellules rénales HK-2 en utilisant la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Dans les conditions de stress du RE, si CHOP est retrouvé lié aux séquences ciblées, cela renforcerait l'hypothèse qu'il agit directement sur ces gènes. Pour cela, l'immunoprécipitation par des anticorps anti-CHOP et anti-IgG non spécifique devrait se faire sur des cellules stressées et non stressées. Dans le cas où l'enrichissement relatif est significativement plus élevé dans les cellules stressées par rapport aux cellules non stressées, et à celles stressées mais immunoprécipitées par des anti-IgG, on conclurait à une forte probabilité de liaison de CHOP à cette région ciblée.

Nous avons réalisé cette expérience mais elle n'a pas été concluante (résultats non montrés). Cependant, cette technique seule ne permet pas de conclure que les régions enrichies sont impliquées dans l'action répressive de CHOP. Pour mieux comprendre comment ces séquences spécifiques interagissent avec la protéine CHOP, et comment cela influence l'expression des gènes d'intérêt *QPRT* et  $PGC1\alpha$ , d'autres expériences de culture cellulaire où les séquences génétiques enrichies seraient modifiées, pourraient apporter plus de réponses.

Ensuite, nous avons vérifié que la répression de *QPRT*, observée *in vitro* dans les cellules rénales, était également présente *in vivo* sur des modèles murins de lésions rénales associées au stress du RE (CHOP surexprimé). Il serait intéressant de vérifier l'implication de CHOP dans la répression de *QPRT* et la diminution de synthèse du NAD, *in vivo* sur un modèle n'exprimant pas CHOP (CHOP<sup>-/-</sup>) où une IRA associée au stress du RE serait induite par la Tun par exemple.

### **Suivi de l'activité de la voie des kynurénines au cours de l'IRA**

Dans l'**Article 2**, nous avons mis au point et validé une technique par LC-MS/MS qui permet la quantification d'un panel de métabolites de la voie des kynurénine dans le plasma et l'urine. Alors que tous les métabolites de notre panel ont été quantifiés dans l'urine dans la cohorte de patients atteints d'IRA post-chirurgie cardiaque (**Article 2**) et la cohorte de cochons avec GNC (**Article 3**), la quantification de certains métabolites dans le plasma, notamment le KA, le XA, le 3-HANA, le NaMN et le PIC n'était pas possible dans la cohorte de cochons. Cela est dû probablement à la sensibilité de la technique qui n'était pas suffisante (LLOQs : KA : 26 nM, XA : 10 nM, 3-HANA : 16 nM, NaMN : 8 nM et PIC : 40 nM). De plus, les concentrations plasmatiques moyennes décrites pour le KA, le 3-HANA et le PIC, chez la même espèce de cochon (de sexe male et âgé de 4 mois) que nous avons utilisée, sont de 5 nM, 40 nM, et 2 µM respectivement [326–328].

### **Intérêt du ratio urinaire QA/TRP dans l'IRA**

Dans les **Articles 1 et 2**, nous avons évalué le potentiel du ratio urinaire QA/TRP comme biomarqueur non invasif pronostique de la survenue de l'IRA post chirurgie cardiaque sous CEC. Les métabolites de la voie des kynurénines ont été recherchés par deux laboratoires différents utilisant deux protocoles différents de LC-MS/MS. Dans l'**Article 1**, la recherche n'était pas ciblée, le TRP et le QA faisaient partie d'un large panel de métabolites et les résultats sont exprimés en unité arbitraire. La technique utilisée dans l'**Article 2**, ciblait spécifiquement 11 métabolites dont le TRP et le QA, et la quantification était réalisée grâce à des courbes de calibration, spécifiques à chaque métabolite recherché, dans lesquelles les résultats sont exprimés en nM. Les résultats obtenus, quel que soit le protocole utilisé, ont montré que le ratio urinaire QA/ TRP était significativement plus élevé 24 heures après l'intervention dans le groupe de patients ayant développé une IRA. Nous avons donc montré à travers l'étude de la voie des kynurénines dans la cohorte HEGP que les niveaux du ratio QA/TRP dans l'urine reflétaient une activité altérée de la *QPRT* et une biosynthèse *de novo* de NAD réduite dans le rein. Ce ratio pourrait constituer un biomarqueur non invasif permettant d'identifier les patients à risque de développer une IRA après chirurgie cardiaque, et pourrait également prédire sa

sévérité. L'élévation du ratio urinaire QA/TRP était associée à un risque accru d'IRA chez les patients ayant subi une chirurgie cardiaque [62] ou vasculaire [329], en état critique [62], et les patients atteints de la COVID-19 [230].

Une autre étude, menée dans une cohorte de patients de 167 patients ayant subi une chirurgie cardiaque sous CEC, a montré que le ratio urinaire KYN/TRP 24 heures après l'intervention était prédictif de la survenue de l'IRA et de sa sévérité [197]. Ce résultat n'a pas été confirmé dans notre cohorte (**Article 2**) puisque la diminution des niveaux du ratio urinaire KYN/TRP était non significative. A cause de la difficulté de standardisation, les résultats des études cliniques ou précliniques ne sont pas toujours facilement comparables entre elles [330,331]. Des études cliniques longitudinales sur des cohortes plus larges sont nécessaires pour évaluer la fiabilité des marqueurs émergents de la voie des kynurénines pour la détection précoce de l'IRA et la prédiction de sa sévérité.

### **Suivi de la transplantation rénale par les métabolites de la voie des kynurénines**

La voie des kynurénines suscite un intérêt croissant dans la transplantation rénale, et de nombreuses études expérimentales et cliniques ont été réalisées pour étudier son rôle dans la survenue des lésions rénales après l'ischémie froide, des rejets aigu et chronique de l'allogreffe [278]. Dans l'**Article 1**, nous avons montré que l'élévation du ratio urinaire QA/TRP 10 jours après la transplantation rénale était un marqueur prédictif indépendant du dysfonctionnement de l'allogreffe rénale à 3 et à 12 mois après la transplantation. Ces résultats rejoignent ceux de Suhre et *al.* qui ont rapporté dans deux études, publiées en 2016 et 2021, et menées chez des patients avec allogreffe rénale, que le QA urinaire était significativement plus élevé en cas de rejet aigu de greffe rénale [275,276].

### **Place du ratio urinaire QA/TRP dans la prédiction de la transition de l'IRA vers la MRC**

L'implication d'une biosynthèse altérée de NAD dans la progression de l'IRA vers une MRC reste à étudier. Dans l'**Article 1**, nous avons montré que la persistance d'une diminution de l'expression de *QPRT* au cours de l'IRA ischémique était un marqueur prédictif de la progression vers la MRC chez les receveurs d'allogreffe rénale, un événement qui peut être détecté indirectement à l'aide du ratio urinaire QA/TRP. Ces résultats mettent en lumière le rôle potentiel de l'altération de la voie de biosynthèse *de novo* du NAD dans la progression de l'IRA vers la MRC, et ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension et la prévention de cette phase critique de la maladie rénale.

### **Suivi de la GNC par la voie des kynurénines**

Les modèles animaux de maladies rénales aiguës sont essentiels pour comprendre leurs physiopathologies. Dans l'**Article 3**, nous avons utilisé un nouveau modèle de GNC chez le cochon domestique qui imite les caractéristiques pathologiques de la vascularite à ANCA, l'une des causes de GNC à évolution rapide, chez l'Homme. Nous avons suivi les variations des métabolites de la voie des kynurénines, au niveau urinaire et plasmatique, pendant un mois après l'induction de la GNC, à la recherche de biomarqueurs plasmatiques ou urinaires pouvant prédire sa sévérité ou son évolution. Le modèle porcin est un modèle translationnel très intéressant puisque l'anatomie cardiovasculaire et rénale ainsi que la physiologie du cochon sont pratiquement identiques à celles des humains [332,333]. D'ailleurs, plusieurs études ont utilisé le modèle porcin pour étudier la maladie rénale aiguë [334–336] et chronique [337,333,338–344]. De plus, plusieurs études ont utilisé le modèle porcin pour étudier les métabolites de la voie des kynurénines (surtout dans le plasma) dans les désordres métaboliques et les maladies inflammatoires notamment dans le contexte nutritionnel [345], la pathologie cardiaque [326] la réponse inflammatoire [346–349], et la maladie hépatique [350]. A notre connaissance, notre étude est la première qui a suivi dans le temps sur un modèle porcin de GNC, les niveaux plasmatiques et urinaires des métabolites de la voie des kynurénines. À travers l'**article 3**, nous avons observé sur une cohorte de 12 cochons atteints de GNC que la voie des kynurénines était activée, avec une augmentation de l'expression de l'*ido* dans le rein et une élévation du ratio KYN/TRP dans l'urine. Nos résultats rejoignent ceux d'autres travaux réalisés chez les rongeurs, qui ont montré que la voie des kynurénines était activée et associée à une augmentation de l'expression de l'IDO au niveau rénal au cours de la GNC [246,311,312]. De plus, il a été montré que l'IDO jouait un rôle protecteur dans cette pathologie en régulant les réponses immunitaires et en prévenant l'inflammation excessive [246,311,312,351]. Au niveau plasmatique, nous n'avons pas observé d'augmentation significative du ratio KYN/TRP chez les cochons atteints de GNC, tout au long de la durée d'étude (1 mois), contrairement à d'autres études réalisées chez les rongeurs et qui ont comparé les sujets atteints de GNC par rapport aux contrôles sains [246,219]. De plus, un ratio plasmatique KYN/TRP élevé était également observé chez des patients atteints de vascularite à ANCA, lors de ses phases aiguë et de rémission, par rapport aux contrôles sains [352]. Les métabolites produits en aval de la KYN notamment la 3-HK et le 3-HANA, ont une action immunosuppressive protectrice contre la CGN en favorisant la réponse Th2 au lieu de Th1 [219,353]. Ces études fournissent des preuves significatives de l'implication des métabolites de la voie des kynurénines dans la pathogénèse

de la GNC, et de leur potentiel thérapeutique. De plus, le ratio urinaire KYN/TRP pourrait être un marqueur prometteur dans le suivi de l'évolution de la GNC.

## **CONCLUSION GENERALE**

---

En conclusion, ces travaux de thèse ont montré que le stress du RE exerce une régulation négative, dépendante du facteur de transcription CHOP, sur l'enzyme QPRT à l'origine d'une réduction de la biosynthèse *de novo* du NAD et de la diminution du contenu rénal en NAD. Le ratio urinaire QA/TRP pourrait être un marqueur précoce de la survenue d'IRA après une chirurgie cardiaque, reflétant une activité altérée de la QPRT et une biosynthèse réduite *de novo* de NAD dans le rein. De plus, ce marqueur pourrait être prédictif de la progression vers la MRC chez les receveurs d'allogreffe rénale. Ces résultats ont mis en évidence des pistes prometteuses pour le développement de biomarqueurs métaboliques non invasifs de la lésion rénale, cliniquement applicables avec des implications pronostiques et thérapeutiques. Cependant, malgré les perspectives prometteuses offertes par ces biomarqueurs, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour valider leur pertinence en clinique. Des études longitudinales et des essais cliniques à grande échelle seront essentiels pour évaluer leur sensibilité et spécificité dans différents types d'IRA.

# Bibliographie

- [1] J.A. Kellum, N. Lameire, P. Aspelin, R.S. Barsoum, E.A. Burdmann, S.L. Goldstein, C.A. Herzog, M. Joannidis, A. Kribben, A.S. Levey, A.M. MacLeod, R.L. Mehta, P.T. Murray, S. Naicker, S.M. Opal, F. Schaefer, M. Schetz, S. Uchino, KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury, *Kidney International Supplements*. 2 (2012) 1–138.
- [2] P. Pickkers, M. Darmon, E. Hoste, M. Joannidis, M. Legrand, M. Ostermann, J.R. Prowle, A. Schneider, M. Schetz, Acute kidney injury in the critically ill: an updated review on pathophysiology and management, *Intensive Care Med*. 47 (2021) 835–850. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06454-7>.
- [3] M. Ostermann, A. Zarbock, S. Goldstein, K. Kashani, E. Macedo, R. Murugan, M. Bell, L. Forni, L. Guzzi, M. Joannidis, S.L. Kane-Gill, M. Legrand, R. Mehta, P.T. Murray, P. Pickkers, M. Plebani, J. Prowle, Z. Ricci, T. Rimmelé, M. Rosner, A.D. Shaw, J.A. Kellum, C. Ronco, Recommendations on Acute Kidney Injury Biomarkers From the Acute Disease Quality Initiative Consensus Conference: A Consensus Statement, *JAMA Netw. Open*. 3 (2020) e2019209. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.19209>.
- [4] J.A. Kellum, P. Romagnani, G. Ashuntantang, C. Ronco, A. Zarbock, H.-J. Anders, Acute kidney injury, *Nat. Rev. Dis. Primer*. 7 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00284-z>.
- [5] K. Stille, A. Kribben, S. Herget-Rosenthal, Incidence, severity, risk factors and outcomes of acute kidney injury in older adults: systematic review and meta-analysis, *J. Nephrol*. 35 (2022) 2237–2250. <https://doi.org/10.1007/s40620-022-01381-2>.
- [6] P. Susantitaphong, D.N. Cruz, J. Cerda, M. Abulfaraj, F. Alqahtani, I. Koulouridis, B.L. Jaber, Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of Nephrology, World incidence of AKI: a meta-analysis, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 8 (2013) 1482–1493. <https://doi.org/10.2215/CJN.00710113>.
- [7] B.C. Birkelo, N. Pannu, E.D. Siew, Overview of Diagnostic Criteria and Epidemiology of Acute Kidney Injury and Acute Kidney Disease in the Critically Ill Patient, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 17 (2022) 717–735. <https://doi.org/10.2215/CJN.14181021>.
- [8] C. Ronco, R. Bellomo, J.A. Kellum, Acute kidney injury, *The Lancet*. 394 (2019) 1949–1964. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32563-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32563-2).
- [9] C. Thongprayoon, P. Hansrivijit, K. Kovvuru, S.R. Kanduri, A. Torres-Ortiz, P. Acharya, M.L. Gonzalez-Suarez, W. Kaewput, T. Bathini, W. Cheungpasitporn, Diagnostics, Risk Factors, Treatment and Outcomes of Acute Kidney Injury in a New Paradigm, *J. Clin. Med*. 9 (2020) 1104. <https://doi.org/10.3390/jcm9041104>.
- [10] M.A. Perazella, M.H. Rosner, Drug-Induced Acute Kidney Injury, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 17 (2022) 1220–1233. <https://doi.org/10.2215/CJN.11290821>.
- [11] V.T. Costa e Silva, L.J. Marçal, E.A. Burdmann, Risk factors for vancomycin nephrotoxicity: still a matter of debate, *Crit. Care Med*. 42 (2014) 2635–2636. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000635>.
- [12] E.L. Joyce, S.L. Kane-Gill, P. Priyanka, D.Y. Fuhrman, J.A. Kellum, Piperacillin/Tazobactam and Antibiotic-Associated Acute Kidney Injury in Critically Ill Children, *J. Am. Soc. Nephrol*. 30 (2019) 2243–2251. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018121223>.
- [13] M. Praga, E. González, Acute interstitial nephritis, *Kidney Int*. 77 (2010) 956–961. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.89>.

- [14] M.G. Mercado, D.K. Smith, E.L. Guard, Acute Kidney Injury: Diagnosis and Management, *Am. Fam. Physician*. 100 (2019) 687–694.
- [15] E.L. Fu, M. Trevisan, C.M. Clase, M. Evans, B. Lindholm, J.I. Rotmans, M. van Diepen, F.W. Dekker, J.-J. Carrero, Association of Acute Increases in Plasma Creatinine after Renin-Angiotensin Blockade with Subsequent Outcomes, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (2019) 1336–1345. <https://doi.org/10.2215/CJN.03060319>.
- [16] S.R. Mulay, H.-J. Anders, Crystal nephropathies: mechanisms of crystal-induced kidney injury, *Nat. Rev. Nephrol.* 13 (2017) 226–240. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.10>.
- [17] P. Romagnani, G. Remuzzi, R. Glasscock, A. Levin, K.J. Jager, M. Tonelli, Z. Massy, C. Wanner, H.-J. Anders, Chronic kidney disease, *Nat. Rev. Dis. Primer.* 3 (2017) 17088. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.88>.
- [18] R.H. Thiele, J.M. Isbell, M.H. Rosner, AKI associated with cardiac surgery, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN.* 10 (2015) 500–514. <https://doi.org/10.2215/CJN.07830814>.
- [19] H.-C. Yang, Y. Zuo, A.B. Fogo, Models of chronic kidney disease, *Drug Discov. Today Dis. Models.* 7 (2010) 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2010.08.002>.
- [20] D.P. Basile, J.V. Bonventre, R. Mehta, M. Nangaku, R. Unwin, M.H. Rosner, J.A. Kellum, C. Ronco, ADQI XIII Work Group, Progression after AKI: Understanding Maladaptive Repair Processes to Predict and Identify Therapeutic Treatments, *J. Am. Soc. Nephrol.* 27 (2016) 687–697. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015030309>.
- [21] L.S. Chawla, P.W. Eggers, R.A. Star, P.L. Kimmel, Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes, *N. Engl. J. Med.* 371 (2014) 58–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1214243>.
- [22] C. Hsu, R.K. Hsu, J. Yang, J.D. Ordonez, S. Zheng, A.S. Go, Elevated BP after AKI, *J. Am. Soc. Nephrol.* 27 (2016) 914–923. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014111114>.
- [23] S.A. Silver, Z. Harel, E. McArthur, D.M. Nash, R. Acedillo, A. Kitchlu, A.X. Garg, G.M. Chertow, C.M. Bell, R. Wald, Causes of Death after a Hospitalization with AKI, *J. Am. Soc. Nephrol.* 29 (2018) 1001–1010. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017080882>.
- [24] V.-C. Wu, C.-H. Wu, T.-M. Huang, C.-Y. Wang, C.-F. Lai, C.-C. Shiao, C.-H. Chang, S.-L. Lin, Y.-Y. Chen, Y.-M. Chen, T.-S. Chu, W.-C. Chiang, K.-D. Wu, P.-R. Tsai, L. Chen, W.-J. Ko, NSARF Group, Long-term risk of coronary events after AKI, *J. Am. Soc. Nephrol.* 25 (2014) 595–605. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013060610>.
- [25] H. Gammelager, C.F. Christiansen, M.B. Johansen, E. Tønnesen, B. Jespersen, H.T. Sørensen, Three-year risk of cardiovascular disease among intensive care patients with acute kidney injury: a population-based cohort study, *Crit. Care Lond. Engl.* 18 (2014) 492. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0492-2>.
- [26] A. Odutayo, C.X. Wong, M. Farkouh, D.G. Altman, S. Hopewell, C.A. Emdin, B.H. Hunn, AKI and Long-Term Risk for Cardiovascular Events and Mortality, *J. Am. Soc. Nephrol.* 28 (2017) 377–387. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016010105>.
- [27] T. Habshi, V. Shelke, A. Kale, H.-J. Anders, A.B. Gaikwad, Role of endoplasmic reticulum stress and autophagy in the transition from acute kidney injury to chronic kidney disease, *J. Cell. Physiol.* 238 (2023) 82–93. <https://doi.org/10.1002/jcp.30918>.
- [28] Y. Xu, M. Guo, W. Jiang, H. Dong, Y. Han, X.-F. An, J. Zhang, Endoplasmic reticulum stress and its effects on renal tubular cells apoptosis in ischemic acute kidney injury, *Ren. Fail.* 38 (2016) 831–837. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2016.1160724>.
- [29] M. Gallazzini, N. Pallet, Endoplasmic reticulum stress and kidney dysfunction, *Biol. Cell.* 110 (2018) 205–216. <https://doi.org/10.1111/boc.201800019>.
- [30] M. Yan, S. Shu, C. Guo, C. Tang, Z. Dong, Endoplasmic reticulum stress in ischemic and nephrotoxic acute kidney injury, *Ann. Med.* 50 (2018) 381–390. <https://doi.org/10.1080/07853890.2018.1489142>.

- [31] J.A. Kropski, T.S. Blackwell, Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of fibrotic disease, *J. Clin. Invest.* 128 (2018) 64–73. <https://doi.org/10.1172/JCI93560>.
- [32] S. Shu, J. Zhu, Z. Liu, C. Tang, J. Cai, Z. Dong, Endoplasmic reticulum stress is activated in post-ischemic kidneys to promote chronic kidney disease, *EBioMedicine*. 37 (2018) 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.10.006>.
- [33] C. Hetz, F.R. Papa, The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control, *Mol. Cell*. 69 (2018) 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.017>.
- [34] A. Almanza, A. Carlesso, C. Chinthia, S. Creedican, D. Doultisinos, B. Leuzzi, A. Luís, N. McCarthy, L. Montibeller, S. More, A. Papaioannou, F. Püschel, M.L. Sassano, J. Skoko, P. Agostinis, J. de Belleruche, L.A. Eriksson, S. Fulda, A.M. Gorman, S. Healy, A. Kozlov, C. Muñoz-Pinedo, M. Rehm, E. Chevet, A. Samali, Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications, *FEBS J.* 286 (2019) 241–278. <https://doi.org/10.1111/febs.14608>.
- [35] J. Shen, R. Prywes, ER stress signaling by regulated proteolysis of ATF6, *Methods San Diego Calif.* 35 (2005) 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.10.011>.
- [36] H.P. Harding, I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, D. Ron, Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells, *Mol. Cell*. 6 (2000) 1099–1108. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00108-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00108-8).
- [37] P. Walter, D. Ron, The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation, *Science*. 334 (2011) 1081–1086. <https://doi.org/10.1126/science.1209038>.
- [38] I. Novoa, H. Zeng, H.P. Harding, D. Ron, Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-Mediated Dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ , *J. Cell Biol.* 153 (2001) 1011–1022. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.1011>.
- [39] S.-J. Park, Y. Kim, Y.M. Chen, Endoplasmic reticulum stress and monogenic kidney diseases in precision nephrology, *Pediatr. Nephrol.* 34 (2019) 1493–1500. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4031-2>.
- [40] C. Schaeffer, S. Merella, E. Pasqualetto, D. Lazarevic, L. Rampoldi, Mutant uromodulin expression leads to altered homeostasis of the endoplasmic reticulum and activates the unfolded protein response, *PLoS ONE*. 12 (2017) e0175970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175970>.
- [41] J.V. Bonventre, L. Yang, Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 4210–4221. <https://doi.org/10.1172/JCI45161>.
- [42] F. Foufelle, B. Fromenty, Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity, *Pharmacol. Res. Perspect.* 4 (2016) e00211. <https://doi.org/10.1002/prp2.211>.
- [43] N. Pallet, N. Bouvier, A. Bendjallah, M. Rabant, J.P. Flinois, A. Hertig, C. Legendre, P. Beaune, E. Thervet, D. Anglicheau, Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death, *Am. J. Transplant.* 8 (2008) 2283–2296. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02396.x>.
- [44] N. Bouvier, S. Fougeray, P. Beaune, E. Thervet, N. Pallet, The Unfolded Protein Response Regulates an Angiogenic Response by the Kidney Epithelium during Ischemic Stress, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 14557–14568. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.340570>.
- [45] M. Ubeda, X.Z. Wang, H. Zinszner, I. Wu, J.F. Habener, D. Ron, Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element., *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 1479–1489. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.4.1479>.
- [46] Y. Yang, L. Liu, I. Naik, Z. Braunstein, J. Zhong, B. Ren, Transcription Factor C/EBP Homologous Protein in Health and Diseases, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1612. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01612>.



- [47] H.P. Harding, Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, D. Ron, Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response, *Mol. Cell.* 5 (2000) 897–904. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80330-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80330-5).
- [48] T.W. FAWCETT, J.L. MARTINDALE, K.Z. GUYTON, T. HAI, N.J. HOLBROOK, Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)–ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response, *Biochem. J.* 339 (1999) 135–141. <https://doi.org/10.1042/bj3390135>.
- [49] S. Oyadomari, M. Mori, Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress, *Cell Death Differ.* 11 (2004) 381–389. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401373>.
- [50] Y. Cao, J. Trillo-Tinoco, R.A. Sierra, C. Anadon, W. Dai, E. Mohamed, L. Cen, T.L. Costich, A. Magliocco, D. Marchion, R. Klar, S. Michel, F. Jaschinski, R.R. Reich, S. Mehrotra, J.R. Cubillos-Ruiz, D.H. Munn, J.R. Conejo-Garcia, P.C. Rodriguez, ER stress-induced mediator C/EBP homologous protein thwarts effector T cell activity in tumors through T-bet repression, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1280. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09263-1>.
- [51] D. Ron, J.F. Habener, CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription, *Genes Dev.* 6 (1992) 439–453. <https://doi.org/10.1101/gad.6.3.439>.
- [52] K. Shirakawa, S. Maeda, T. Gotoh, M. Hayashi, K. Shinomiya, S. Ehata, R. Nishimura, M. Mori, K. Onozaki, H. Hayashi, S. Uematsu, S. Akira, E. Ogata, K. Miyazono, T. Imamura, CCAAT/Enhancer-Binding Protein Homologous Protein (CHOP) Regulates Osteoblast Differentiation, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 6105–6116. <https://doi.org/10.1128/MCB.02429-05>.
- [53] J. Han, S.H. Back, J. Hur, Y.-H. Lin, R. Gildersleeve, J. Shan, C.L. Yuan, D. Krokowski, S. Wang, M. Hatzoglou, M.S. Kilberg, M.A. Sartor, R.J. Kaufman, ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death, *Nat. Cell Biol.* 15 (2013) 481–490. <https://doi.org/10.1038/ncb2738>.
- [54] S.J. Marciniak, C.Y. Yun, S. Oyadomari, I. Novoa, Y. Zhang, R. Jungreis, K. Nagata, H.P. Harding, D. Ron, CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum, *Genes Dev.* 18 (2004) 3066–3077. <https://doi.org/10.1101/gad.1250704>.
- [55] B.L. Chen, M.L. Sheu, K.S. Tsai, K.C. Lan, S.S. Guan, C.T. Wu, L.P. Chen, K.Y. Hung, J.W. Huang, C.K. Chiang, S.H. Liu, CCAAT-Enhancer-Binding Protein Homologous Protein Deficiency Attenuates Oxidative Stress and Renal Ischemia-Reperfusion Injury, *Antioxid. Redox Signal.* 23 (2015) 1233–1245. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5768>.
- [56] M.R. Noh, J.I. Kim, S.J. Han, T.-J. Lee, K.M. Park, C/EBP homologous protein (CHOP) gene deficiency attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice, *Biochim. Biophys. Acta.* 1852 (2015) 1895–1901. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.06.004>.
- [57] M. Zhang, Y. Guo, H. Fu, S. Hu, J. Pan, Y. Wang, J. Cheng, J. Song, Q. Yu, S. Zhang, J.-F. Xu, G. Pei, X. Xiang, P. Yang, C.-Y. Wang, Chop deficiency prevents UUO-induced renal fibrosis by attenuating fibrotic signals originated from Hmgb1/TLR4/NFκB/IL-1β signaling, *Cell Death Dis.* 6 (2015) e1847–e1847. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.206>.
- [58] S.-H. Liu, C.-T. Wu, K.-H. Huang, C.-C. Wang, S.-S. Guan, L.-P. Chen, C.-K. Chiang, C/EBP homologous protein (CHOP) deficiency ameliorates renal fibrosis in unilateral ureteral obstructive kidney disease, *Oncotarget.* 7 (2016). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7870>.

- [59] H. Nishitoh, CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response, *J. Biochem. (Tokyo)*. 151 (2012) 217–219. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr143>.
- [60] O. Abu Shelbayeh, T. Arroum, S. Morris, K.B. Busch, PGC-1 $\alpha$  Is a Master Regulator of Mitochondrial Lifecycle and ROS Stress Response, *Antioxid. Basel Switz.* 12 (2023) 1075. <https://doi.org/10.3390/antiox12051075>.
- [61] X. Chen, J. Zhong, D. Dong, G. Liu, P. Yang, Endoplasmic Reticulum Stress-Induced CHOP Inhibits PGC-1 $\alpha$  and Causes Mitochondrial Dysfunction in Diabetic Embryopathy, *Toxicol. Sci.* 158 (2017) 275–285. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx096>.
- [62] A. Poyan Mehr, M.T. Tran, K.M. Ralto, D.E. Leaf, V. Washco, J. Messmer, A. Lerner, A. Kher, S.H. Kim, C.C. Khoury, S.J. Herzig, M.E. Trovato, N. Simon-Tillaux, M.R. Lynch, R.I. Thadhani, C.B. Clish, K.R. Khabbaz, E.P. Rhee, S.S. Waikar, A.H. Berg, S.M. Parikh, De novo NAD<sup>+</sup> biosynthetic impairment in acute kidney injury in humans, *Nat. Med.* 24 (2018) 1351–1359. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0138-z>.
- [63] L.S. Gewin, Sugar or Fat? Renal Tubular Metabolism Reviewed in Health and Disease, *Nutrients*. 13 (2021) 1580. <https://doi.org/10.3390/nu13051580>.
- [64] H. Nieth, P. Schollmeyer, Substrate-utilization of the human kidney, *Nature*. 209 (1966) 1244–1245. <https://doi.org/10.1038/2091244a0>.
- [65] H.-S. Jang, M.R. Noh, J. Kim, B.J. Padanilam, Defective Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Lipotoxicity in Kidney Diseases, *Front. Med.* 7 (2020) 65. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00065>.
- [66] K.M. Ralto, E.P. Rhee, S.M. Parikh, NAD<sup>+</sup> homeostasis in renal health and disease, *Nat. Rev. Nephrol.* (2019). <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0216-6>.
- [67] M. Rechsteiner, D. Hillyard, B.M. Olivera, Turnover of nicotinamide adenine dinucleotide in cultures of human cells, *J. Cell. Physiol.* 88 (1976) 207–217. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040880210>.
- [68] X.A. Cambronne, M.L. Stewart, D. Kim, A.M. Jones-Brunette, R.K. Morgan, D.L. Farrens, M.S. Cohen, R.H. Goodman, Biosensor reveals multiple sources for mitochondrial NAD<sup>+</sup>, *Science*. 352 (2016) 1474–1477. <https://doi.org/10.1126/science.aad5168>.
- [69] V. Mori, A. Amici, F. Mazzola, M. Di Stefano, L. Conforti, G. Magni, S. Ruggieri, N. Raffaelli, G. Orsomando, Metabolic profiling of alternative NAD biosynthetic routes in mouse tissues, *PloS One*. 9 (2014) e113939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113939>.
- [70] D. Azouaoui, M.R. Choinière, M. Khan, S. Sayfi, S. Jaffer, S. Yousef, D.A. Patten, A.E. Green, K.J. Menzies, Meta-analysis of NAD(P)(H) quantification results exhibits variability across mammalian tissues, *Sci. Rep.* 13 (2023) 2464. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29607-8>.
- [71] E. Katsyuba, A. Mottis, M. Zietak, F. De Franco, V. van der Velpen, K. Gariani, D. Ryu, L. Cialabrini, O. Matilainen, P. Liscio, N. Giacchè, N. Stokar-Regenscheit, D. Legouis, S. de Seigneux, J. Ivanisevic, N. Raffaelli, K. Schoonjans, R. Pellicciari, J. Auwerx, De novo NAD<sup>+</sup> synthesis enhances mitochondrial function and improves health, *Nature*. 563 (2018) 354–359. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0645-6>.
- [72] E. Katsyuba, M. Romani, D. Hofer, J. Auwerx, NAD<sup>+</sup> homeostasis in health and disease, *Nat. Metab.* 2 (2020) 9–31. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0161-5>.
- [73] K.A. Hershberger, A.S. Martin, M.D. Hirschey, Role of NAD<sup>+</sup> and mitochondrial sirtuins in cardiac and renal diseases, *Nat. Rev. Nephrol.* 13 (2017) 213–225. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.5>.
- [74] M.T. Tran, Z.K. Zsengeller, A.H. Berg, E.V. Khankin, M.K. Bhasin, W. Kim, C.B. Clish, I.E. Stillman, S.A. Karumanchi, E.P. Rhee, S.M. Parikh, PGC1 $\alpha$  drives NAD

- biosynthesis linking oxidative metabolism to renal protection, *Nature*. 531 (2016) 528–532. <https://doi.org/10.1038/nature17184>.
- [75] P. Bhargava, R.G. Schnellmann, Mitochondrial energetics in the kidney, *Nat. Rev. Nephrol.* 13 (2017) 629–646. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.107>.
- [76] Z. Tian, M. Liang, Renal metabolism and hypertension, *Nat. Commun.* 12 (2021) 963. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21301-5>.
- [77] M.J. Weidemann, H.A. Krebs, The fuel of respiration of rat kidney cortex, *Biochem. J.* 112 (1969) 149–166. <https://doi.org/10.1042/bj1120149>.
- [78] D. Legouis, S.-E. Ricksten, A. Faivre, T. Verissimo, K. Gariani, C. Verney, P. Galichon, L. Berchtold, E. Feraille, M. Fernandez, S. Placier, K. Koppitch, A. Hertig, P.-Y. Martin, M. Naesens, J. Pugin, A.P. McMahon, P.E. Cippà, S. de Seigneux, Altered proximal tubular cell glucose metabolism during acute kidney injury is associated with mortality, *Nat. Metab.* 2 (2020) 732–743. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0238-1>.
- [79] A.J. Clark, S.M. Parikh, Mitochondrial Metabolism in Acute Kidney Injury, *Semin. Nephrol.* 40 (2020) 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2020.01.002>.
- [80] L. Liu, X. Su, W.J. Quinn, S. Hui, K. Krukenberg, D.W. Frederick, P. Redpath, L. Zhan, K. Chellappa, E. White, M. Migaud, T.J. Mitchison, J.A. Baur, J.D. Rabinowitz, Quantitative Analysis of NAD Synthesis-Breakdown Fluxes, *Cell Metab.* 27 (2018) 1067–1080.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.018>.
- [81] Y. Sasaki, T. Araki, J. Milbrandt, Stimulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthetic Pathways Delays Axonal Degeneration after Axotomy, *J. Neurosci.* 26 (2006) 8484–8491. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2320-06.2006>.
- [82] J.M. Rawling, T.M. Jackson, E.R. Driscoll, J.B. Kirkland, Dietary Niacin Deficiency Lowers Tissue Poly(ADP-Ribose) and NAD<sup>+</sup> Concentrations in Fischer-344 Rats, *J. Nutr.* 124 (1994) 1597–1603. <https://doi.org/10.1093/jn/124.9.1597>.
- [83] V. Kulikova, K. Shabalina, K. Nerinowski, C. Dölle, M. Niere, A. Yakimov, P. Redpath, M. Khodorkovskiy, M.E. Migaud, M. Ziegler, A. Nikiforov, Generation, Release, and Uptake of the NAD Precursor Nicotinic Acid Riboside by Human Cells, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 27124–27137. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.664458>.
- [84] J.R. Revollo, A.A. Grimm, S. Imai, The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 50754–50763. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408388200>.
- [85] J.R. Revollo, A. Körner, K.F. Mills, A. Satoh, T. Wang, A. Garten, B. Dasgupta, Y. Sasaki, C. Wolberger, R.R. Townsend, J. Milbrandt, W. Kiess, S.-I. Imai, Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme, *Cell Metab.* 6 (2007) 363–375. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.09.003>.
- [86] M. Majewski, A. Kozłowska, M. Thoene, E. Lepiarczyk, W.J. Grzegorzewski, Overview of the role of vitamins and minerals on the kynurenine pathway in health and disease, *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 67 (2016) 3–19.
- [87] J.W. Lee, C.-L. Chou, M.A. Knepper, Deep Sequencing in Microdissected Renal Tubules Identifies Nephron Segment-Specific Transcriptomes, *J. Am. Soc. Nephrol.* 26 (2015) 2669–2677. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014111067>.
- [88] K. Limbutara, C.-L. Chou, M.A. Knepper, Quantitative Proteomics of All 14 Renal Tubule Segments in Rat, *J. Am. Soc. Nephrol.* 31 (2020) 1255–1266. <https://doi.org/10.1681/ASN.2020010071>.
- [89] A.A.-B. Badawy, Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects, *Int. J. Tryptophan Res. IJTR.* 10 (2017) 1178646917691938. <https://doi.org/10.1177/1178646917691938>.

- [90] E. Verdin, NAD<sup>+</sup> in aging, metabolism, and neurodegeneration, *Science*. 350 (2015) 1208–1213. <https://doi.org/10.1126/science.aac4854>.
- [91] S.-J. Lin, L. Guarente, Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 241–246. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00006-1](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00006-1).
- [92] R.A. Zager, A.C.M. Johnson, S.Y. Hanson, Renal tubular triglyceride accumulation following endotoxic, toxic, and ischemic injury, *Kidney Int.* 67 (2005) 111–121. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00061.x>.
- [93] A. Gaikwad, D.J. Long, J.L. Stringer, A.K. Jaiswal, *In Vivo* Role of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) in the Regulation of Intracellular Redox State and Accumulation of Abdominal Adipose Tissue, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 22559–22564. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101053200>.
- [94] F. Chen, S. Haigh, S. Barman, D.J.R. Fulton, From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system, *Front. Physiol.* 3 (2012) 412. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00412>.
- [95] K. Schröder, M. Zhang, S. Benkhoff, A. Mieth, R. Pliquett, J. Kosowski, C. Kruse, P. Luedike, U.R. Michaelis, N. Weissmann, S. Dimmeler, A.M. Shah, R.P. Brandes, Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase, *Circ. Res.* 110 (2012) 1217–1225. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.267054>.
- [96] Y. Nisimoto, B.A. Diebold, D. Cosentino-Gomes, J.D. Lambeth, Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor, *Biochemistry.* 53 (2014) 5111–5120. <https://doi.org/10.1021/bi500331y>.
- [97] W.L. Kraus, PARPs and ADP-Ribosylation: 50 Years ... and Counting, *Mol. Cell.* 58 (2015) 902–910. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.006>.
- [98] A.K.L. Leung, PARPs, *Curr. Biol.* 27 (2017) R1256–R1258. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.054>.
- [99] M.M. Murata, X. Kong, E. Moncada, Y. Chen, H. Imamura, P. Wang, M.W. Berns, K. Yokomori, M.A. Digrman, NAD<sup>+</sup> consumption by PARP1 in response to DNA damage triggers metabolic shift critical for damaged cell survival, *Mol. Biol. Cell.* 30 (2019) 2584–2597. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-10-0650>.
- [100] N. Xie, L. Zhang, W. Gao, C. Huang, P.E. Huber, X. Zhou, C. Li, G. Shen, B. Zou, NAD<sup>+</sup> metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential, *Signal Transduct. Target. Ther.* 5 (2020) 227. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00311-7>.
- [101] X. Jiao, S.K. Doamekpor, J.G. Bird, B.E. Nickels, L. Tong, R.P. Hart, M. Kiledjian, 5' End Nicotinamide Adenine Dinucleotide Cap in Human Cells Promotes RNA Decay through DXO-Mediated deNADding, *Cell.* 168 (2017) 1015–1027.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.019>.
- [102] B.A. Gibson, W.L. Kraus, New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 411–424. <https://doi.org/10.1038/nrm3376>.
- [103] A.H. Boulares, A.G. Yakovlev, V. Ivanova, B.A. Stoica, G. Wang, S. Iyer, M. Smulson, Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 22932–22940. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.22932>.
- [104] P. Poltronieri, A. Celetti, L. Palazzo, Mono(ADP-ribosyl)ation Enzymes and NAD<sup>+</sup> Metabolism: A Focus on Diseases and Therapeutic Perspectives, *Cells.* 10 (2021) 128. <https://doi.org/10.3390/cells10010128>.
- [105] M. Morigi, L. Perico, A. Benigni, Sirtuins in Renal Health and Disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* 29 (2018) 1799–1809. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017111218>.

- [106] B.J. North, B.L. Marshall, M.T. Borra, J.M. Denu, E. Verdin, The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase, *Mol. Cell.* 11 (2003) 437–444. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00038-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00038-8).
- [107] E. Michishita, J.Y. Park, J.M. Burneskis, J.C. Barrett, I. Horikawa, Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins, *Mol. Biol. Cell.* 16 (2005) 4623–4635. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-01-0033>.
- [108] W. He, Y. Wang, M.-Z. Zhang, L. You, L.S. Davis, H. Fan, H.-C. Yang, A.B. Fogo, R. Zent, R.C. Harris, M.D. Breyer, C.-M. Hao, Sirt1 activation protects the mouse renal medulla from oxidative injury, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 1056–1068. <https://doi.org/10.1172/JCI41563>.
- [109] Y. Guan, C.-M. Hao, SIRT1 and Kidney Function, *Kidney Dis. Basel Switz.* 1 (2016) 258–265. <https://doi.org/10.1159/000440967>.
- [110] T. Koyama, S. Kume, D. Koya, S. Araki, K. Isshiki, M. Chin-Kanasaki, T. Sugimoto, M. Haneda, T. Sugaya, A. Kashiwagi, H. Maegawa, T. Uzu, SIRT3 attenuates palmitate-induced ROS production and inflammation in proximal tubular cells, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 1258–1267. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.028>.
- [111] M. Fontecha-Barriuso, D. Martin-Sanchez, J. Martinez-Moreno, M. Monsalve, A. Ramos, M. Sanchez-Niño, M. Ruiz-Ortega, A. Ortiz, A. Sanz, The Role of PGC-1 $\alpha$  and Mitochondrial Biogenesis in Kidney Diseases, *Biomolecules.* 10 (2020) 347. <https://doi.org/10.3390/biom10020347>.
- [112] P. Bai, C. Canto, H. Oudart, A. Brunyánszki, Y. Cen, C. Thomas, H. Yamamoto, A. Huber, B. Kiss, R.H. Houtkooper, K. Schoonjans, V. Schreiber, A.A. Sauve, J.M. Murcia, J. Auwerx, PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation, *Cell Metab.* 13 (2011) 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.004>.
- [113] Z. Li, K. Xu, N. Zhang, G. Amador, Y. Wang, S. Zhao, L. Li, Y. Qiu, Z. Wang, Overexpressed SIRT6 attenuates cisplatin-induced acute kidney injury by inhibiting ERK1/2 signaling, *Kidney Int.* 93 (2018) 881–892. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.10.021>.
- [114] M. Morigi, L. Perico, C. Rota, L. Longaretti, S. Conti, D. Rottoli, R. Novelli, G. Remuzzi, A. Benigni, Sirtuin 3–dependent mitochondrial dynamic improvements protect against acute kidney injury, *J. Clin. Invest.* 125 (2015) 715–726. <https://doi.org/10.1172/JCI77632>.
- [115] J.W. Chang, H. Kim, C.H. Baek, R.B. Lee, W.S. Yang, S.K. Lee, Up-Regulation of SIRT1 Reduces Endoplasmic Reticulum Stress and Renal Fibrosis, *Nephron.* 133 (2016) 116–128. <https://doi.org/10.1159/000447067>.
- [116] K. Hasegawa, S. Wakino, P. Simic, Y. Sakamaki, H. Minakuchi, K. Fujimura, K. Hosoya, M. Komatsu, Y. Kaneko, T. Kanda, E. Kubota, H. Tokuyama, K. Hayashi, L. Guarente, H. Itoh, Renal tubular Sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing Claudin-1 overexpression in podocytes, *Nat. Med.* 19 (2013) 1496–1504. <https://doi.org/10.1038/nm.3363>.
- [117] Q. Hong, L. Zhang, B. Das, Z. Li, B. Liu, G. Cai, X. Chen, P.Y. Chuang, J.C. He, K. Lee, Increased podocyte Sirtuin-1 function attenuates diabetic kidney injury, *Kidney Int.* 93 (2018) 1330–1343. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.12.008>.
- [118] Y. Ogura, M. Kitada, I. Monno, K. Kanasaki, A. Watanabe, D. Koya, Renal mitochondrial oxidative stress is enhanced by the reduction of Sirt3 activity, in Zucker diabetic fatty rats, *Redox Rep.* 23 (2018) 153–159. <https://doi.org/10.1080/13510002.2018.1487174>.

- [119] A. Papadimitriou, K.C. Silva, E.B.M.I. Peixoto, C.M. Borges, J.M. Lopes de Faria, J.B. Lopes de Faria, Theobromine increases NAD<sup>+</sup>/Sirt-1 activity and protects the kidney under diabetic conditions, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 308 (2015) F209–F225. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00252.2014>.
- [120] V. Quarona, G. Zaccarello, A. Chillemi, E. Brunetti, V.K. Singh, E. Ferrero, A. Funaro, A.L. Horenstein, F. Malavasi, CD38 and CD157: A long journey from activation markers to multifunctional molecules, *Cytometry B Clin. Cytom.* 84B (2013) 207–217. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21092>.
- [121] S. Takasawa, CD38–Cyclic ADP-Ribose Signal System in Physiology, Biochemistry, and Pathophysiology, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 4306. <https://doi.org/10.3390/ijms23084306>.
- [122] W. Wei, R. Graeff, J. Yue, Roles and mechanisms of the CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose/Ca(2+) signaling pathway, *World J. Biol. Chem.* 5 (2014) 58–67. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v5.i1.58>.
- [123] T.L. Thai, W.J. Arendshorst, Mice lacking the ADP ribosyl cyclase CD38 exhibit attenuated renal vasoconstriction to angiotensin II, endothelin-1, and norepinephrine, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 297 (2009) F169–176. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00079.2009>.
- [124] Y. Ogura, M. Kitada, J. Xu, I. Monno, D. Koya, CD38 inhibition by apigenin ameliorates mitochondrial oxidative stress through restoration of the intracellular NAD<sup>+</sup>/NADH ratio and Sirt3 activity in renal tubular cells in diabetic rats, *Aging.* 12 (2020) 11325–11336. <https://doi.org/10.18632/aging.103410>.
- [125] B. Shu, Y. Feng, Y. Gui, Q. Lu, W. Wei, X. Xue, X. Sun, W. He, J. Yang, C. Dai, Blockade of CD38 diminishes lipopolysaccharide-induced macrophage classical activation and acute kidney injury involving NF- $\kappa$ B signaling suppression, *Cell. Signal.* 42 (2018) 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.10.014>.
- [126] S.-Y. Kim, K.-H. Park, R. Gul, K.Y. Jang, U.-H. Kim, Role of kidney ADP-ribosyl cyclase in diabetic nephropathy, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 296 (2009) F291–297. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90381.2008>.
- [127] M. Mink, B. Fogelgren, K. Olszewski, P. Maroy, K. Csiszar, A novel human gene (SARM) at chromosome 17q11 encodes a protein with a SAM motif and structural similarity to Armadillo/beta-catenin that is conserved in mouse, *Drosophila*, and *Caenorhabditis elegans*, *Genomics.* 74 (2001) 234–244. <https://doi.org/10.1006/geno.2001.6548>.
- [128] A. Sarkar, N. Kumari, P. Mukherjee, The curious case of SARM1: Dr. Jekyll and Mr. Hyde in cell death and immunity?, *FEBS J.* 290 (2023) 340–358. <https://doi.org/10.1111/febs.16256>.
- [129] P. Panneerselvam, L.P. Singh, V. Selvarajan, W.J. Chng, S.B. Ng, N.S. Tan, B. Ho, J. Chen, J.L. Ding, T-cell death following immune activation is mediated by mitochondria-localized SARM, *Cell Death Differ.* 20 (2013) 478–489. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.144>.
- [130] C.A. Elvehjem, R.J. Madden, F.M. Strong, D.W. Woolley, RELATION OF NICOTINIC ACID AND NICOTINIC ACID AMIDE TO CANINE BLACK TONGUE, *J. Am. Chem. Soc.* 59 (1937) 1767–1768. <https://doi.org/10.1021/ja01288a509>.
- [131] L. Chanvillard, A. Tammaro, V. Sorrentino, NAD<sup>+</sup> Metabolism and Interventions in Premature Renal Aging and Chronic Kidney Disease, *Cells.* 12 (2023) 21. <https://doi.org/10.3390/cells12010021>.
- [132] Y.-M. Wang, R.-L. Han, S.-G. Song, X.-P. Yuan, X.-S. Ren, Inhibition of PARP overactivation protects acute kidney injury of septic shock, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22 (2018) 6049–6056. [https://doi.org/10.26355/eurev\\_201809\\_15942](https://doi.org/10.26355/eurev_201809_15942).

- [133] M. Morevati, S. Egstrand, A. Nordholm, M.L. Mace, C.B. Andersen, R. Salmani, K. Olgaard, E. Lewin, Effect of NAD<sup>+</sup> boosting on kidney ischemia-reperfusion injury, *PLoS One*. 16 (2021) e0252554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252554>.
- [134] T. Doke, S. Mukherjee, D. Mukhi, P. Dhillon, A. Abedini, J.G. Davis, K. Chellappa, B. Chen, J.A. Baur, K. Susztak, NAD<sup>+</sup> precursor supplementation prevents mtRNA/RIG-I-dependent inflammation during kidney injury, *Nat. Metab.* 5 (2023) 414–430. <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00761-7>.
- [135] J.-D. Morel, M.B. Sleiman, T.Y. Li, G. von Alvensleben, A.M. Bachmann, D. Hofer, E. Broeckx, J.Y. Ma, V. Carreira, T. Chen, N. Azhar, R.A. Gonzalez-Villalobos, M. Breyer, D. Reilly, S. Mullican, J. Auwerx, Mitochondrial and NAD<sup>+</sup> metabolism predict recovery from acute kidney injury in a diverse mouse population, *JCI Insight*. 8 (2023) e164626. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.164626>.
- [136] Y. Chen, Y. Liang, T. Hu, R. Wei, C. Cai, P. Wang, L. Wang, W. Qiao, L. Feng, Endogenous Nampt upregulation is associated with diabetic nephropathy inflammatory-fibrosis through the NF- $\kappa$ B p65 and Sirt1 pathway; NMN alleviates diabetic nephropathy inflammatory-fibrosis by inhibiting endogenous Nampt, *Exp. Ther. Med.* 14 (2017) 4181–4193. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5098>.
- [137] A. Faivre, E. Katsyuba, T. Verissimo, M. Lindenmeyer, R.D. Rajaram, M. Naesens, C. Heckenmeyer, A. Mottis, E. Feraille, P. Cippà, C. Cohen, A. Longchamp, F. Allagnat, J.M. Rutkowski, D. Legouis, J. Auwerx, S. de Seigneux, Differential role of nicotinamide adenine dinucleotide deficiency in acute and chronic kidney disease, *Nephrol. Dial. Transplant.* 36 (2021) 60–68. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfaa124>.
- [138] H. Shi, A. Enriquez, M. Rapadas, E.M.M.A. Martin, R. Wang, J. Moreau, C.K. Lim, J.O. Szot, E. Ip, J.N. Hughes, K. Sugimoto, D.T. Humphreys, A.M. McInerney-Leo, P.J. Leo, G.J. Maghzal, J. Halliday, J. Smith, A. Colley, P.R. Mark, F. Collins, D.O. Sillence, D.S. Winlaw, J.W.K. Ho, G.J. Guillemin, M.A. Brown, K. Kikuchi, P.Q. Thomas, R. Stocker, E. Giannoulatou, G. Chapman, E.L. Duncan, D.B. Sparrow, S.L. Dunwoodie, NAD Deficiency, Congenital Malformations, and Niacin Supplementation, *N. Engl. J. Med.* 377 (2017) 544–552. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1616361>.
- [139] A.J. Clark, M.C. Saade, V. Vemireddy, K.Q. Vu, B.M. Flores, V. Etzrodt, E.J. Ciampa, H. Huang, A. Takakura, K. Zandi-Nejad, Z.K. Zsengellér, S.M. Parikh, HNF4 $\alpha$  mediated QPRT expression in the kidney facilitates resilience against acute kidney injury, *BioRxiv*. (2023) 2023.05.23.541987. <https://doi.org/10.1101/2023.05.23.541987>.
- [140] S.W. Standage, S. Xu, L. Brown, Q. Ma, A. Koterba, P. Lahni, P. Devarajan, M.A. Kennedy, NMR-based serum and urine metabolomic profile reveals suppression of mitochondrial pathways in experimental sepsis-associated acute kidney injury, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 320 (2021) F984–F1000. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00582.2020>.
- [141] M. Tran, D. Tam, A. Bardia, M. Bhasin, G.C. Rowe, A. Kher, Z.K. Zsengeller, M.R. Akhavan-Sharif, E.V. Khankin, M. Saintgeniez, S. David, D. Burstein, S.A. Karumanchi, I.E. Stillman, Z. Arany, S.M. Parikh, PGC-1 $\alpha$  promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 4003–4014. <https://doi.org/10.1172/JCI58662>.
- [142] S. Lj, W. Rm, S. Rg, Suppressed mitochondrial biogenesis in folic acid-induced acute kidney injury and early fibrosis, *Toxicol. Lett.* 224 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.11.014>.
- [143] A. Poyan Mehr, S.M. Parikh, PPAR $\gamma$ -Coactivator-1 $\alpha$ , Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Renal Stress Resistance, *Nephron.* 137 (2017) 253–255. <https://doi.org/10.1159/000471895>.

- [144] J.T. Rodgers, C. Lerin, W. Haas, S.P. Gygi, B.M. Spiegelman, P. Puigserver, Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1, *Nature*. 434 (2005) 113–118. <https://doi.org/10.1038/nature03354>.
- [145] A.J. Clark, S.M. Parikh, Targeting energy pathways in kidney disease: the roles of sirtuins, AMPK, and PGC1 $\alpha$ , *Kidney Int.* 99 (2021) 828–840. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.09.037>.
- [146] S. Ugur, R. Ulu, A. Dogukan, A. Gurel, I.P. Yigit, N. Gozel, B. Aygen, N. Ilhan, The renoprotective effect of curcumin in cisplatin-induced nephrotoxicity, *Ren. Fail.* 37 (2015) 332–336. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2014.986005>.
- [147] K. Saito, S. Fujigaki, M.P. Heyes, K. Shibata, M. Takemura, H. Fujii, H. Wada, A. Noma, M. Seishima, Mechanism of increases in L -kynurenine and quinolinic acid in renal insufficiency, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279 (2000) F565–F572. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.3.F565>.
- [148] D. Pawlak, A. Tankiewicz, T. Matys, W. Buczeko, Peripheral distribution of kynurenine metabolites and activity of kynurenine pathway enzymes in renal failure, *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 54 (2003) 175–189.
- [149] X. Liu, D. Luo, S. Huang, S. Liu, B. Zhang, F. Wang, J. Lu, J. Chen, S. Li, Impaired Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthesis in the Kidney of Chronic Kidney Disease, *Front. Physiol.* 12 (2021) 723690. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.723690>.
- [150] R. Takahashi, T. Kanda, M. Komatsu, T. Itoh, H. Minakuchi, H. Urai, T. Kuroita, S. Shigaki, T. Tsukamoto, N. Higuchi, M. Ikeda, R. Yamanaka, N. Yoshimura, T. Ono, H. Yukioka, K. Hasegawa, H. Tokuyama, S. Wakino, H. Itoh, The significance of NAD<sup>+</sup> metabolites and nicotinamide N-methyltransferase in chronic kidney disease, *Sci. Rep.* 12 (2022) 6398. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10476-6>.
- [151] H. Muraoka, K. Hasegawa, Y. Sakamaki, H. Minakuchi, T. Kawaguchi, I. Yasuda, T. Kanda, H. Tokuyama, S. Wakino, H. Itoh, Role of Nampt-Sirt6 Axis in Renal Proximal Tubules in Extracellular Matrix Deposition in Diabetic Nephropathy, *Cell Rep.* 27 (2019) 199–212.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.024>.
- [152] Y.S. Kang, H.K. Song, M.H. Lee, G.J. Ko, J.Y. Han, S.Y. Han, K.H. Han, H.K. Kim, D.R. Cha, Visfatin is upregulated in type-2 diabetic rats and targets renal cells, *Kidney Int.* 78 (2010) 170–181. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.98>.
- [153] A. Benito-Martin, A.C. Ucero, M.C. Izquierdo, B. Santamaria, B. Picatoste, S. Carrasco, O. Lorenzo, M. Ruiz-Ortega, J. Egido, A. Ortiz, Endogenous NAMPT dampens chemokine expression and apoptotic responses in stressed tubular cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 1842 (2014) 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.022>.
- [154] R. Korstanje, K. Deutsch, P. Bolanos-Palmieri, N. Hanke, P. Schroder, L. Staggs, J.H. Bräsen, I.S.D. Roberts, S. Sheehan, H. Savage, H. Haller, M. Schiffer, Loss of Kynurenine 3-Mono-oxygenase Causes Proteinuria, *J. Am. Soc. Nephrol.* 27 (2016) 3271–3277. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015070835>.
- [155] A. Lenglet, S. Liabeuf, S. Bodeau, L. Louvet, A. Mary, A. Boullier, A.S. Lemaire-Hurtel, A. Jonet, P. Sonnet, S. Kamel, Z.A. Massy, N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (2PY)-Major Metabolite of Nicotinamide: An Update on an Old Uremic Toxin, *Toxins.* 8 (2016) 339. <https://doi.org/10.3390/toxins8110339>.
- [156] K. Sharma, B. Karl, A.V. Mathew, J.A. Gangoiti, C.L. Wassel, R. Saito, M. Pu, S. Sharma, Y.-H. You, L. Wang, M. Diamond-Stanic, M.T. Lindenmeyer, C. Forsblom, W. Wu, J.H. Ix, T. Ideker, J.B. Kopp, S.K. Nigam, C.D. Cohen, P.-H. Groop, B.A. Barshop, L. Natarajan, W.L. Nyhan, R.K. Naviaux, Metabolomics reveals signature of mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* 24 (2013) 1901–1912. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013020126>.



- [157] L.L. Dugan, Y.-H. You, S.S. Ali, M. Diamond-Stanic, S. Miyamoto, A.-E. DeClevés, A. Andreyev, T. Quach, S. Ly, G. Shekhtman, W. Nguyen, A. Chepetan, T.P. Le, L. Wang, M. Xu, K.P. Paik, A. Fogo, B. Viollet, A. Murphy, F. Brosius, R.K. Naviaux, K. Sharma, AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 4888–4899. <https://doi.org/10.1172/JCI66218>.
- [158] H.M. Kang, S.H. Ahn, P. Choi, Y.-A. Ko, S.H. Han, F. Chinga, A.S.D. Park, J. Tao, K. Sharma, J. Pullman, E.P. Bottinger, I.J. Goldberg, K. Susztak, Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development, *Nat. Med.* 21 (2015) 37–46. <https://doi.org/10.1038/nm.3762>.
- [159] J. Long, S.S. Badal, Z. Ye, Y. Wang, B.A. Ayanga, D.L. Galvan, N.H. Green, B.H. Chang, P.A. Overbeek, F.R. Danesh, Long noncoding RNA Tug1 regulates mitochondrial bioenergetics in diabetic nephropathy, *J. Clin. Invest.* 126 (2016) 4205–4218. <https://doi.org/10.1172/JCI87927>.
- [160] P.K. Chatterjee, S. Cuzzocrea, C. Thiemermann, Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase protect rat proximal tubular cells against oxidant stress, *Kidney Int.* 56 (1999) 973–984. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00644.x>.
- [161] D.M. Filipovic, X. Meng, W.B. Reeves, Inhibition of PARP prevents oxidant-induced necrosis but not apoptosis in LLC-PK1 cells, *Am. J. Physiol.* 277 (1999) F428–436. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1999.277.3.F428>.
- [162] S. Liu, J. Liu, D. Liu, X. Wang, R. Yang, Inhibition of Poly-(ADP-Ribose) Polymerase Protects the Kidney in a Canine Model of Endotoxic Shock, *Nephron.* 130 (2015) 281–292. <https://doi.org/10.1159/000435815>.
- [163] M. Morevati, E.F. Fang, M.L. Mace, M. Kanbay, E. Gravesen, A. Nordholm, S. Egstrand, M. Hornum, Roles of NAD<sup>+</sup> in Acute and Chronic Kidney Diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2022) 137. <https://doi.org/10.3390/ijms24010137>.
- [164] F. O’Valle, R.G.M. Del Moral, M. del C. Benítez, D. Martín-Oliva, M. Gómez-Morales, D. Aguilar, J. Aneiros-Fernández, P. Hernández-Cortés, A. Osuna, F. Moreso, D. Serón, F.J. Oliver, R.G. Del Moral, Poly[ADP-ribose] polymerase-1 expression is related to cold ischemia, acute tubular necrosis, and delayed renal function in kidney transplantation, *PloS One.* 4 (2009) e7138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007138>.
- [165] F. O’Valle, M. Gómez-Morales, R.M.G. Del Moral, D. Serón, F. Moreso, A. Osuna, F.J. Oliver, R.G. Del Moral, Poly(ADP-Ribose) Polymerase Expression in Kidney Transplantation: From Alfa ( $\alpha$ ) to Omega ( $\Omega$ ), *Transplant. Proc.* 39 (2007) 2099–2101. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.07.075>.
- [166] K. Devalaraja-Narashimha, K. Singaravelu, B.J. Padanilam, Poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell injury in acute renal failure, *Pharmacol. Res.* 52 (2005) 44–59. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.02.022>.
- [167] D.R. Martin, A.J.P. Lewington, M.R. Hammerman, B.J. Padanilam, Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates ischemic renal injury in rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279 (2000) R1834–R1840. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.5.R1834>.
- [168] P. Aksoy, T.A. White, M. Thompson, E.N. Chini, Regulation of intracellular levels of NAD: a novel role for CD38, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (2006) 1386–1392. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.042>.
- [169] G.S. Young, E. Choleris, F.E. Lund, J.B. Kirkland, Decreased cADPR and increased NAD<sup>+</sup> in the Cd38<sup>-/-</sup> mouse, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346 (2006) 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.100>.

- [170] C. Escande, V. Nin, N.L. Price, V. Capellini, A.P. Gomes, M.T. Barbosa, L. O’Neil, T.A. White, D.A. Sinclair, E.N. Chini, Flavonoid apigenin is an inhibitor of the NAD<sup>+</sup> ase CD38: implications for cellular NAD<sup>+</sup> metabolism, protein acetylation, and treatment of metabolic syndrome, *Diabetes*. 62 (2013) 1084–1093. <https://doi.org/10.2337/db12-1139>.
- [171] J. Xu, M. Kitada, D. Koya, NAD<sup>+</sup> Homeostasis in Diabetic Kidney Disease, *Front. Med.* 8 (2021) 703076. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.703076>.
- [172] A.A. Pieper, D.J. Brat, D.K. Krug, C.C. Watkins, A. Gupta, S. Blackshaw, A. Verma, Z.Q. Wang, S.H. Snyder, Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 3059–3064. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3059>.
- [173] H. Shevalye, Y. Maksimchyk, P. Watcho, I.G. Obrosova, Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene deficiency alleviates diabetic kidney disease, *Biochim. Biophys. Acta*. 1802 (2010) 1020–1027. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.07.004>.
- [174] J. Kim, B.J. Padanilam, Loss of poly(ADP-ribose) polymerase 1 attenuates renal fibrosis and inflammation during unilateral ureteral obstruction, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 301 (2011) F450–459. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00059.2011>.
- [175] E.M. Zakaria, N.N. El-Maraghy, A.F. Ahmed, A.A. Ali, H.M. El-Bassossy, PARP inhibition ameliorates nephropathy in an animal model of type 2 diabetes: focus on oxidative stress, inflammation, and fibrosis, *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 390 (2017) 621–631. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1360-9>.
- [176] Y. Guan, S.-R. Wang, X.-Z. Huang, Q. Xie, Y.-Y. Xu, D. Shang, C.-M. Hao, Nicotinamide Mononucleotide, an NAD<sup>+</sup> Precursor, Rescues Age-Associated Susceptibility to AKI in a Sirtuin 1–Dependent Manner, *J. Am. Soc. Nephrol.* 28 (2017) 2337–2352. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016040385>.
- [177] A.P. Gomes, N.L. Price, A.J.Y. Ling, J.J. Moslehi, M.K. Montgomery, L. Rajman, J.P. White, J.S. Teodoro, C.D. Wrann, B.P. Hubbard, E.M. Mercken, C.M. Palmeira, R. de Cabo, A.P. Rolo, N. Turner, E.L. Bell, D.A. Sinclair, Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging, *Cell*. 155 (2013) 1624–1638. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.037>.
- [178] N. Braidy, G.J. Guillemin, H. Mansour, T. Chan-Ling, A. Poljak, R. Grant, Age Related Changes in NAD<sup>+</sup> Metabolism Oxidative Stress and Sirt1 Activity in Wistar Rats, *PLoS ONE*. 6 (2011) e19194. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019194>.
- [179] H. Zhang, D. Ryu, Y. Wu, K. Gariani, X. Wang, P. Luan, D. D’Amico, E.R. Ropelle, M.P. Lutolf, R. Aebersold, K. Schoonjans, K.J. Menzies, J. Auwerx, NAD<sup>+</sup> repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice, *Science*. 352 (2016) 1436–1443. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2693>.
- [180] A. Sureshbabu, S.W. Ryter, M.E. Choi, Oxidative stress and autophagy: crucial modulators of kidney injury, *Redox Biol.* 4 (2015) 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.001>.
- [181] B.B. Ratliff, W. Abdulmahdi, R. Pawar, M.S. Wolin, Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease, *Antioxid. Redox Signal.* 25 (2016) 119–146. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6665>.
- [182] K.M. Holmström, T. Finkel, Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 411–421. <https://doi.org/10.1038/nrm3801>.
- [183] K.W. Chung, E.K. Lee, M.K. Lee, G.T. Oh, B.P. Yu, H.Y. Chung, Impairment of PPAR $\alpha$  and the Fatty Acid Oxidation Pathway Aggravates Renal Fibrosis during Aging, *J. Am. Soc. Nephrol.* 29 (2018) 1223. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017070802>.

- [184] A.C.M. Johnson, A. Stahl, R.A. Zager, Triglyceride accumulation in injured renal tubular cells: alterations in both synthetic and catabolic pathways, *Kidney Int.* 67 (2005) 2196–2209. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00325.x>.
- [185] D. Portilla, Role of fatty acid beta-oxidation and calcium-independent phospholipase A2 in ischemic acute renal failure, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 8 (1999) 473–477. <https://doi.org/10.1097/00041552-199907000-00012>.
- [186] J. Li, Y. Yang, Q. Li, S. Wei, Y. Zhou, W. Yu, L. Xue, L. Zhou, L. Shen, G. Lu, L. Chen, S. Tao, STAT6 contributes to renal fibrosis by modulating PPAR $\alpha$ -mediated tubular fatty acid oxidation, *Cell Death Dis.* 13 (2022) 66. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04515-3>.
- [187] N. Simon, A. Hertig, Alteration of Fatty Acid Oxidation in Tubular Epithelial Cells: From Acute Kidney Injury to Renal Fibrogenesis, *Front. Med.* 2 (2015) 52. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00052>.
- [188] Y. Xu, J. Huang, W. Xin, L. Chen, X. Zhao, Z. Lv, Y. Liu, Q. Wan, Lipid accumulation is ahead of epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention by acetyl-CoA carboxylase 2 silence in diabetic nephropathy, *Metabolism.* 63 (2014) 716–726. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.02.010>.
- [189] P.P. Deshpande, M.A. Perazella, K.D. Jhaveri, PARP inhibitors and the Kidney, *J. Onco-Nephrol.* 5 (2021) 42–47. <https://doi.org/10.1177/2399369320987090>.
- [190] J.A. Funk, S. Odejinmi, R.G. Schnellmann, SRT1720 induces mitochondrial biogenesis and rescues mitochondrial function after oxidant injury in renal proximal tubule cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333 (2010) 593–601. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.161992>.
- [191] R. Zapata-Pérez, A. Tammaro, B.V. Schomakers, A.M.L. Scantlebery, S. Denis, H.L. Elfrink, J. Giroud-Gerbetant, C. Cantó, C. López-Leonardo, R.L. McIntyre, M. van Weeghel, Á. Sánchez-Ferrer, R.H. Houtkooper, Reduced nicotinamide mononucleotide is a new and potent NAD<sup>+</sup> precursor in mammalian cells and mice, *FASEB J.* 35 (2021) e21456. <https://doi.org/10.1096/fj.202001826R>.
- [192] J. Yoshino, J.A. Baur, S.-I. Imai, NAD<sup>+</sup> Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR, *Cell Metab.* 27 (2018) 513–528. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.11.002>.
- [193] S.T. Tai, Y.H. Fu, Y.C. Yang, J.J. Wang, Niacin ameliorates kidney warm ischemia and reperfusion injury-induced ventricular dysfunction and oxidative stress and disturbance in mitochondrial metabolism in rats, *Transplant. Proc.* 47 (2015) 1079–1082. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.11.057>.
- [194] S.H.S. Santos, V.H.D. Guimarães, J.R. Oliveira, L.F. Rezende, Chapter 3 - Sirtuins and metabolic regulation: food and supplementation, in: K. Maiese (Ed.), *Sirtuin Biol. Cancer Metab. Dis.*, Academic Press, 2021: pp. 39–59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822467-0.00003-6>.
- [195] J.A. Funk, R.G. Schnellmann, Accelerated recovery of renal mitochondrial and tubule homeostasis with SIRT1/PGC-1 $\alpha$  activation following ischemia–reperfusion injury, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 273 (2013) 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.09.026>.
- [196] H. Wang, Y. Guan, M.A. Karamercan, L. Ye, T. Bhatti, L.B. Becker, J.A. Baur, C.A. Sims, Resveratrol Rescues Kidney Mitochondrial Function Following Hemorrhagic Shock, *Shock* 44 (2015) 173–180. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000390>.
- [197] A. Piedrafita, S. Balayssac, N. Mayeur, S. Gazut, J. Grossac, M. Buleon, M. Alves, J. Klein, V. Minville, B. Marcheix, J.P. Schanstra, S. Faguer, The tryptophan pathway and nicotinamide supplementation in ischaemic acute kidney injury, *Clin. Kidney J.* 14 (2021) 2490–2496. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfab050>.

- [198] P. Simic, X.F. Vela Parada, S.M. Parikh, R. Dellinger, L.P. Guarente, E.P. Rhee, Nicotinamide riboside with pterostilbene (NRPT) increases NAD<sup>+</sup> in patients with acute kidney injury (AKI): a randomized, double-blind, placebo-controlled, stepwise safety study of escalating doses of NRPT in patients with AKI, *BMC Nephrol.* 21 (2020) 342. <https://doi.org/10.1186/s12882-020-02006-1>.
- [199] R. Claire-Del Granado, A. Torrico Salinas, R.L. Mehta, S.M. Parikh, WCN23-0889 Vitamin B complex in patients with acute kidney injury the VIBAKI trial, *Kidney Int. Rep.* 8 (2023) S19. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2023.02.042>.
- [200] E. Mascolo, F. Verni, Vitamin B6 and Diabetes: Relationship and Molecular Mechanisms, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 3669. <https://doi.org/10.3390/ijms21103669>.
- [201] M. Zheng, J. Cai, Z. Liu, S. Shu, Y. Wang, C. Tang, Z. Dong, Nicotinamide reduces renal interstitial fibrosis by suppressing tubular injury and inflammation, *J. Cell. Mol. Med.* 23 (2019) 3995–4004. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14285>.
- [202] S. Kumakura, E. Sato, A. Sekimoto, Y. Hashizume, S. Yamakage, M. Miyazaki, S. Ito, H. Harigae, N. Takahashi, Nicotinamide Attenuates the Progression of Renal Failure in a Mouse Model of Adenine-Induced Chronic Kidney Disease, *Toxins.* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/toxins13010050>.
- [203] Y. Takahashi, A. Tanaka, T. Nakamura, T. Fukuwatari, K. Shibata, N. Shimada, I. Ebihara, H. Koide, Nicotinamide suppresses hyperphosphatemia in hemodialysis patients, *Kidney Int.* 65 (2004) 1099–1104. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00482.x>.
- [204] J.H. Ix, T. Isakova, B. Larive, K.L. Raphael, D.S. Raj, A.K. Cheung, S.M. Sprague, L.F. Fried, J.J. Gassman, J.P. Middleton, M.F. Flessner, G.A. Block, M. Wolf, Effects of Nicotinamide and Lanthanum Carbonate on Serum Phosphate and Fibroblast Growth Factor-23 in CKD: The COMBINE Trial, *J. Am. Soc. Nephrol.* 30 (2019) 1096–1108. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018101058>.
- [205] A. Srivastava, X. Cai, J. Lee, W. Li, B. Larive, C. Kendrick, J.J. Gassman, J.P. Middleton, J. Carr, K.L. Raphael, A.K. Cheung, D.S. Raj, M.B. Chonchol, L.F. Fried, G.A. Block, S.M. Sprague, M. Wolf, J.H. Ix, P.V. Prasad, T. Isakova, Kidney Functional Magnetic Resonance Imaging and Change in eGFR in Individuals with CKD, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (2020) 776–783. <https://doi.org/10.2215/CJN.13201019>.
- [206] A. Lenglet, S. Liabeuf, N. El Esper, S. Brisset, J. Mansour, A.-S. Lemaire-Hurtel, A. Mary, M. Brazier, S. Kamel, R. Mentaverri, G. Choukroun, A. Fournier, Z.A. Massy, Efficacy and safety of nicotinamide in haemodialysis patients: the NICOREN study, *Nephrol. Dial. Transplant.* 32 (2017) 870–879. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw042>.
- [207] A. Ahmadi, G. Begue, A.P. Valencia, J.E. Norman, B. Lidgard, B.J. Bennett, M.P. Van Doren, D.J. Marcinek, S. Fan, D.K. Prince, J. Gamboa, J. Himmelfarb, I.H. de Boer, B.R. Kestenbaum, B. Roshanravan, Randomized crossover clinical trial of coenzyme Q10 and nicotinamide riboside in chronic kidney disease, *JCI Insight.* 8 (2023) e167274. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.167274>.
- [208] K. Cho, H. Kim, B. Rodriguez-Iturbe, N.D. Vaziri, Niacin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and hypertension in rats with chronic renal failure, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 297 (2009) F106-113. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00126.2009>.
- [209] H. Jin Kang, D.K. Kim, S. Mi Lee, K. Han Kim, S. Hee Han, K. Hyun Kim, S. Eun Kim, Y. Ki Son, W.S. An, Effects of low-dose niacin on dyslipidemia and serum phosphorus in patients with chronic kidney disease, *Kidney Res. Clin. Pract.* 32 (2013) 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.krcp.2012.12.001>.
- [210] R.S. Kalil, J.H. Wang, I.H. de Boer, R.O. Mathew, J.H. Ix, A. Asif, X. Shi, W.E. Boden, Effect of Extended Release Niacin on Cardiovascular Events and Kidney Function in

- Chronic Kidney Disease: A Post-Hoc Analysis of the AIM-HIGH Trial, *Kidney Int.* 87 (2015) 1250–1257. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.383>.
- [211] Does Raising HDL-C With Niacin Improve Endothelial Function in Early CKD?, *clinicaltrials.gov*, 2014. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00852969> (accessed May 28, 2023).
- [212] *ClinicalTrials.Gov.* <https://www.clinicaltrials.gov/> (accessed May 28, 2023).
- [213] A. Tsuji, Y. Ikeda, S. Yoshikawa, K. Taniguchi, H. Sawamura, S. Morikawa, M. Nakashima, T. Asai, S. Matsuda, The Tryptophan and Kynurenine Pathway Involved in the Development of Immune-Related Diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 5742. <https://doi.org/10.3390/ijms24065742>.
- [214] A.A.-B. Badawy, Tryptophan Metabolism: A Versatile Area Providing Multiple Targets for Pharmacological Intervention, *Egypt. J. Basic Clin. Pharmacol.* 9 (2019). <https://doi.org/10.32527/2019/101415>.
- [215] H.N. Wee, J.-J. Liu, J. Ching, J.-P. Kovalik, S.C. Lim, The Kynurenine Pathway in Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease, *Am. J. Nephrol.* (2021) 1–17. <https://doi.org/10.1159/000519811>.
- [216] H. Rabb, M.D. Griffin, D.B. McKay, S. Swaminathan, P. Pickkers, M.H. Rosner, J.A. Kellum, C. Ronco, Inflammation in AKI: Current Understanding, Key Questions, and Knowledge Gaps, *J. Am. Soc. Nephrol.* 27 (2016) 371–379. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015030261>.
- [217] C.M. Robinson, P.T. Hale, J.M. Carlin, The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase, *J. Interferon Cytokine Res.* 25 (2005) 20–30. <https://doi.org/10.1089/jir.2005.25.20>.
- [218] A. Muneer, Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism in Neuropsychiatric Disorders: Pathophysiologic and Therapeutic Considerations, *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 18 (2020) 507–526. <https://doi.org/10.9758/cpn.2020.18.4.507>.
- [219] W. Hou, G. Huang, X. Cao, Y. Zhang, J. Zhang, Y. Li, Suppression of experimental autoimmune glomerulonephritis by tryptophan, *J. Nephrol.* 27 (2014) 19–28. <https://doi.org/10.1007/s40620-013-0020-5>.
- [220] E. Proietti, S. Rossini, U. Grohmann, G. Mondanelli, Polyamines and Kynurenines at the Intersection of Immune Modulation, *Trends Immunol.* 41 (2020) 1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.09.007>.
- [221] E. Wirthgen, A. Hoeflich, A. Rebl, J. Günther, Kynurenic Acid: The Janus-Faced Role of an Immunomodulatory Tryptophan Metabolite and Its Link to Pathological Conditions, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1957. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01957>.
- [222] N.M. Rogers, D.A. Ferenbach, J.S. Isenberg, A.W. Thomson, J. Hughes, Dendritic cells and macrophages in the kidney: a spectrum of good and evil, *Nat. Rev. Nephrol.* 10 (2014) 625–643. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.170>.
- [223] A.E. Mackenzie, J.E. Lappin, D.L. Taylor, S.A. Nicklin, G. Milligan, GPR35 as a Novel Therapeutic Target, *Front. Endocrinol.* 2 (2011) 68. <https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00068>.
- [224] J.M. Valdivielso, À. Eritja, M. Caus, M. Bozic, Glutamate-Gated NMDA Receptors: Insights into the Function and Signaling in the Kidney, *Biomolecules.* 10 (2020) 1051. <https://doi.org/10.3390/biom10071051>.
- [225] M. Pundir, S. Arora, T. Kaur, R. Singh, A.P. Singh, Effect of modulating the allosteric sites of N-methyl-D-aspartate receptors in ischemia-reperfusion induced acute kidney injury, *J. Surg. Res.* 183 (2013) 668–677. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.01.040>.
- [226] S. Arora, T. Kaur, A. Kaur, A.P. Singh, Glycine aggravates ischemia reperfusion-induced acute kidney injury through N-Methyl-D-Aspartate receptor activation in rats, *Mol. Cell. Biochem.* 393 (2014) 123–131. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2052-0>.

- [227] G. Frumento, R. Rotondo, M. Tonetti, G. Damonte, U. Benatti, G.B. Ferrara, Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 459–468. <https://doi.org/10.1084/jem.20020121>.
- [228] A.A.-B. Badawy, A.M.A. Namboodiri, J.R. Moffett, The end of the road for the tryptophan depletion concept in pregnancy and infection, *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979. 130 (2016) 1327–1333. <https://doi.org/10.1042/CS20160153>.
- [229] K. Orihara, S.O. Odemuyiwa, W.P. Stefura, R. Ilarraza, K.T. HayGlass, R. Moqbel, Neurotransmitter signalling via NMDA receptors leads to decreased T helper type 1-like and enhanced T helper type 2-like immune balance in humans, *Immunology.* 153 (2018) 368–379. <https://doi.org/10.1111/imm.12846>.
- [230] N.H. Raines, M.D. Cheung, L.S. Wilson, J.C. Edberg, N.B. Erdmann, A.A. Schmaier, T.F. Berryhill, Z. Manickas-Hill, J.Z. Li, X.G. Yu, A. Agarwal, S. Barnes, S.M. Parikh, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthetic Impairment and Urinary Metabolomic Alterations Observed in Hospitalized Adults With COVID-19-Related Acute Kidney Injury, *Kidney Int. Rep.* 6 (2021) 3002–3013. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2021.09.001>.
- [231] E.W. Holmes, P.M. Russell, G.J. Kinzler, C.R. Reckard, R.C. Flanigan, K.D. Thompson, E.W. Bermes, Oxidative tryptophan metabolism in renal allograft recipients: increased kynurenine synthesis is associated with inflammation and OKT3 therapy, *Cytokine.* 4 (1992) 205–213. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(92\)90057-x](https://doi.org/10.1016/1043-4666(92)90057-x).
- [232] G. Brandacher, F. Cakar, C. Winkler, S. Schneeberger, P. Obrist, C. Bösmüller, G. Werner-Felmayer, E.R. Werner, H. Bonatti, R. Margreiter, D. Fuchs, Non-invasive monitoring of kidney allograft rejection through IDO metabolism evaluation, *Kidney Int.* 71 (2007) 60–67. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002023>.
- [233] T. Iwaki, B.G. Bennion, E.K. Stenson, J.C. Lynn, C. Otinga, D. Djukovic, D. Raftery, L. Fei, H.R. Wong, W.C. Liles, S.W. Standage, PPAR $\alpha$  contributes to protection against metabolic and inflammatory derangements associated with acute kidney injury in experimental sepsis, *Physiol. Rep.* 7 (2019) e14078. <https://doi.org/10.14814/phy2.14078>.
- [234] X. Zheng, A. Zhang, M. Binnie, K. McGuire, S.P. Webster, J. Hughes, S.E.M. Howie, D.J. Mole, Kynurenine 3-monooxygenase is a critical regulator of renal ischemia–reperfusion injury, *Exp. Mol. Med.* 51 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0210-x>.
- [235] F. Zhang, Q. Wang, T. Xia, S. Fu, X. Tao, Y. Wen, S. Chan, S. Gao, X. Xiong, W. Chen, Diagnostic value of plasma tryptophan and symmetric dimethylarginine levels for acute kidney injury among tacrolimus-treated kidney transplant patients by targeted metabolomics analysis, *Sci. Rep.* 8 (2018) 14688. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32958-2>.
- [236] J.R. Zgoda-Pols, S. Chowdhury, M. Wirth, M.V. Milburn, D.C. Alexander, K.B. Alton, Metabolomics analysis reveals elevation of 3-indoxyl sulfate in plasma and brain during chemically-induced acute kidney injury in mice: Investigation of nicotinic acid receptor agonists, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 255 (2011) 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.05.015>.
- [237] J. Gostner, K. Becker, S. Geisler, F. Überall, H. Schennach, D. Fuchs, Influence of antibiotic gentamicin on mitogeninduced tryptophan breakdown in vitro, effects similar to standard food preservatives, in: 33rd International Winter Workshop Clinical, Chemical and Biochemical Aspects of Pteridines and Related Topics, *Pteridines.* 25 (2014) 11–31. <https://doi.org/10.1515/pterid-2014-0004>.

- [238] M.H. Hanna, J.L. Segar, L.M. Teesch, D.C. Kasper, F.S. Schaefer, P.D. Brophy, Urinary metabolomic markers of aminoglycoside nephrotoxicity in newborn rats, *Pediatr. Res.* 73 (2013) 585–591. <https://doi.org/10.1038/pr.2013.34>.
- [239] E.M. Lenz, J. Bright, R. Knight, F.R. Westwood, D. Davies, H. Major, I.D. Wilson, Metabonomics with <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry applied to the investigation of metabolic changes caused by gentamicin-induced nephrotoxicity in the rat, *Biomarkers.* 10 (2005) 173–187. <https://doi.org/10.1080/13547500500094034>.
- [240] K. Mohib, S. Wang, Q. Guan, A.L. Mellor, H. Sun, C. Du, A.M. Jevnikar, Indoleamine 2,3-dioxygenase expression promotes renal ischemia-reperfusion injury, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 295 (2008) F226–234. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00567.2007>.
- [241] V. Volarevic, B.S. Markovic, M.G. Jankovic, B. Djokovic, N. Jovicic, C.R. Harrell, C. Fellabaum, V. Djonov, N. Arsenijevic, M.L. Lukic, Galectin 3 protects from cisplatin-induced acute kidney injury by promoting TLR-2-dependent activation of IDO1/Kynurenine pathway in renal DCs, *Theranostics.* 9 (2019) 5976–6001. <https://doi.org/10.7150/thno.33959>.
- [242] I. Lahdou, M. Sadeghi, V. Daniel, M. Schenk, F. Renner, R. Weimer, S. Löb, J. Schmidt, A. Mehrabi, P. Schnitzler, A. Königsrainer, B. Döhler, G. Opelz, P. Terness, Increased pretransplantation plasma kynurenine levels do not protect from but predict acute kidney allograft rejection, *Hum. Immunol.* 71 (2010) 1067–1072. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.08.013>.
- [243] W. Dabrowski, T. Kocki, J. Pilat, J. Parada-Turska, M.L.N.G. Malbrain, Changes in Plasma Kynurenic Acid Concentration in Septic Shock Patients Undergoing Continuous Veno-Venous Haemofiltration, *Inflammation.* 37 (2014) 223–234. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9733-9>.
- [244] F. Aregger, D.E. Uehlinger, G. Fusch, A. Bahonjic, R. Pschowski, M. Walter, J.C. Schefold, Increased urinary excretion of kynurenic acid is associated with non-recovery from acute kidney injury in critically ill patients, *BMC Nephrol.* 19 (2018) 44. <https://doi.org/10.1186/s12882-018-0841-5>.
- [245] C.G. Jensen, M.S. Jensen, S.J. Tingskov, P. Olinga, R. Nørregaard, H.A.M. Mutsaers, Local Inhibition of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Mitigates Renal Fibrosis, *Biomedicines.* 9 (2021) 856. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080856>.
- [246] W. Hou, S. Li, Y. Wu, X. Du, F. Yuan, Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated tryptophan catabolism accelerates crescentic glomerulonephritis, *Clin. Exp. Immunol.* 156 (2009) 363–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03902.x>.
- [247] B. Baban, J.Y. Liu, M.S. Mozaffari, Endoplasmic reticulum stress response and inflammatory cytokines in type 2 diabetic nephropathy: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and programmed death-1, *Exp. Mol. Pathol.* 94 (2013) 343–351. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.11.004>.
- [248] L.H.G. Matheus, G.M. Simão, T.A. Amaral, R.B.O. Brito, C.S. Malta, Y.S.T. Matos, A.C. Santana, G.G.C. Rodrigues, M.C. Albejante, E.E. Bach, M.A. Dalboni, C.P. Camacho, H. Dellê, Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) increases during renal fibrogenesis and its inhibition potentiates TGF- $\beta$  1-induced epithelial to mesenchymal transition, *BMC Nephrol.* 18 (2017) 287. <https://doi.org/10.1186/s12882-017-0702-7>.
- [249] J.C. Schefold, J.-P. Zeden, C. Fotopoulou, S. von Haehling, R. Pschowski, D. Hasper, H.-D. Volk, C. Schuett, P. Reinke, Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms, *Nephrol. Dial. Transplant.* 24 (2009) 1901–1908. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn739>.

- [250] J.C. Schefold, J.-P. Zeden, C. Fotopoulou, S. von Haehling, R. Pschowski, D. Hasper, H.-D. Volk, C. Schuett, P. Reinke, Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms, *Nephrol. Dial. Transplant.* 24 (2009) 1901–1908. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn739>.
- [251] Y.-S. Bao, Y. Ji, S.-L. Zhao, L.-L. Ma, R.-J. Xie, S.-P. Na, Serum levels and activity of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase and their association with disease severity in patients with chronic kidney disease, *Biomarkers.* 18 (2013) 379–385. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2013.790074>.
- [252] A. Mor, B. Kalaska, D. Pawlak, Kynurenine Pathway in Chronic Kidney Disease: What’s Old, What’s New, and What’s Next?, *Int. J. Tryptophan Res.* 13 (2020) 1178646920954882. <https://doi.org/10.1177/1178646920954882>.
- [253] E.P. Rhee, C.B. Clish, A. Ghorbani, M.G. Larson, S. Elmariah, E. McCabe, Q. Yang, S. Cheng, K. Pierce, A. Deik, A.L. Souza, L. Farrell, C. Domos, R.W. Yeh, I. Palacios, K. Rosenfield, R.S. Vasan, J.C. Florez, T.J. Wang, C.S. Fox, R.E. Gerszten, A combined epidemiologic and metabolomic approach improves CKD prediction, *J. Am. Soc. Nephrol.* 24 (2013) 1330–1338. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012101006>.
- [254] O.-N. Goek, C. Prehn, P. Sekula, W. Römisch-Margl, A. Döring, C. Gieger, M. Heier, W. Koenig, R. Wang-Sattler, T. Illig, K. Suhre, J. Adamski, A. Köttgen, C. Meisinger, Metabolites associate with kidney function decline and incident chronic kidney disease in the general population, *Nephrol. Dial. Transplant.* 28 (2013) 2131–2138. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft217>.
- [255] B. Yu, Y. Zheng, J.A. Nettleton, D. Alexander, J. Coresh, E. Boerwinkle, Serum metabolomic profiling and incident CKD among African Americans, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 9 (2014) 1410–1417. <https://doi.org/10.2215/CJN.11971113>.
- [256] S. Debnath, C. Velagapudi, L. Redus, F. Thameem, B. Kasinath, C.E. Hura, C. Lorenzo, H.E. Abboud, J.C. O’Connor, Tryptophan Metabolism in Patients With Chronic Kidney Disease Secondary to Type 2 Diabetes: Relationship to Inflammatory Markers, *Int. J. Tryptophan Res. IJTR.* 10 (2017). <https://doi.org/10.1177/1178646917694600>.
- [257] H. Lee, H.B. Jang, M.-G. Yoo, S.I. Park, H.-J. Lee, Amino Acid Metabolites Associated with Chronic Kidney Disease: An Eight-Year Follow-Up Korean Epidemiology Study, *Biomedicines.* 8 (2020) 222. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8070222>.
- [258] K. Pawlak, T. Domaniewski, M. Mysliwiec, D. Pawlak, The kynurenines are associated with oxidative stress, inflammation and the prevalence of cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease, *Atherosclerosis.* 204 (2009) 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.08.014>.
- [259] J. Zhao, Plasma kynurenine acid/tryptophan ratio: a sensitive and reliable biomarker for the assessment of renal function, *Ren. Fail.* 35 (2013) 648–653. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2013.790301>.
- [260] B. Pan, F. Zhang, J. Sun, D. Chen, W. Huang, H. Zhang, C. Cao, X. Wan, Correlation of Indoleamine-2,3-Dioxygenase and Chronic Kidney Disease: A Pilot Study, *J. Immunol. Res.* 2021 (2021) 8132569. <https://doi.org/10.1155/2021/8132569>.
- [261] M.-H. Wu, C.-N. Lin, D.T.-Y. Chiu, S.-T. Chen, Kynurenine/Tryptophan Ratio Predicts Angiotensin Receptor Blocker Responsiveness in Patients with Diabetic Kidney Disease, *Diagnostics.* 10 (2020) 207. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040207>.
- [262] Y. Zhang, Y. Ruan, P. Zhang, L. Wang, Increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity in type 2 diabetic nephropathy, *J. Diabetes Complications.* 31 (2017) 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacom.2016.08.020>.
- [263] C.A. Falconi, C.V. da C. Junho, F. Fogaça-Ruiz, I.C.S. Vernier, R.S. da Cunha, A.E.M. Stinghen, M.S. Carneiro-Ramos, Uremic Toxins: An Alarming Danger Concerning the



- Cardiovascular System, *Front. Physiol.* 12 (2021) 686249. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.686249>.
- [264] Y.J. Lim, N.A. Sidor, N.C. Tonial, A. Che, B.L. Urquhart, Uremic Toxins in the Progression of Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Targets, *Toxins*. 13 (2021) 142. <https://doi.org/10.3390/toxins13020142>.
- [265] R. Vanholder, R. De Smet, G. Glorieux, A. Argilés, U. Baurmeister, P. Brunet, W. Clark, G. Cohen, P.P. De Deyn, R. Deppisch, B. Descamps-Latscha, T. Henle, A. Jörres, H.D. Lemke, Z.A. Massy, J. Passlick-Deetjen, M. Rodriguez, B. Stegmayr, P. Stenvinkel, C. Tetta, C. Wanner, W. Zidek, For the European Uremic Toxin Work Group (EUTox), Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability, *Kidney Int.* 63 (2003) 1934–1943. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x>.
- [266] R. Vanholder, S. Van Laecke, G. Glorieux, What is new in uremic toxicity?, *Pediatr. Nephrol.* 23 (2008) 1211–1221. <https://doi.org/10.1007/s00467-008-0762-9>.
- [267] H. Koepsell, H. Endou, The SLC22 drug transporter family, *Pflugers Arch.* 447 (2004) 666–676. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1089-9>.
- [268] S.K. Nigam, K.T. Bush, G. Martovetsky, S.-Y. Ahn, H.C. Liu, E. Richard, V. Bhatnagar, W. Wu, The Organic Anion Transporter (OAT) Family: A Systems Biology Perspective, *Physiol. Rev.* 95 (2015) 83–123. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2013>.
- [269] Y. Uwai, H. Honjo, K. Iwamoto, Interaction and transport of kynurenic acid via human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3, *Pharmacol. Res.* 65 (2012) 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.11.003>.
- [270] J.A.J.G. van den Brand, H.A.M. Mutsaers, A.D. van Zuilen, P.J. Blankestijn, P.H. van den Broek, F.G.M. Russel, R. Masereeuw, J.F.M. Wetzels, Uremic Solutes in Chronic Kidney Disease and Their Role in Progression, *PLoS ONE*. 11 (2016) e0168117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168117>.
- [271] Y. Chen, L.R. Zelnick, K. Wang, A.N. Hoofnagle, J.O. Becker, C.-Y. Hsu, H.I. Feldman, R.C. Mehta, J.P. Lash, S.S. Waikar, T. Shafi, S.L. Seliger, M.G. Shlipak, M. Rahman, B.R. Kestenbaum, CRIC Study Investigators, Kidney Clearance of Secretory Solutes Is Associated with Progression of CKD: The CRIC Study, *J. Am. Soc. Nephrol.* 31 (2020) 817–827. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019080811>.
- [272] R.L. Mehta, Timed and targeted therapy for acute kidney injury: a glimpse of the future, *Kidney Int.* 77 (2010) 947–949. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.79>.
- [273] M.C. Saade, A.J. Clark, S.M. Parikh, States of quinolinic acid excess in urine: A systematic review of human studies, *Front. Nutr.* 9 (2022) 1070435. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1070435>.
- [274] J.S. Bajaj, G. Garcia-Tsao, K.R. Reddy, J.G. O’Leary, H.E. Vargas, J.C. Lai, P.S. Kamath, P. Tandon, R.M. Subramanian, P. Thuluvath, A. Fagan, T. Sehrawat, R. de la Rosa Rodriguez, L.R. Thacker, F. Wong, Admission Urinary and Serum Metabolites Predict Renal Outcomes in Hospitalized Patients With Cirrhosis, *Hepatology*. 74 (2021) 2699–2713. <https://doi.org/10.1002/hep.31907>.
- [275] K. Suhre, J.E. Schwartz, V.K. Sharma, Q. Chen, J.R. Lee, T. Muthukumar, D.M. Dadhania, R. Ding, D.N. Ikle, N.D. Bridges, N.M. Williams, G. Kastenmüller, E.D. Karoly, R.P. Mohney, M. Abecassis, J. Friedewald, S.J. Knechtle, Y.T. Becker, B. Samstein, A. Shaked, S.S. Gross, M. Suthanthiran, Urine Metabolite Profiles Predictive of Human Kidney Allograft Status, *J. Am. Soc. Nephrol.* 27 (2016) 626–636. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015010107>.
- [276] K. Suhre, D.M. Dadhania, J.R. Lee, T. Muthukumar, Q. Chen, S.S. Gross, M. Suthanthiran, Kidney Allograft Function Is a Confounder of Urine Metabolite Profiles in Kidney Allograft Recipients, *Metabolites*. 11 (2021) 533. <https://doi.org/10.3390/metabo11080533>.

- [277] P.K. Bhatraju, X.-Y. Chai, N.A. Sathe, J. Ruzinski, E.D. Siew, J. Himmelfarb, A.N. Hoofnagle, M.M. Wurfel, B.R. Kestenbaum, Assessment of kidney proximal tubular secretion in critical illness, *JCI Insight*. 6 (2021) e145514, 145514. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.145514>.
- [278] R. Zulpaite, P. Miknevičius, B. Leber, K. Strupas, P. Stiegler, P. Schemmer, Tryptophan Metabolism via Kynurenine Pathway: Role in Solid Organ Transplantation, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1921. <https://doi.org/10.3390/ijms22041921>.
- [279] D. Vavrincova-Yaghi, M.A. Seelen, I.P. Kema, L.E. Deelman, M.C. van der Heuvel, H. Breukelman, B.J. Van den Eynde, R.H. Henning, H. van Goor, M. Sandovici, Early Posttransplant Tryptophan Metabolism Predicts Long-term Outcome of Human Kidney Transplantation, *Transplantation*. 99 (2015) e97-104. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000603>.
- [280] J. Kaden, D. Abendroth, A. Völp, M. Marzinzig, C. Wesslau, Causes and prognostic value of pre-transplant elevated kynurenine level in kidney allograft recipients, *Ann. Transplant.* 19 (2014) 51–59. <https://doi.org/10.12659/AOT.889764>.
- [281] L.V. de Vries, I. Minović, C.F.M. Franssen, M. van Faassen, J.-S.F. Sanders, S.P. Berger, G. Navis, I.P. Kema, S.J.L. Bakker, The tryptophan/kynurenine pathway, systemic inflammation, and long-term outcome after kidney transplantation, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 313 (2017) F475–F486. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00690.2016>.
- [282] I. Sadok, A. Gamian, M.M. Staniszevska, Chromatographic analysis of tryptophan metabolites, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 3020–3045. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700184>.
- [283] S. Kalantari, M. Nafar, S. Samavat, M. Parvin, 1 H NMR-based metabolomics study for identifying urinary biomarkers and perturbed metabolic pathways associated with severity of IgA nephropathy: a pilot study, *Magn. Reson. Chem.* 55 (2017) 693–699. <https://doi.org/10.1002/mrc.4573>.
- [284] S. Bravo-Veyrat, G. Hopfgartner, Mass spectrometry based high-throughput bioanalysis of low molecular weight compounds: are we ready to support personalized medicine?, *Anal. Bioanal. Chem.* 414 (2022) 181–192. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03583-2>.
- [285] C.G. Adu-Gyamfi, T. Snyman, L. Makhathini, K. Otworld, F. Darboe, A. Penn-Nicholson, M. Fisher, D. Savulescu, C. Hoffmann, R. Chaisson, N. Martinson, T.J. Scriba, J.A. George, M.S. Suchard, Diagnostic accuracy of plasma kynurenine/tryptophan ratio, measured by enzyme-linked immunosorbent assay, for pulmonary tuberculosis, *Int. J. Infect. Dis.* 99 (2020) 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.028>.
- [286] R.-J. Raterink, P.W. Lindenburg, R.J. Vreeken, R. Ramautar, T. Hankemeier, Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass spectrometry-based metabolomics, *Trends Anal. Chem.* 61 (2014) 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.003>.
- [287] B.A. Rappold, Review of the Use of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Clinical Laboratories: Part I-Development, *Ann. Lab. Med.* 42 (2022) 121–140. <https://doi.org/10.3343/alm.2022.42.2.121>.
- [288] W. Zhu, A.P. Stevens, K. Dettmer, E. Gottfried, S. Hoves, M. Kreutz, E. Holler, A.B. Canelas, I. Kema, P.J. Oefner, Quantitative profiling of tryptophan metabolites in serum, urine, and cell culture supernatants by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 3249–3261. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5436-y>.
- [289] K. Arnhard, F. Pitterl, B. Sperner-Unterweger, D. Fuchs, T. Koal, H. Oberacher, A validated liquid chromatography-high resolution-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitation of tryptophan, kynurenine, kynurenic acid, and quinolinic

- acid in human plasma, *Electrophoresis*. 39 (2018) 1171–1180. <https://doi.org/10.1002/elps.201700400>.
- [290] X. Liao, J. Zhu, M. Rubab, Y. Feng, R. Poon, An analytical method for the measurement of acid metabolites of tryptophan-NAD pathway and related acids in urine, *J. Chromatogr. B*. 878 (2010) 1003–1006. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.02.017>.
- [291] Y. Huang, A. Louie, Q. Yang, N. Massenkoff, C. Xu, P.W. Hunt, W. Gee, A simple LC-MS/MS method for determination of kynurenine and tryptophan concentrations in human plasma from HIV-infected patients, *Bioanalysis*. 5 (2013) 1397–1407. <https://doi.org/10.4155/bio.13.74>.
- [292] M. Möller, J.L. Du Preez, B.H. Harvey, Development and validation of a single analytical method for the determination of tryptophan, and its kynurenine metabolites in rat plasma, *J. Chromatogr. B*. 898 (2012) 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.04.030>.
- [293] M. Moriarty, A. Lee, B. O’Connell, A. Kelleher, H. Keeley, A. Furey, Development of an LC-MS/MS method for the analysis of serotonin and related compounds in urine and the identification of a potential biomarker for attention deficit hyperactivity/hyperkinetic disorder, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 2481–2493. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5322-7>.
- [294] E. Stokvis, H. Rosing, J.H. Beijnen, Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 401–407. <https://doi.org/10.1002/rcm.1790>.
- [295] S.N. Thomas, D. French, P.J. Jannetto, B.A. Rappold, W.A. Clarke, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical diagnostics, *Nat. Rev. Methods Primer.* 2 (2022) 96. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00175-x>.
- [296] M.J. Schwarz, G.J. Guillemin, S.J. Teipel, K. Buerger, H. Hampel, Increased 3-Hydroxykynurenine serum concentrations differentiate Alzheimer’s disease patients from controls, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 263 (2013) 345–352. <https://doi.org/10.1007/s00406-012-0384-x>.
- [297] S. Karakawa, R. Nishimoto, M. Harada, N. Arashida, A. Nakayama, Simultaneous Analysis of Tryptophan and Its Metabolites in Human Plasma Using Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Chromatography*. 40 (2019) 127–133. <https://doi.org/10.15583/jpchrom.2019.010>.
- [298] A. Trepci, S. Imbeault, V.L. Wyckelsma, H. Westerblad, S. Hermansson, D.C. Andersson, F. Piehl, T. Venckunas, M. Brazaitis, S. Kamandulis, L. Brundin, S. Erhardt, L. Schwieler, Quantification of Plasma Kynurenine Metabolites Following One Bout of Sprint Interval Exercise, *Int. J. Tryptophan Res.* 13 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1177/1178646920978241>.
- [299] R. Fuertig, A. Ceci, S.M. Camus, E. Bezard, A.H. Luippold, B. Hengerer, LC-MS/MS-based quantification of kynurenine metabolites, tryptophan, monoamines and neopterin in plasma, cerebrospinal fluid and brain, *Bioanalysis*. 8 (2016) 1903–1917. <https://doi.org/10.4155/bio-2016-0111>.
- [300] S. Chen, C. Burton, A. Kaczmarek, H. Shi, Y. Ma, Simultaneous determination of urinary quinolinate, gentisate, 4-hydroxybenzoate, and  $\alpha$ -ketoglutarate by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods*. 7 (2015) 6572–6578. <https://doi.org/10.1039/C5AY01643F>.
- [301] J.S. Oh, H.S. Seo, K.H. Kim, H. Pyo, B.C. Chung, J. Lee, Urinary profiling of tryptophan and its related metabolites in patients with metabolic syndrome by liquid chromatography-electrospray ionization/mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 5501–5512. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0486-4>.

- [302] B.A. Rappold, Review of the Use of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Clinical Laboratories: Part II-Operations, *Ann. Lab. Med.* 42 (2022) 531–557. <https://doi.org/10.3343/alm.2022.42.5.531>.
- [303] Guideline on bioanalytical method validation, Eur. Med. Agency. (2012). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf) (accessed January 28, 2022).
- [304] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, Food Drug Adm. (2018). <https://www.fda.gov/media/70858/download> (accessed January 28, 2022).
- [305] A. Abedini, Y.O. Zhu, S. Chatterjee, G. Halasz, K. Devalaraja-Narashimha, R. Shrestha, M. S Balzer, J. Park, T. Zhou, Z. Ma, K.M. Sullivan, H. Hu, X. Sheng, H. Liu, Y. Wei, C.M. Boustany-Kari, U. Patel, S. Almaani, M. Palmer, R. Townsend, S. Blady, J. Hogan, L. Morton, K. Susztak, TRIDENT Study Investigators, Urinary Single-Cell Profiling Captures the Cellular Diversity of the Kidney, *J. Am. Soc. Nephrol.* 32 (2021) 614–627. <https://doi.org/10.1681/ASN.2020050757>.
- [306] L.C. Racusen, B.A. Fivush, H. Andersson, W.A. Gahl, Culture of renal tubular cells from the urine of patients with nephropathic cystinosis, *J. Am. Soc. Nephrol.* 1 (1991) 1028–1033. <https://doi.org/10.1681/ASN.V181028>.
- [307] M. Suthanthiran, J.E. Schwartz, R. Ding, M. Abecassis, D. Dadhania, B. Samstein, S.J. Knechtle, J. Friedewald, Y.T. Becker, V.K. Sharma, N.M. Williams, C.S. Chang, C. Hoang, T. Muthukumar, P. August, K.S. Keslar, R.L. Fairchild, D.E. Hricik, P.S. Heeger, L. Han, J. Liu, M. Riggs, D.N. Ikle, N.D. Bridges, A. Shaked, Clinical Trials in Organ Transplantation 04 (CTOT-04) Study Investigators, Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts, *N. Engl. J. Med.* 369 (2013) 20–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215555>.
- [308] P.E. Cippà, B. Sun, J. Liu, L. Chen, M. Naesens, A.P. McMahon, Transcriptional trajectories of human kidney injury progression, *JCI Insight.* 3 (2018) e123151, 123151. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123151>.
- [309] K.I. Woroniecka, A.S.D. Park, D. Mohtat, D.B. Thomas, J.M. Pullman, K. Susztak, Transcriptome analysis of human diabetic kidney disease, *Diabetes.* 60 (2011) 2354–2369. <https://doi.org/10.2337/db10-1181>.
- [310] M.S. Parmar, K. Bashir, Crescentic Glomerulonephritis, in: *StatPearls*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430727/> (accessed March 9, 2023).
- [311] Y. Yang, K. Liu, Y. Chen, Y. Gong, Y. Liang, Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Regulates Th17/Treg Immunity in Experimental IgA Nephropathy, *Folia Biol. (Praha).* 65 (2019) 101–108.
- [312] K. Liu, Y. Yang, Y. Chen, S. Li, Y. Gong, Y. Liang, The therapeutic effect of dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on an IgA nephropathy mouse model, *Int. Urol. Nephrol.* 52 (2020) 399–407. <https://doi.org/10.1007/s11255-019-02365-1>.
- [313] Yang et al\_2007\_Nutrient-sensitive mitochondrial NAD<sup>+</sup> levels dictate cell survival.pdf, (n.d.).
- [314] M. Tewari, L.T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D.R. Beidler, G.G. Poirier, G.S. Salvesen, V.M. Dixit, Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase, *Cell.* 81 (1995) 801–809. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90541-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90541-3).
- [315] M.Y. Kim, S. Mauro, N. Gévry, J.T. Lis, W.L. Kraus, NAD<sup>+</sup>-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1, *Cell.* 119 (2004) 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.002>.

- [316] X. Luo, W.L. Kraus, On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1, *Genes Dev.* 26 (2012) 417–432. <https://doi.org/10.1101/gad.183509.111>.
- [317] S. Jamil, I. Lam, M. Majd, S.-H. Tsai, V. Duronio, Etoposide induces cell death via mitochondrial-dependent actions of p53, *Cancer Cell Int.* 15 (2015) 79. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0231-z>.
- [318] H. Wang, T.H. Peiris, A. Mowery, J. Le Lay, Y. Gao, L.E. Greenbaum, CCAAT/enhancer binding protein-beta is a transcriptional regulator of peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha in the regenerating liver, *Mol. Endocrinol.* 22 (2008) 1596–1605. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0388>.
- [319] M.R. Lynch, M.T. Tran, S.M. Parikh, PGC1 $\alpha$  in the kidney, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 314 (2018) F1–F8. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00263.2017>.
- [320] M. Fontecha-Barriuso, D. Martín-Sánchez, J.M. Martínez-Moreno, S. Carrasco, O. Ruiz-Andrés, M. Monsalve, C. Sanchez-Ramos, M.J. Gómez, M. Ruiz-Ortega, M.D. Sánchez-Niño, P. Cannata-Ortiz, R. Cabello, C. Gonzalez-Enguita, A. Ortiz, A.B. Sanz, PGC-1 $\alpha$  deficiency causes spontaneous kidney inflammation and increases the severity of nephrotoxic AKI, *J. Pathol.* 249 (2019) 65–78. <https://doi.org/10.1002/path.5282>.
- [321] A.P. Mehr, S.M. Parikh, PGC1 $\alpha$ , NAD<sup>+</sup> and Renal Stress Resistance, *Nephron.* 137 (2017) 253–255. <https://doi.org/10.1159/000471895>.
- [322] J.L. Ruas, J.P. White, R.R. Rao, S. Kleiner, K.T. Brannan, B.C. Harrison, N.P. Greene, J. Wu, J.L. Estall, B.A. Irving, I.R. Lanza, K.A. Rasbach, M. Okutsu, K.S. Nair, Z. Yan, L.A. Leinwand, B.M. Spiegelman, A PGC-1 $\alpha$  Isoform Induced by Resistance Training Regulates Skeletal Muscle Hypertrophy, *Cell.* 151 (2012) 1319–1331. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.050>.
- [323] S.-Y. Li, K. Susztak, The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) in Kidney Disease, *Semin. Nephrol.* 38 (2018) 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2018.01.003>.
- [324] H. Pan, Z. Hu, Z. Shao, Y. Ning, Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) overexpression alleviates endoplasmic reticulum stress after acute kidney injury, *Ren. Fail.* 44 (2022) 358–367. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2022.2035764>.
- [325] W. B'chir, A.-C. Maurin, V. Carraro, J. Averous, C. Jousse, Y. Muranishi, L. Parry, G. Stepien, P. Fafournoux, A. Bruhat, The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 7683–7699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt563>.
- [326] G. Ristagno, M. Fries, L. Brunelli, F. Fumagalli, R. Bagnati, I. Russo, L. Staszewsky, S. Masson, G. Li Volti, A. Zappalà, M. Derwall, A. Brücken, R. Pastorelli, R. Latini, Early kynurenine pathway activation following cardiac arrest in rats, pigs, and humans, *Resuscitation.* 84 (2013) 1604–1610. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2013.06.002>.
- [327] B. Liu, D. Yu, J. Sun, X. Wu, Z. Xin, B. Deng, L. Fan, J. Fu, L. Ge, W. Ren, Characterizing the influence of gut microbiota on host tryptophan metabolism with germ-free pigs, *Anim. Nutr. Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui.* 11 (2022) 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.07.005>.
- [328] F. Fumagalli, D. Olivari, A. Boccardo, D. De Giorgio, R. Affatato, S. Ceriani, S. Bariselli, G. Sala, A. Cucino, D. Zani, D. Novelli, G. Babini, A. Magliocca, I. Russo, L. Staszewsky, M. Salio, J. Lucchetti, A.M. Maisano, F. Fiordaliso, R. Furlan, M. Gobbi, M.V. Luini, D. Pravettoni, E. Scanziani, A. Belloli, R. Latini, G. Ristagno, Ventilation With Argon Improves Survival With Good Neurological Recovery After Prolonged

- Untreated Cardiac Arrest in Pigs, *J. Am. Heart Assoc.* 9 (2020) e016494. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.016494>.
- [329] A.I. Mede, G.L. Milne, D. Wei, D.K. Smith, L.E. Smith, NAD<sup>+</sup> Biosynthesis Impairment and Acute Kidney Injury after Major Vascular Surgery, *Antioxid. Basel.* 12 (2023) 821. <https://doi.org/10.3390/antiox12040821>.
- [330] L.J.S. Lerink, M.J.C. de Kok, J.F. Mulvey, S.E. Le Dévédec, A.A. Markovski, R.C.I. Wüst, I.P.J. Alwayn, R.J. Ploeg, A.F.M. Schaapherder, J.A. Bakker, J.H.N. Lindeman, Preclinical models versus clinical renal ischemia reperfusion injury: A systematic review based on metabolic signatures, *Am. J. Transplant.* 22 (2022) 344–370. <https://doi.org/10.1111/ajt.16868>.
- [331] D. Lazzareschi, R.L. Mehta, L.M. Dember, J. Bernholz, A. Turan, A. Sharma, S. Kheterpal, C.R. Parikh, O. Ali, I.H. Schulman, A. Ryan, J. Feng, N. Simon, R. Pirracchio, P. Rossignol, M. Legrand, Overcoming barriers in the design and implementation of clinical trials for acute kidney injury: a report from the 2020 Kidney Disease Clinical Trialists meeting, *Nephrol. Dial. Transplant.* 38 (2023) 834–844. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfac003>.
- [332] H. Tang, M. Mayersohn, Porcine Prediction of Pharmacokinetic Parameters in People: A Pig in a Poke?, *Drug Metab. Dispos.* 46 (2018) 1712–1724. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.083311>.
- [333] A.R. Chade, M.L. Williams, J. Engel, E. Guise, T.W. Harvey, A translational model of chronic kidney disease in swine, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 315 (2018) F364–F373. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00063.2018>.
- [334] G.J. Murphy, H. Lin, R.J. Coward, T. Toth, R. Holmes, D. Hall, G.D. Angelini, An initial evaluation of post-cardiopulmonary bypass acute kidney injury in swine, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 36 (2009) 849–855. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2009.05.042>.
- [335] P. Nn, T. T, J. C, L. H, R. P, G. Sj, W. G, S. Sc, S. P, A. Gd, M. Gj, Prevention of post-cardiopulmonary bypass acute kidney injury by endothelin A receptor blockade, *Crit. Care Med.* 39 (2011). <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318206d563>.
- [336] M.T. Ghorbel, N.N. Patel, M. Sheikh, G.D. Angelini, M. Caputo, G.J. Murphy, Changes in renal medulla gene expression in a pre-clinical model of post cardiopulmonary bypass acute kidney injury, *BMC Genomics.* 15 (2014) 916. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-916>.
- [337] J. He, J. Ye, Q. Li, Y. Feng, X. Bai, X. Chen, C. Wu, Z. Yu, Y. Zhao, X. Hu, N. Li, Construction of a transgenic pig model overexpressing polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene, *Transgenic Res.* 22 (2013) 861–867. <https://doi.org/10.1007/s11248-012-9686-z>.
- [338] Y.-J. Lee, K.-Y. Li, P.-J. Wang, H.-W. Huang, M.-J. Chen, Alleviating chronic kidney disease progression through modulating the critical genus of gut microbiota in a cisplatin-induced Lanyu pig model, *J. Food Drug Anal.* 28 (2020) 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.10.001>.
- [339] S.-Y. Wang, C.-Y. Zhang, G.-Y. Cai, X.-M. Chen, Method used to establish a large animal model of drug-induced acute kidney injury, *Exp. Biol. Med.* Maywood. 246 (2021) 986–995. <https://doi.org/10.1177/1535370220981756>.
- [340] D.M. Hentschel, J.V. Bonventre, Novel non-rodent models of kidney disease, *Curr. Mol. Med.* 5 (2005) 537–546. <https://doi.org/10.2174/1566524054553469>.
- [341] P. Cruces, P. Lillo, C. Salas, T. Salomon, F. Lillo, C. González, A. Pacheco, D.E. Hurtado, Renal Decapsulation Prevents Intrinsic Renal Compartment Syndrome in Ischemia-Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury: A Physiologic Approach, *Crit. Care Med.* 46 (2018) 216–222. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002830>.

- [342] H. Cui, S. Shu, Y. Li, X. Yan, X. Chen, Z. Chen, Y. Hu, Y. Chang, Z. Hu, X. Wang, J. Song, Plasma Metabolites–Based Prediction in Cardiac Surgery–Associated Acute Kidney Injury, *J. Am. Heart Assoc.* 10 (2021) e021825. <https://doi.org/10.1161/JAHA.121.021825>.
- [343] A. L. Dalmose, J. J. Hvistendahl, L. Surgically Induced Urologic Models in Swine, *J. Invest. Surg.* 13 (2000) 133–145. <https://doi.org/10.1080/08941930050075829>.
- [344] X. Lian, J. Zhao, X. Wu, Y. Zhang, Q. Li, S. Lin, X.-Y. Bai, X. Chen, The changes in glucose metabolism and cell proliferation in the kidneys of polycystic kidney disease mini-pig models, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 488 (2017) 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.060>.
- [345] N. Le Floc’h, F. Gondret, J.J. Matte, H. Quesnel, Towards amino acid recommendations for specific physiological and patho-physiological states in pigs, *Proc. Nutr. Soc.* 71 (2012) 425–432. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000560>.
- [346] E. Wirthgen, W. Otten, M. Tuchscherer, A. Tuchscherer, G. Domanska, J. Brenmoehl, J. Günther, D. Ohde, W. Weitschies, A. Seidlitz, E. Scheuch, E. Kanitz, Effects of 1-Methyltryptophan on Immune Responses and the Kynurenine Pathway after Lipopolysaccharide Challenge in Pigs, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 3009. <https://doi.org/10.3390/ijms19103009>.
- [347] E. Wirthgen, M. Tuchscherer, W. Otten, G. Domanska, K. Wollenhaupt, A. Tuchscherer, E. Kanitz, Activation of indoleamine 2,3-dioxygenase by LPS in a porcine model, *Innate Immun.* 20 (2014) 30–39. <https://doi.org/10.1177/1753425913481252>.
- [348] C.C. Jørgensen, Changes in tryptophan and kynurenine concentrations in pig plasma after in vivo immune activation and controlled tissue trauma, *Nor. Univ. Life Sci.* (2020). <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2719265> (accessed July 22, 2023).
- [349] M. Kertys, M. Grendar, P. Kosutova, D. Mokra, J. Mokry, Plasma based targeted metabolomic analysis reveals alterations of phosphatidylcholines and oxidative stress markers in guinea pig model of allergic asthma, *Biochim. Biophys. Acta.* 1866 (2020) 165572. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165572>.
- [350] J. Gao, Y. Cui, W. Bao, Y. Hao, X. Piao, X. Gu, Ubiquitylome study reveals the regulatory effect of  $\alpha$ -lipoic acid on ubiquitination of key proteins in tryptophan metabolism pathway of pig liver, *Int. J. Biol. Macromol.* 236 (2023) 123795. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123795>.
- [351] K. Chaudhary, R. Shinde, H. Liu, J.P. Gnana-Prakasam, R. Veeranan-Karmegam, L. Huang, B. Ravishankar, J. Bradley, N. Kvirkevelia, M. McMenamin, W. Xiao, D. Kleven, A.L. Mellor, M.P. Madaio, T.L. McGaha, Amino acid metabolism inhibits antibody-driven kidney injury by inducing autophagy, *J. Immunol.* 194 (2015) 5713–5724. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500277>.
- [352] K.-M. Chavele, D. Shukla, T. Ketepe-Arachi, J.A. Seidel, D. Fuchs, C.D. Pusey, A.D. Salama, Regulation of myeloperoxidase-specific T cell responses during disease remission in antineutrophil cytoplasmic antibody–associated vasculitis: The role of Treg cells and tryptophan degradation, *Arthritis Rheum.* 62 (2010) 1539–1548. <https://doi.org/10.1002/art.27403>.
- [353] C.C. Clement, A. D’Alessandro, S. Thangaswamy, S. Chalmers, R. Furtado, S. Spada, G. Mondanelli, F. Ianni, S. Gehrke, M. Gargaro, G. Manni, L.C.L. Cara, P. Runge, W.L. Tsai, S. Karaman, J. Arasa, R. Fernandez-Rodriguez, A. Beck, A. Macchiarulo, M. Gadina, C. Halin, F. Fallarino, M. Skobe, M. Veldhoen, S. Moretti, S. Formenti, S. Demaria, R.K. Soni, R. Galarini, R. Sardella, G. Lauvau, C. Putterman, K. Alitalo, U. Grohmann, L. Santambrogio, 3-hydroxy-L-kynurenamine is an immunomodulatory

biogenic amine, *Nat. Commun.* 12 (2021) 4447. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24785-3>.



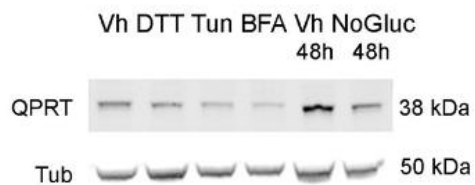
# Annexes

## Annexe 1

### Erratum :

**Figure supplémentaire 10 de l'Article 1** : sur l'immunoblot de la **Figure D**, la bande de DDIT3 était absente :

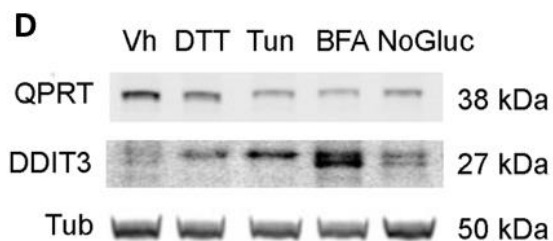
### D



### SUPPLEMENTARY FIGURE 10

**D.** Immunoblot representing QPRT, DDIT3 and tubulin protein expression in primary cultured proximal tubular cells 24 hours after incubation with DMSO (vehicle), 1  $\mu$ M dithiotreitol (DTT) 2.5  $\mu$ g/ml Tun, with 5  $\mu$ g/mL BFA, or 48 hours in a glucose-deprived culture medium (No Gluc.). The immunoblot shown is representative of 3 independent experiments.

La bande de DDIT3 est ajouté dans la **Figure D** :



**Titre :** Modulation de la biosynthèse *de novo* du NAD au cours de l'insuffisance rénale aiguë

**Résumé :** La voie des kynurénines est la principale voie de catabolisme du tryptophane (TRP) dans l'organisme et elle permet la production de kynurénines et la synthèse *de novo* du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Le NAD est un cofacteur essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire rénale. Au cours de l'insuffisance rénale aiguë (IRA), une diminution de la synthèse du NAD locale a été observée en lien avec la répression de la quinolinate phosphoribosyl transférase (QPRT), une enzyme clé dans la biosynthèse *de novo* du NAD. Les mécanismes moléculaires régissant la réduction de l'expression de la QPRT dans l'IRA ischémique, ainsi que le rôle de l'altération de la biosynthèse du NAD dans l'évolution vers la maladie rénale chronique (MRC) sont peu connus. Il paraît donc essentiel de mieux comprendre les mécanismes de régulation du catabolisme du TRP afin de développer des biomarqueurs précoces pour ces pathologies et de rechercher des cibles thérapeutiques. Les cellules épithéliales tubulaires altérées sécrètent différents métabolites qui peuvent être détectés dans les urines : l'analyse des métabolites urinaires est particulièrement intéressante pour identifier des marqueurs de l'activité de la voie des kynurénines et de la synthèse *de novo* du NAD dans le rein et constitue une approche prometteuse pour identifier des marqueurs solubles de lésions rénales aiguës. Dans ce contexte, nous avons exploré les mécanismes de répression de la QPRT et la diminution de la synthèse du NAD dans le rein. Nous avons ensuite évalué la valeur diagnostique et pronostique des métabolites urinaires du TRP dans différents modèles de l'IRA. Ces travaux de thèse ont apporté des preuves que le facteur de stress cellulaire C/EBP homologous protein (CHOP) pouvait altérer la biosynthèse *de novo* du NAD en réprimant la transcription de QPRT. Nous avons également développé et validé une méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) visant à quantifier simultanément 9 des 14 métabolites de la voie des kynurénines dans le plasma et l'urine, et avons montré qu'un ratio urinaire quinolinate (QA)/TRP élevé était un biomarqueur prédictif précoce de la sévérité de l'IRA après une chirurgie cardiaque, et de la progression vers la MRC en transplantation rénale. Nous avons également montré que le ratio urinaire kynurénine (KYN)/TRP reflétait l'activité des lésions inflammatoires rénales. En conclusion, ces travaux ont permis de montrer que l'altération de la biosynthèse *de novo* du NAD était un événement précoce dans l'IRA, lié à la réponse au stress du réticulum endoplasmique, et qu'une réduction persistante de l'expression de QPRT était associée à la progression de l'IRA vers la MRC. Enfin les ratios urinaires KYN/TRP et QA/TRP pourraient être proposés comme des biomarqueurs potentiels de la sévérité de différentes formes d'IRA.

**Mots clés :** Insuffisance rénale aiguë, stress du réticulum endoplasmique, nicotinamide adénine dinucléotide, voie des kynurénines, tryptophane, quinolinate, quinolinate phosphoribosyl transférase, spectrométrie de masse

**Title:** Modulation of *de novo* NAD biosynthesis in acute kidney injury

**Abstract:** The kynurenine pathway is the primary pathway for tryptophan (TRP) catabolism and allows the production of kynurenines and *de novo* synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). NAD is an essential cofactor in the maintenance of renal cellular homeostasis. During acute kidney injury (AKI), a decrease in local NAD synthesis has been observed in connection with the repression of quinolinate phosphoribosyl transferase (QPRT), a key enzyme in *de novo* NAD biosynthesis. The molecular mechanisms governing the reduction of QPRT expression in ischemic AKI, as well as the role of impaired NAD biosynthesis in the progression to chronic kidney disease (CKD) are poorly understood. It is therefore essential to better understand the regulatory mechanisms of TRP catabolism in order to develop early biomarkers for these pathologies and to search for therapeutic targets. The altered tubular epithelial cells secrete different metabolites which can be detected in the urine: the analysis of urinary metabolites is particularly interesting to identify markers of the activity of the kynurenine pathway and of the *de novo* NAD synthesis in the kidney and constitutes a promising approach to identify predictive markers of acute kidney injuries. In this context, we sought to understand the mechanisms of QPRT repression and the reduction in NAD synthesis in the kidney. We then studied the diagnostic and prognostic value of urinary TRP metabolites in different AKI models. This thesis work provided evidence that the cellular stress factor C/EBP homologous protein (CHOP) could alter *de novo* NAD biosynthesis by repressing QPRT transcription. We also developed and validated a reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the simultaneous quantification of 9 of the 14 metabolites of the kynurenine pathway in plasma and urine, and showed that a high urinary quinolinate (QA)/TRP ratio was an early biomarker of AKI severity after cardiac surgery and predicted progression to CKD in kidney transplantation. We also showed that the urinary kynurenine (KYN)/TRP ratio reflected the activity of renal inflammatory lesions. In conclusion, this work showed that the alteration of *de novo* NAD biosynthesis was an early event in AKI, linked to endoplasmic reticulum stress response, and that a persistent reduction in the expression of QPRT was associated with progression from AKI to CKD. Finally, the urinary KYN/TRP and QA/TRP ratios could be proposed as potential biomarkers for the severity of different forms of AKI.

**Keywords:** Acute kidney injury, endoplasmic reticulum stress, nicotinamide adenine dinucleotide, kynurenine pathway, tryptophan, quinolinate, quinolinate phosphoribosyl transferase, mass spectrometry