

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2010

N° 110

THESE
pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Spécialité Anesthésie Réanimation

par

Jean Baptiste Lascarrou

Né le 16 janvier 1981 à Bondy

Présentée et soutenue publiquement le 22 octobre 2010

Comparaison de deux méthodes de dosage de la capacité
anti-oxydante totale du sérum au cours de la chirurgie thoracique

Président : Monsieur le Professeur Blanloeil

Directeur de thèse : Monsieur le Dr Rozec

Sommaire

I.	INTRODUCTION	4
II.	PATIENTS ET METHODES	7
A.	Patients	7
B.	Anesthésie et technique opératoire.....	8
1.	Chirurgie cardiaque.....	8
2.	Chirurgie pulmonaire	9
C.	Echantillons biologiques.....	10
1.	Chirurgie cardiaque avec CEC.....	10
2.	Chirurgie pulmonaire	11
D.	Paramètres mesurés	11
1.	Méthode Randox	11
2.	Méthode Patrol.....	12
E.	Analyse statistique	14
III.	RESULTATS	15
IV.	DISCUSSION	20
A.	Chirurgie thoracique et stress oxydant.....	20
B.	Méthode Randox® et méthode Patrol®.....	23
V.	CONCLUSION.....	28
VI.	ANNEXES	29
VII.	BIBLIOGRAPHIE.....	36

ABREVIATIONS

ACFA	Arythmie complète par fibrillation auriculaire
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
CAT	Capacité anti-oxydante totale
CEC	Circulation extra-corporelle
DO	Densité Optique
DS	Déviatiion standard
DCFH/DCF	Dichlorofluoréscéine oxydée / réduite
ERO	Espèce radicalaires oxygénées
FeVG	Fraction d'éjection du ventricule gauche
HNE	4-hydroxynonénal
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IMC	Index de masse corporelle
LDL	Lipoprotéines de faible densité
MDA	Malonedialdéhyde
MPO	Myélopéroxiidase
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PAC	Pontage aorto-coronaire
RB	Rose Bengale
RPE	Résonnance paramagnétique électronique
RVAo	Remplacement valvulaire aortique
SRIS	Syndrome de réponse inflammatoire systémique
TBA	Acide thiobarbiturique

I. INTRODUCTION

La chirurgie cardiaque réalisée sous CEC est devenue une procédure courante. Néanmoins les complications restent fréquentes avec une morbidité et une mortalité non négligeables. Ces complications à type de dysfonctions cardiaques, rénales, hépatiques ou pulmonaires postopératoires sont liées à une réponse inflammatoire importante pouvant conduire à un syndrome de réponse inflammatoire systémique à part entière [1]. Plusieurs causes expliquent cette inflammation : contact entre le sang et le circuit de CEC, traumatisme chirurgical, lésions d'ischémie - reperfusion avec production d'ERO [2], activation des polynucléaires neutrophiles sur le circuit de CEC [3, 4], variations rapides de température corporelle ; cette inflammation est ensuite médiée par plusieurs voies : production de cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL1, IL6), activation du complément... Les phénomènes d'ischémie - reperfusion liés à la restauration du débit cardiaque avec un sang enrichi en oxygène après le déclampage aortique représentent l'élément principal expliquant la production des ERO. Ainsi, alors que la chirurgie cardiaque réalisée sous CEC correspond à une situation caricaturale de production d'espèces radicalaires, la cinétique de production des ERO a jusqu'ici été peu étudiée.

Ces ERO sont formées lorsque les deux électrons célibataires que comporte l'oxygène, « oxydant » les composés qu'ils rencontrent. Ces composés comportent alors un électron célibataire qui les rend instables et entraînent eux-mêmes des réactions d'oxydation en cascade. Ces ERO réagissent ensuite avec les différents composants cellulaires, aboutissant à des lésions de l'ADN, des membranes mitochondriales [5] participant à l'apparition de ce SRIS postopératoire. Parallèlement à ces réactions pathologiques, il existe des mécanismes de lutte contre ces ERO. Chez l'être humain, une étape centrale correspond à la formation de l'anion superoxyde : l'anion superoxyde (O_2^-) formé à partir du dioxyde (O_2) sous l'action d'enzymes, il peut être transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la voie des superoxydes dismutases, puis en eau (H_2O), par la voie des catalases et des glutathion peroxydases. Ces réactions sont schématisées dans la figure 1.

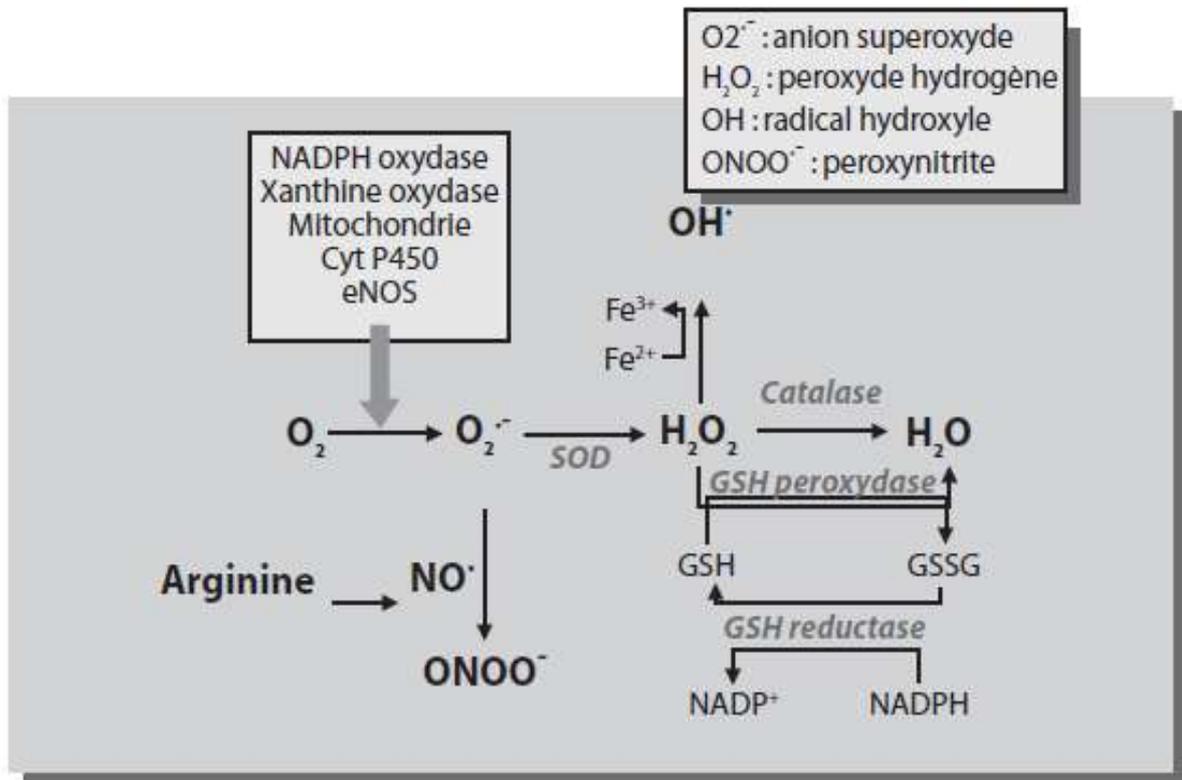


Figure 1. Représentation schématique des mécanismes de défenses contre les ERO. D'après Fontaine [6].

Malgré des théories anciennes évoquant le rôle pathologique de ces ERO [7], leur étude a pendant longtemps été difficile. D'une part en raison de la difficulté à mesurer des réactions se déroulant sur une durée de l'ordre de la microseconde [8] et d'autre part en raison du nombre importants d'espèces oxydantes et anti-oxydantes différentes impliquées dans ces réactions. Les dosages isolés n'évaluent qu'une partie isolée de la cascade oxydative au sein de l'organisme et/ou présentent un problème d'accessibilité et de coût. Récemment, une approche globale a été développée par le biais de la mesure de la CAT du sérum [9] permettant de s'affranchir des variations importantes liées aux différents composés impliqués et permettant d'expliquer l'apparition de complications postopératoires en cas de dépassement de cette CAT « physiologique ». Il existe actuellement plusieurs tests permettant de réaliser une mesure de la CAT actuellement. Néanmoins, ces tests présentent des limites quand à leurs méthodes de réalisation, leur fiabilité en présence de variations de certains composants (albumine...) ainsi qu'en présence d'une hémolyse ou d'une hémodilution

importante. Afin de permettre une mesure globale du pouvoir anti-oxydant endogène de la cellule avec une technique de réalisation aisée, une nouvelle méthode de dosage de la CAT dénommée Patrol® (Patent N° FR 07/07938, 13/11/07, modifié N° FR 08/02110, 16/04/08) a été développée au sein du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes reposant sur l'utilisation d'un rayonnement laser et permettant une mesure simple, fiable et reproductible [10] de la CAT du sérum. Nous avons donc d'une part comparé cette nouvelle méthode Patrol® avec une méthode commercialisée par le laboratoire Randox® (Randox Laboratories, Crumlin, United Kingdom) dans le cadre d'une situation caricaturale de production d'ERO.

Par ailleurs, de nombreuses études ont tenté de démontrer l'efficacité de thérapeutiques anti-oxydantes dans la prévention des complications postopératoires en chirurgie cardiaque. Ces études ayant eu des résultats négatifs pour la majorité d'entre elles [11], il est néanmoins probable que certaines catégories de patients, certaines catégories de chirurgies, ou certains temps chirurgicaux soient les principaux responsables de la production d'ERO permettant ainsi d'orienter les thérapeutiques anti-oxydantes sur des patients, des types de chirurgie, ou des temps chirurgicaux ciblés. Il existe peu de données sur l'importance respective des différents déterminants de la production de ces ERO [12] car les études précédentes [13-16] se sont focalisées sur l'atteinte de la CAT au cours de chirurgie de pontage aorto-coronaire ne permettant pas de comparaison avec des chirurgies pour lesquelles les profils de patients ou les techniques chirurgicales sont différents. Par ailleurs, il semble qu'il puisse exister une atteinte de la CAT même en l'absence de lésions d'ischémie - reperfusion [17].

C'est dans ce contexte et grâce à la méthode Patrol®, que nous avons donc comparé l'évolution de la CAT au cours de différents types de chirurgie cardiaque réalisée sous CEC (pontage aorto-coronaire et remplacement valvulaire aortique) ainsi qu'avec une chirurgie thoracique témoin sans CEC (lobectomie ou pneumonectomie) afin de déterminer si la CEC était la principale cause d'altération de la CAT et pouvoir ainsi cibler les catégories de patients les plus à même de bénéficier de l'introduction de traitements antioxydants spécifiques.

II. PATIENTS ET METHODES

Il s'agit d'une étude monocentrique non contrôlée de cohorte prospective ouverte.

A. Patients

Après accord du Comité de Protection des Personnes dans la recherche biomédicale du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, des patients ont été inclus après information et consentement écrit selon les recommandations de la déclaration d'Helsinki entre novembre 2007 et avril 2010. Ces patients devaient bénéficier de plusieurs types de chirurgie :

- chirurgie cardiaque avec pontage aorto-coronaire pour cardiopathie ischémique nécessitant une CEC
- chirurgie cardiaque avec remplacement valvulaire aortique pour valvulopathie aortique nécessitant une CEC
- chirurgie pulmonaire d'exérèse tumorale avec lobectomie ou pneumonectomie nécessitant une thoracotomie

Les critères d'inclusion étaient :

- âge supérieur à 18 ans
- affiliation au régime de sécurité social
- pas d'antécédents de chirurgie cardiaque ou thoracique
- absence de pathologie hématologique
- risque de complication chirurgicale estimé faible (FeVG>50%)

Les critères d'exclusion étaient :

- créatinémie > 150 µmol/l
- chirurgie combinée (pontage aorto-coronaire + valve)
- diabète de type I

Les patients prenant des traitements considérés comme ayant une action anti-oxydante n'ont pas été exclus mais les différents traitements ont été notés.

B. Anesthésie et technique opératoire

1. Chirurgie cardiaque

Une évaluation anesthésique (consultation et visite pré-anesthésique) était réalisée conformément à la législation comportant notamment une évaluation clinique, paraclinique avec évaluation de la fonction ventriculaire gauche par échographie cardiaque trans-thoracique et biologique avec dosage de la créatinémie. Une coronarographie écartant toute sténose coronaire significative a été réalisée chez tous les patients devant subir une chirurgie de remplacement valvulaire aortique.

Lors de la chirurgie, un monitoring par pression artérielle sanglante, cathéter artériel pulmonaire de Swan Ganz, électrocardioscope, surveillance continue de la saturation pulsée en oxygène et capnographe était effectué. L'anesthésie était réalisée de manière standardisée comportant la perfusion de propofol (Diprivan®, B Braun SA Medical, Boulogne Billancourt, France) et sufentanil (Mylan, Saint Priest, France) à objectif de concentration (Base Priméa Frésenius Kabi, Sèvres, France) et une curarisation par atracrium (Tracrium®, Hospira, Meudon La Forêt, France) pour l'intubation oro-trachéale. La trachée était intubée puis les poumons étaient ventilés (paramètres ventilatoires réglés par l'anesthésiste en charge). Une antibioprophylaxie par céfuroxime (Panpharma, Fougères, France) adaptée au poids était systématique. Une héparinisation était réalisée à la dose de 300 UI/kg avec ensuite un contrôle pour un objectif d'*Activated Clotting Time* supérieur à 300 secondes. Une perfusion à visée anti-fibrinolytique et d'épargne sanguine était réalisée par acide tranexamique (Exacyl®, Sanofi Aventis, Paris France). En cas d'hypotension artérielle, de l'éphédrine (Renaudin, Itxassou, France) ou de la noradrénaline (Aguettant, Lyon, France) était administrée sur prescription de l'anesthésiste en charge. Le priming de la CEC était réalisé par l'adjonction de 1000 ml de Ringer lactate (Baxter, Maurepas, France) et 500 ml de macromolécules (Gélofusine®, B Braun Medical SA, Boulogne Billancourt, France ou HEAfusine®, B Braun Medical SA, Boulogne Billancourt, France).

La cardioplégie était induite et entretenue de manière intermittente par du CP1B et la CEC était réalisée à l'aide de plusieurs types d'oxygénateurs. Après mise en place et vérification du bon fonctionnement de la CEC, la ventilation

mécanique était arrêtée. Les anastomoses proximales et distales étaient réalisées pendant la cardioplégie avec clampage aortique. Après réalisation des anastomoses distales, la perfusion du liquide de cardioplégie était arrêtée, et le cœur éventuellement défibrillé.

En fin de chirurgie, une antagonisation par protamine (Sanofi Aventis, Paris, France) à la dose de 300 UI/kg (Rapport 1/1 d'Héparine) était réalisée. Une analgésie multimodale associant paracétamol injectable (Perfalgan®, Bristol Myers Squibb, Rueil-Malmaison, France) et morphine (Aguettant, Lyon, France) était débutée. Le patient était ensuite transféré en service de réanimation de chirurgie cardiaque pour réveil, surveillance et extubation.

2. Chirurgie pulmonaire

Une évaluation anesthésique (consultation et visite pré-anesthésique) était réalisée conformément à la législation comportant notamment une évaluation clinique, paraclinique et biologique avec dosage de la créatinémie.

Un monitoring par pression artérielle non invasive, électrocardioscope, surveillance continue de la saturation pulsée en oxygène et capnographe était effectué. Un cathéter d'analgésie péridurale était posé en l'absence de contre-indication avant l'induction anesthésique.

L'anesthésie était réalisée de manière standardisée comportant la perfusion de propofol et sufentanil à objectif de concentration (Base Primea Frésenius Kabi, Sèvres, France) et une curarisation par atracrium (Tracrium®, Hospira, Meudon La Forêt, France) pour l'intubation oro-trachéale. Une antibioprophylaxie par céfoxitine (Panpharma, Fougères, France) adaptée au poids était systématique. En fin de chirurgie, une perfusion continue d'anesthésique local (Ropivacaïne®, AstraZeneca, Rueil Malmaison, France) était débutée à visée antalgique par l'intermédiaire du cathéter de péridurale associée à la perfusion de paracétamol injectable (Perfalgan®, Bristol Myers Squibb, Rueil-Malmaison, France). En cas d'absence d'analgésie péridurale, il était introduit une analgésie par pompe auto-contrôlée délivrant de la morphine (Pompe IVAC, PCAM, Cardinal Health, USA). Le patient était ensuite transféré en salle de surveillance post-interventionnelle pour réveil, surveillance et extubation

C. Echantillons biologiques

Tous les échantillons étaient collectés à l'aide de tubes secs de type Vacuette (Greiner Bio-One, Kremsmunster, Autriche).

1. Chirurgie cardiaque avec CEC

Au cours de la chirurgie, était réalisée une cinétique de prélèvements :

- Le premier prélèvement était réalisé immédiatement après l'induction anesthésique sur la pression artérielle sanglante.
- Un second prélèvement était réalisé après la sternotomie sur la pression artérielle sanglante.
- Un troisième prélèvement était réalisé immédiatement après réalisation de la cardioplégie et mise en place de la CEC sur la ligne veineuse du circuit de CEC.
- Un quatrième prélèvement était réalisé après « reperfusion » (définie par la reprise d'un rythme cardiaque propre et d'un volume d'éjection systolique jugé normal) sur la pression artérielle sanglante (T10).
- Un cinquième prélèvement était réalisé 30 minutes après reperfusion sur la pression artérielle sanglante (T30).
- Un sixième prélèvement était réalisé 24 heures après l'induction anesthésique sur la pression artérielle sanglante ou par ponction veineuse périphérique.

Les prélèvements étaient acheminés immédiatement au laboratoire pour réalisation immédiate du test Patrol®, ou étaient centrifugés et le surnageant congelé pour réalisation ultérieure du test, la congélation à -30°C n'interférant pas avec le test PATROL®.

2. Chirurgie pulmonaire

Au cours de la chirurgie était réalisée une cinétique de prélèvements :

- Un premier prélèvement était réalisé après l'induction anesthésique sur la pression artérielle sanglante ou par ponction veineuse périphérique.
- Un second prélèvement était réalisé après thoracotomie sur la pression artérielle sanglante ou par ponction veineuse périphérique.
- Un troisième prélèvement était réalisé pendant les sutures bronchiques sur la pression artérielle sanglante ou par ponction veineuse périphérique.
- Un quatrième prélèvement était réalisé 24 heures après l'induction anesthésique par ponction veineuse périphérique.

D. Paramètres mesurés

1. Méthode Randox

La mesure de la capacité CAT par la méthode Randox® a été réalisée grâce au kit commercialisé par le laboratoire Randox (Randox Laboratories Ltd, Ardmore, UK). Le test a été réalisé selon les recommandations du laboratoire Randox [18]. Le principe du test Randox repose sur une réaction entre la méthémoglobine et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour former une espèce radicalaire : la ferryl-myoglobine. Le chromogène ABTS (2, 2'-azinobis[3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate]) est ensuite incubé avec la ferryl-myoglobine pour produire un cation spécifique ABTS⁺. Il s'agit alors d'une espèce stable dans la longueur d'onde de 600 nm permettant une mesure dans le domaine du bleu-vert. Cette mesure est réalisée à un temps prédéterminé. Cette mesure est comparée avec un standard interne le Trolox, un analogue de l'alpha-tocophérol qui est hydrophile. Les résultats sont exprimés en équivalent Trolox (mmol/l). Les variabilités intra-individuelle et interindividuelle sont décrites comme étant respectivement de 0,54-1,59% et 3,6-6,1% [19].

2. Méthode Patrol

Le principe du test Patrol® est d'irradier le sérum étudié par un faisceau laser après avoir ajouté au sérum un photosensibilisant permettant de générer des ERO en quantité importante. On mesure ensuite la fluorescence induite par les ERO (à l'aide d'une sonde ultra sensible aux oxydations) n'ayant pas été neutralisées par le pouvoir anti-oxydant du sérum : il s'agit donc d'une mesure indirecte de la CAT.

a) Etude du spectre d'absorption

Pour chaque échantillon et chaque contrôle (dilué à 5% dans de l'eau pour préparation injectable), le spectre d'absorption est obtenu à partir d'un spectrophotomètre d'absorption Techcomp® 8500. Le niveau d'hémolyse est évalué à partir du pic d'absorption à 413 nm et le niveau d'absorption minimal est défini par l'absorption à 650 nm.

Les sérums dilués avec une absorption à 413 nm supérieure à une densité optique de 0,4 ou une absorption à 650 nm supérieure à une DO de 0,025 ont été considérés comme trop hémolysés et non analysés.

L'évolution de l'absorption du Rose Bengale (Sigma-Aldrich, France) après exposition au rayonnement Laser (514 nm) a aussi été analysée afin d'éliminer les artéfacts pouvant être liés aux modifications d'absorption du RB en présence des différents solvants.

b) Désactivation de l'oxygène singulet (1O_2) par le sérum.

Le principe du test est d'analyser par le biais du couple dichlorofluorescéine réduite/oxydée (DCFH/DCF), la vitesse de neutralisation des ROS et/ou des peroxydes induits par l' 1O_2 , la DCFH est ajoutée au sérum immédiatement après la fin de l'irradiation lumineuse de manière standardisée pour chaque échantillon testé. Une solution est formée de manière extemporanée dans une cuve (1 cm X 1

cm) avec 25 µl du sérum devant être testé, 25 µL d'une solution de RB à 100 µg/ml et 450 µl d'eau stérile (pH 7). Le RB - un photosensibilisant qui a le meilleur rendement pour la production d'oxygène singulet [20] - est dilué à 5 µg/ml et le sérum à 5% dans une solution finale d'eau stérile pour préparation injectable.

c) Irradiation

Le laser est un Coherent[®] Ar-ion Inova 70 émettant à 514 nm. L'irradiation est réalisée sur des cuves contenant 500 µl de solution. Le rayonnement laser est transmis jusqu'à la cuve par le biais d'une fibre optique en silicone - silice (diamètre interne 600 µm, Quartz et Silice[®] France) produisant un spot de 10 mm de diamètre illuminant la solution. La puissance est calibrée par un Wattmètre (Coherent[®]) et ajustée à 500 mW. Pour délivrer une fluence de 20 J/cm², le temps d'irradiation est de 102 secondes. Un système mécanique permet le positionnement parfait du rayonnement laser ainsi que du puits afin d'obtenir une reproductibilité parfaite des mesures.

Immédiatement après la fin de l'irradiation, de la dichlorofluorescéine activée (1mL) préparée ainsi : 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) est dissoute dans l'éthanol et stockée à -20°C. Pour convertir la DCFH-DA en DCFH, 0.5 ml d'une solution à 1 mM de DCFH-DA dans l'éthanol est additionnée à 2 ml d'une solution de NaOH à 0.01 N et entreposée à température ambiante dans le noir pendant 30 min. L'hydrolysate est ensuite neutralisé avec 10 ml d'une solution tamponnée à pH 7.2 de Phosphate de sodium à 250 mM et stocké à 40°C dans une étuve au noir et utilisé dans les 2 heures suivant son ouverture. La concentration finale de DCFH activée est de 40 mM.

L'oxydation de la solution activée de DCFH résulte de la transformation de la DCFH activée non fluorescente en DCF fluorescente avec un pic à 525 nm. Le spectre de fluorescence est enregistré pendant 66 minutes par un spectrofluorimètre Varian[®] Cary Eclipse, qui mesure simultanément le niveau de fluorescence à une température stable et monitorée de 40°C (Varian[®] Cary PCB 150 Peltier Device). L'excitation se produit à 488 nm et la fluorescence est mesurée

entre 400 et 800 nm mais lue à 525 nm. Les aires sous courbes sont ensuite calculées.

E. Analyse statistique

Les résultats sont présentés en moyenne \pm déviation standard. Les différences significatives ($p < 0.05$) sont déterminées pour les variables quantitatives par une ANOVA à une ou deux voies suivie d'un test de Student Newman-Keuls et pour les variables qualitatives par un test de Chi2 ou un test exact de Fisher en cas d'effectifs insuffisants. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Sigma-Stat 2.03 (Systat Software Inc, Illinois, USA).

III. RESULTATS

Au total, 34 patients ont été inclus. Les caractéristiques démographiques et préopératoires sont détaillées dans le tableau 1.

	PAC (n=13)	RVAo (n=13)	Thoraco (n=8)
Age (années)	63±8 \$	74±13 ¥	64±6
Genre (H/F)	12/1	6/7	7/1
IMC (kg/m ²)	27,6±3,7 £	29,8±5,3 ¥	23,7±3,1
Tabac	7 \$	1	3
Dyslipidémie	13	10	3
Diabète	3	5	1
HTA	13 \$	12 ¥	3
Traitements			
- Béta-bloquant	12 \$£	5	1
- Inhibiteur calcique	6	1	2
- IEC / ARA II	8	6	1
- Statine	12 £	8	2
- Aspirine	11 \$£	5 ¥	0
- Plavix	6 £	2	0
- Dérivé nitré	2	0	0
FeVG (%)	62±7	65±9	NR

Tableau 1. Répartition des patients et données démographiques.

\$: p<0.05 PAC Vs RVAo

£: p<0.05 PAC Vs Thoraco

¥: p<0.05 RVAo Vs Thoraco

NR: non renseigné

Les oxygénateurs ont été de trois types : Sorin Synthesis (n=15), Medtronic Affinity (n=5), et Terumo Captio (n=6). Les remplacements valvulaires aortiques ont consisté en pose de : bioprothèse Carpentier Edwards (n=4) ; bioprothèse Medtronic (n=7) ; prothèse mécanique Carbomédic (n=1) ; prothèse mécanique

Saint Jude Medical (n=1). Les variables opératoires et post-opératoires sont décrites dans le tableau 2.

	PAC (n=13)	RVAo (n=13)	Thoraco (n=8)
Durée cardioplégie (min)	61±22	48±14	NA
Durée CEC (min)	87±25 \$	63±19	NA
Durée chirurgie (min)	204±53 \$	139±33	169±40
Durée séjour réanimation et soins continus (j)	2,1±2,1	1,4±0,8	3,3±3,3
Durée séjour hôpital (j)	11,9±4,8	13,3±6,9	11,9±3,6
Clairance créatinine pré-opératoire (MDRD ; ml.min ⁻¹)	78±16 £	78±17 ¥	99±12
Clairance créatinine J1 (MDRD ; ml.min ⁻¹)	96±21	83±23 ¥	110±19
Troponine I H6 (µg/l)	0,29±0,14 \$	0,37±0,16	NR
Troponine I J1 (µg/l)	0,22±0,11 \$	0,27±0,12	NR
Troponine I J2 (µg/l)	0,14±0,08 \$	0,25±0,11	NR

Tableau 2. Résultats des variables opératoires et post-opératoires.

\$: p<0.05 PAC Vs RVAo

£: p<0.05 PAC Vs Thoraco

¥: p<0.05 RVAo Vs Thoraco

NA: non applicable

NR: non renseigné

Les patients ayant bénéficié d'une chirurgie de revascularisation ont eu entre 2 et 4 pontages aorto-coronaires. Aucun patient n'est décédé dans les suites de la chirurgie. Les complications présentées sont : AFCA (n=5), pneumothorax (n=1), convulsions (n=2), médiastinite (=1).

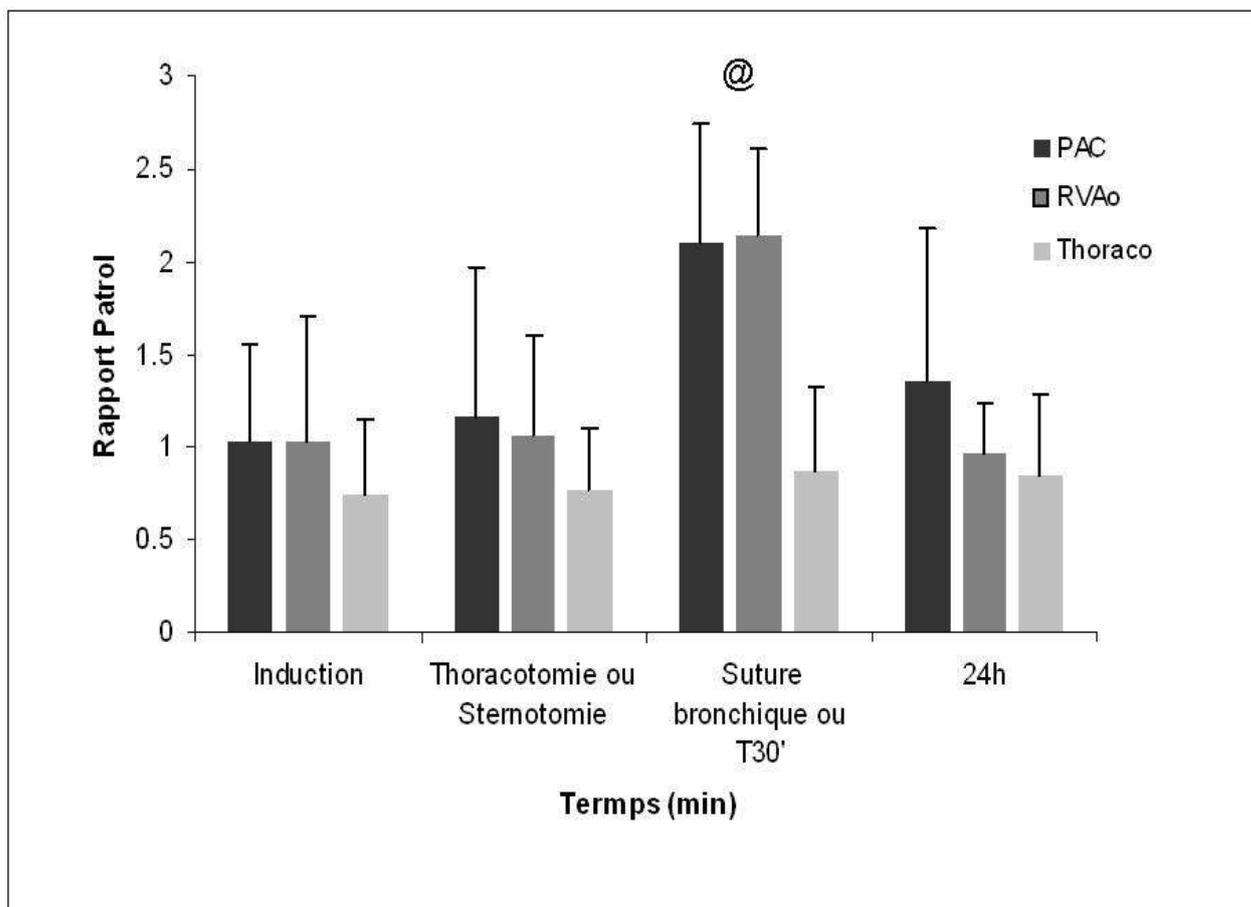


Figure 2. Comparaison de la CAT entre les PAC, RVAo et Thoracotomie
 @: $p < 0.05$ T Vs Induction pour PAC et RVAo

Pour les PAC et les RVAo, on observait une augmentation du rapport Patrol® soit une diminution de la CAT après 30 minutes de déclampage aortique en comparaison à la valeur d'induction prise comme référence contrairement aux thoracotomies où il n'existait pas de différence significative d'évolution de CAT entre les différents temps chirurgicaux et postopératoires. De plus, il n'existait pas de variations de la CAT entre l'incision chirurgicale et l'induction anesthésique pour les trois types de chirurgie (figure 2).

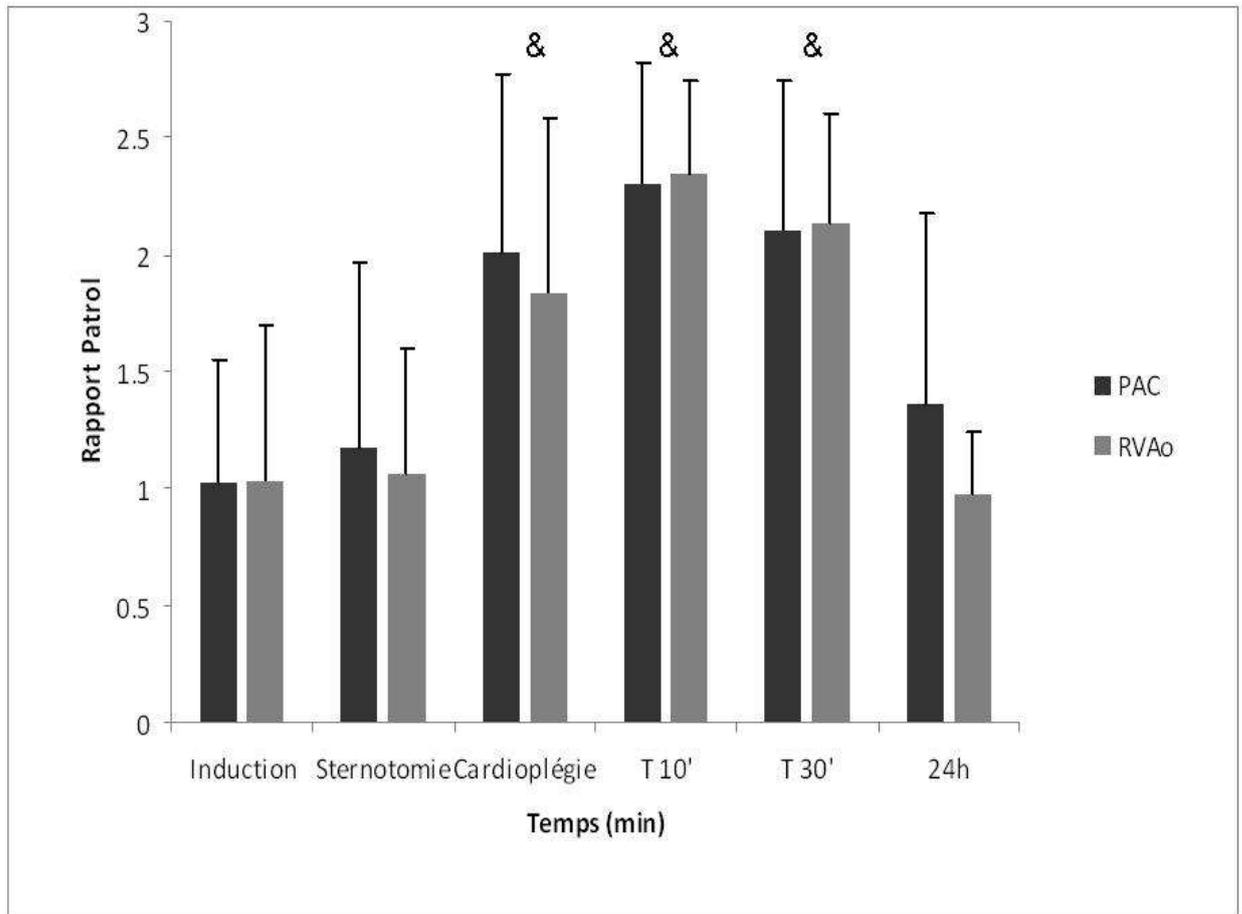


Figure 3. Comparaison de la CAT entre PAC et RVAo par la méthode Patrol®.
 &: $p < 0.05$ T Vs Induction pour PAC et RVAo

On observait une augmentation du rapport Patrol® entre la cardioplégie et l'induction pour les PAC et les RVAo. Cette différence restait significative dix minutes puis trente minutes après la reperfusion pour disparaître à la 24^{ème} heure avec une normalisation de la CAT. Il n'existait pas de différence significative d'évolution du rapport Patrol® entre le groupe des PAC et le groupe des RVAo (figure 3).

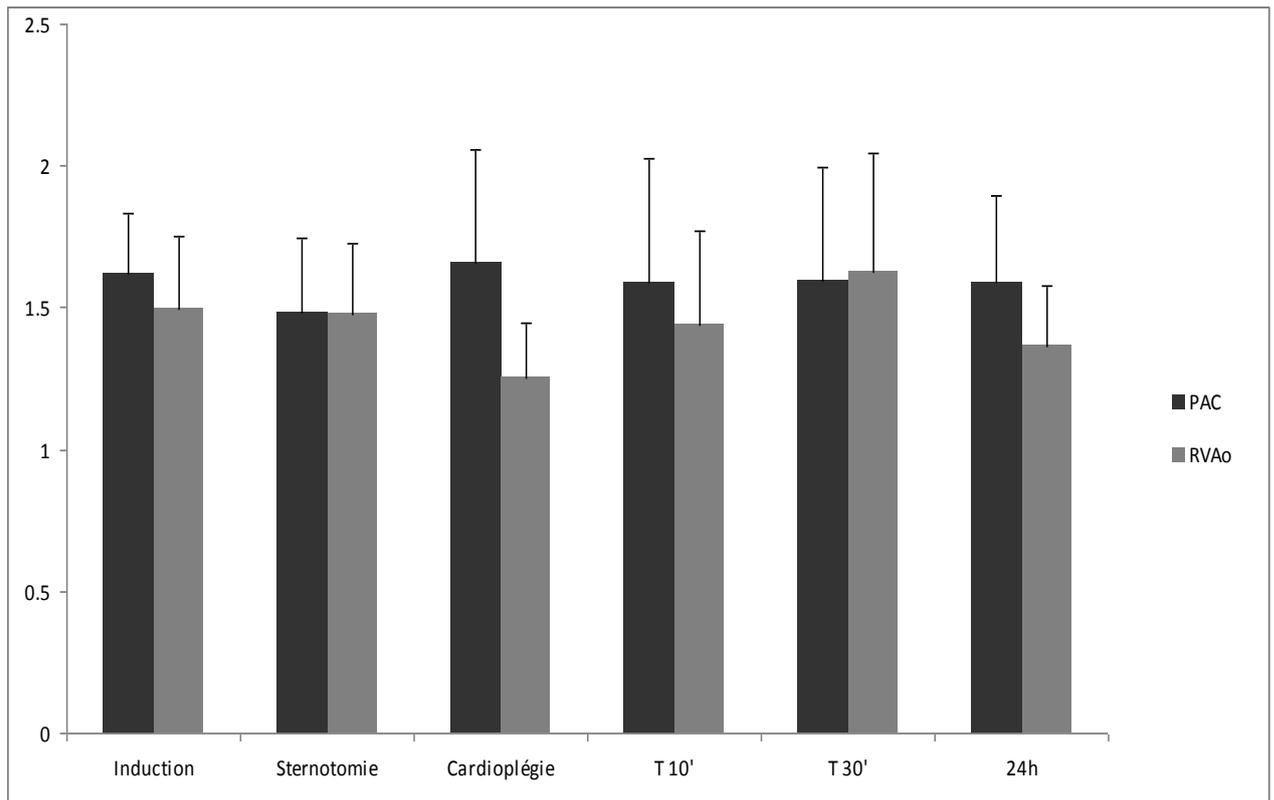


Figure 4. Comparaison de la CAT entre PAC et RVAo par la méthode Randox®.

On n'observait pas de variations de la CAT entre les différents temps opératoires pour les PAC et les RVAo lorsque l'on réalisait la mesure à l'aide du test Randox® (figure 4).

IV.DISCUSSION

A. Chirurgie thoracique et stress oxydant

Notre étude a montré que la CAT baisse avec la durée du clampage aortique, et la durée de la CEC conformément à des travaux précédents [16]. Ceci démontre que la CEC (« ischémie ») et la reprise d'une activité cardiaque spontanée (« reperfusion ») sont les principales sources de stress oxydant pour l'organisme en comparaison avec une chirurgie thoracique témoin réalisée sans CEC. D'autre part, les profils d'évolution de CAT ne sont pas différents entre les patients opérés d'une chirurgie de pontage coronaire ou d'une chirurgie de remplacement valvulaire aortique ce qui nous permet d'affirmer que les pathologies sous-jacentes sont une source d'ERO mineure en comparaison avec l'« ischémie » et la « reperfusion », ce qui confirme d'autres travaux [12]. On peut donc séparer schématiquement deux phases de production d'ERO : production d'ERO lors du clampage aortique et de l'instauration de la CEC puis production d'ERO lors de la séquence de reperfusion. Les causes expliquant une telle production d'ERO à ces deux moments précis sont multiples : activation des polynucléaires neutrophiles par passage sur le circuit de CEC, relargage de cytokines pro-inflammatoires liées à l'hémolyse due à la vitesse du flux sanguin dans le circuit de CEC. De plus, il est possible que la vitesse de balayage en oxygène de la membrane de CEC puisse aggraver ces phénomènes en entraînant un état d'hyperoxie prolongé après l'arrêt de la ventilation mécanique [21].

L'absence de différence entre les profils d'évolution de CAT entre les groupes PAC et RVAo après l'induction, alors même que les sujets du groupe PAC présentent des lésions athéromateuses coronaires et systémiques devant en théorie être la source d'une surproduction d'ERO en comparaison au groupe RVAo, confirme la théorie du préconditionnement ischémique : les cardiomyocytes développent une tolérance à l'ischémie prolongée en cas d'exposition répétée à des périodes d'ischémie courte [22].

La CAT se normalise ensuite dès le premier jour postopératoire en accord avec les données antérieures [14]. Cette normalisation rapide des défenses anti-oxydantes ne peut se faire qu'en mobilisant les différentes voies de défenses qu'elles soient extracellulaires ou intracellulaires, ainsi qu'en recrutant au niveau

local des enzymes anti-oxydantes comme la superoxydismutase [23] et dans différents organes. La mesure de la CAT montre ainsi ses limites ne permettant pas d'étudier les différentes voies de signalisation. Néanmoins, les études précédentes ont permis de formuler l'hypothèse d'une neutralisation des ERO par deux mécanismes complémentaires : une première ligne constituée des substances anti-oxydantes proprement dites qui en s'oxydant permettent l'orientation des ERO vers une seconde ligne composée de voies enzymatiques spécifiques permettant l'élimination complète de ces ERO [24, 25]. Ces différentes voies enzymatiques (superoxydismutase, catalase...) permettent une neutralisation des ERO sur la durée expliquant ainsi une normalisation progressive sur les premières 24 heures postopératoires.

Notre groupe témoin est composé de patients opérés de chirurgie pulmonaire. Idéalement un troisième groupe composé de patients opérés de chirurgie cardiaque sous mini-CEC ou à cœur battant, aurait été idéal. Malheureusement, ce groupe n'a pas été inclus en raison d'un recrutement prévisionnel difficile (technique réalisée épisodiquement par un seul chirurgien sur les 8 chirurgiens thoraciques du service). La présence de témoins correspondant au groupe des chirurgies pulmonaires ne permet pas la mise en évidence d'une production d'ERO en l'absence même de phénomène d'ischémie - reperfusion. Cette absence de différence significative est probablement liée à l'effectif restreint. Même si la production d'ERO au cours de ce type de chirurgie est mineure en comparaison de celle provoquée par l'instauration de la CEC, il s'agit probablement d'une nouvelle voie de recherche afin d'expliquer et de traiter certaines complications spécifiques de la chirurgie pulmonaire tel que l'œdème post-pneumectomie [17].

Il existe des différences significatives dans le recrutement des patients dans les trois différents groupes : les patients opérés d'un PAC ou d'une thoracotomie sont plus jeunes que les patients opérés d'un RVAo ; les patients opérés d'un PAC et d'un RVAo ont un IMC plus élevé que les patients opérés d'un RVAo ; il existe une proportion plus importante de l'effectif traité par bêta-bloquant et avec un tabagisme actif chez les patients opérés d'un PAC en comparaison avec les patients opérés d'un RVAo ou d'une thoracotomie. Ces différences sont dues au recrutement spécifique de ces 3 types de pathologie ainsi qu'au biais de sélection résultant des

critères de sélection ayant pour but d'écarter les patients avec un risque élevé de complication chirurgicale.

Notre étude ne permet pas de mettre en évidence le caractère protecteur retrouvé dans d'autres travaux de certaines thérapeutiques utilisées au cours de l'anesthésie. D'une part, le propofol par un mécanisme de capture du peroxy-nitrite pourrait avoir une action anti-oxydante [26, 27]. D'autre part, de nombreux médicaments utilisés lors d'une anesthésie pour chirurgie cardiaque ou pulmonaire possèdent des propriétés anti-oxydantes : statines [28] ou même pro ou anti-oxydantes en fonction des études : héparine [15, 29]. D'autres travaux plaident pour l'emploi systématique des agents halogénés (isofurane, sevofurane) afin de réaliser un préconditionnement pharmacologique à l'ischémie [30], mais notre effectif était trop faible pour comparer l'évolution de la CAT en fonction des nombreux schémas anesthésiques possibles. Enfin, notre population était sélectionnée à l'inclusion spécifiquement sur le risque de complication per et post-opératoire. D'autres études sont donc nécessaires avec des effectifs plus importants afin de confirmer ou d'infirmer les perspectives thérapeutiques ayant déjà été explorées dans le cadre d'une action anti-oxydante directe : propofol, thérapeutiques anti-inflammatoires [31], vitamine C [32], vitamine E [32], magnésium [33], N-Acetylcystéine [34] ou dans le cadre plus large du pré-conditionnement ischémique : cyclosporine [35, 36], halogénés [37].

Les prélèvements sont réalisés sur plusieurs sites distants : artère radiale puis circuit veineux de la CEC, artère radiale et sang veineux périphérique pour le prélèvement à la 24^{ème} heure. Malgré la très courte durée de vie des ROS et leurs productions à des sites spécifiques, il est démontré que des prélèvements sanguins en artériel périphérique et dans le sinus coronaire montrent des valeurs identiques [38], nous permettant ainsi la réalisation des prélèvements sur différents sites.

Il existe donc une atteinte de la CAT au cours de tout type de chirurgie cardiaque, de plus cette atteinte est directement corrélée à la réalisation d'une CEC ainsi qu'à la durée de celle-ci. Par ailleurs, cette production de ROS est directement impliquée dans la genèse de l'inflammation spécifique liée à la CEC [2], l'apparition d'un SRIS étant même corrélé à la sévérité de l'atteinte de la CAT [39]. Les études déjà réalisées [31, 33, 40, 41] n'ont pas pu démontrer l'efficacité d'une thérapeutique anti-oxydante. Récemment, le lien entre atteinte de la CAT et

survenue d'une ACFA a été démontré [42]. Maintenant qu'il est possible grâce à la méthode Patrol® de mesurer aisément la CAT à des temps répétés dans le cadre d'une chirurgie thoracique, d'autres études sont nécessaires afin d'explorer le lien probable entre profondeur de l'atteinte de la CAT et survenue de complications postopératoires notamment celles dont le lien avec les phénomènes oxydatifs ont déjà été démontrés sur une population non sélectionnée.

Par ailleurs d'autres études sont nécessaires afin de savoir si la profondeur de cette atteinte de la CAT est un facteur prédictif de l'apparition d'une complication postopératoire permettant par exemple l'amélioration des scores de risque en chirurgie cardiaque tel que l'EUROSCORE dont les limites sont bien définies actuellement [43].

B. Méthode Randox® et méthode Patrol®

L'évolution de la CAT au cours de la chirurgie thoracique sous CEC mesurée par la méthode Patrol® est donc conforme aux données issues d'autres méthodes de dosage du stress oxydant : mesure direct des dérivés radicalaires par résonance magnétique [38] , mesure de différentes enzymes impliquées [2, 12], mesure de la concentration en acide urique [2, 38], mesure des produits de dégradation lipidiques ou « TBARS » [44]. De plus, cette évolution est conforme aux autres méthodes de mesure indirecte de la CAT ayant jusqu'ici été développées : analogue de la vitamine C (« Trolox Equivalent Antioxydant Capacity ») [38], consommation d'oxygène après adjonction d'un oxydant (« Oxygen Radical Absorbance Capacity ») [2], réduction du fer ferreux Fe^{3+} en fer ferrique Fe^{2+} (« Ferric Reducing Antioxidant Power ») [45].

Dans notre étude, les valeurs de CAT obtenues à l'aide du test Patrol® ne sont pas corrigées par rapport à l'hémodilution liée à la technique chirurgicale (instauration de la CEC avec un priming contenant 1500 ml de cristalloïde et de colloïde à mettre en rapport avec la volémie moyenne d'un individu approximativement de 4500 ml) car l'hémodilution ne pouvait-être quantifiée par les méthodes usuelles (prélèvements artériels réalisés sur automate délocalisé dans notre établissement). De plus, il existe plusieurs arguments permettant d'affirmer qu'il ne faut pas corriger cette hémodilution : les ERO produites possèdent une durée de vie très limitée et interagissent avec des composés situés à proximité

immédiate. Le facteur correctif de l'hémodilution peut représenter la totalité des substances anti-oxydantes extracellulaires, alors que celles-ci n'interviennent pas dans la défense contre les ERO produites ; la correction de l'hémodilution sur toute la période de l'étude peut entraîner la négligence d'une immunosuppression per et post-opératoire avec une diminution de la synthèse d'EPO [46, 47] ; d'une dénaturation per-opératoire de l'albumine, ainsi qu'une mauvaise évaluation des mouvements liquidiens en postopératoire (transsudat pleural et péricardique, œdème tissulaire...) ; enfin l'hémodilution possède un effet pathologique propre entraînant des complications cardiaques [48], rénales [49], affectant le pronostic global des patients chirurgicaux [50]. Néanmoins, cette hémodilution peut entraîner des erreurs de mesure comme cela peut être le cas pour le test Randox®. Il a été démontré qu'en présence d'une hémodilution importante, le test Randox® pouvait entraîner une surestimation de plus de 15% des valeurs de CAT [51]. Il est donc primordial de disposer d'une méthode de mesure permettant de s'affranchir de ces variations de concentrations protéiques.

Une limite du test Patrol® est liée à l'utilisation du sérum et non du sang total pour la réalisation du test pouvant conduire à une sous évaluation de la CAT par une non prise en compte des capacités anti-oxydante enzymatiques contenue à l'intérieur du globule rouge (superoxydismutase au premier lieu) [52]. En effet, afin de permettre le transport de l'oxygène par l'hémoglobine, les globules rouges comportent de nombreux systèmes enzymatiques participant aux défenses contre les ERO [53]. En théorie, la lyse des globules rouges entraîne donc le relargage dans le sérum d'espèces anti-oxydantes. Néanmoins, il a été montré récemment que les modifications physicochimiques produites par le passage dans le sérum pouvaient finalement résulter en une libération importante de composés altérant les capacités anti-oxydantes du sérum [10]. Lors de la réalisation de tests biochimiques sanguins, il existe une part variable d'hémolyse liée à la technique de réalisation des prélèvements sanguins (vacutainer), à la CEC, à la présence éventuelle d'une valve mécanique majorant l'hémolyse par rapport à une valve biologique [54]. Nos résultats prennent donc en compte une méthode de correction de l'hémolyse ayant fait l'objet d'une étude de validation préalable [10]. Néanmoins, il est probable que cette correction de l'hémolyse grâce à une formule basée sur les modifications provoquées par l'hémolyse chez des volontaires sains puisse entraîner un biais de correction chez des patients en situation pathologique. D'autres études sont

nécessaire afin d'explorer cette courbe « hémolyse - CAT Patrol® » afin de s'assurer qu'il s'agit d'une constante interindividuelle et non pas d'une variable individuelle.

Le test Randox® repose sur la mesure de l'oxydation d'un réactif à un temps déterminé comprenant une période d'incubation où les ERO produits sont « captées » par la CAT puis une seconde période d'oxydation du réactif. Dans le cadre d'une oxydation où les 2 constantes de temps d'oxydation sont équivalentes, on observe une oxydation identiques des 2 substrats (les antioxydants endogènes et le réactif dont l'oxydation est mesurée) avec en corollaire une sous estimation possible de l'oxydation du réactif mesuré comme cela est montré dans la figure 5. Contrairement à cette mesure à un temps donné, le test Patrol® utilise une mesure continue sur une période donnée grâce à une aire sous la courbe permettant d'éviter ce type d'erreur.

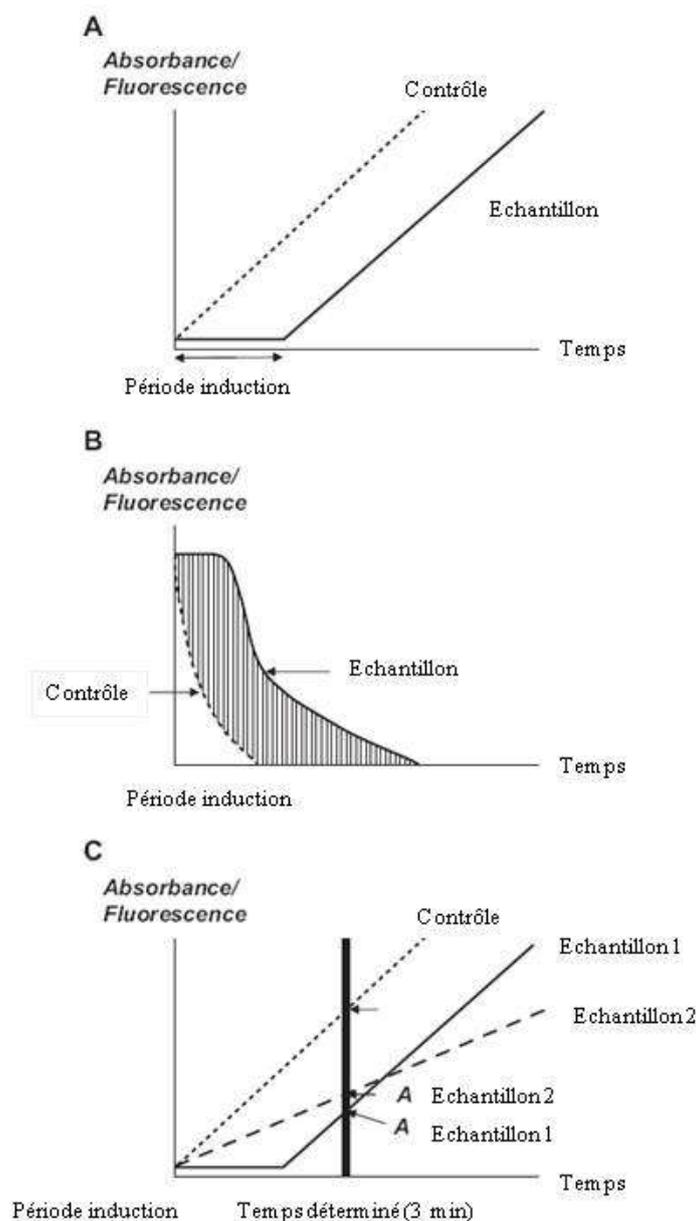


Figure 5 d'après Bartosz [52]

D'autre part, la mesure de la CAT dépend du réactif utilisé et de son interaction avec les différents composés antioxydant présent dans le sérum. Il est ainsi démontré que les résultats du test Randox® sont fortement corrélés à l'évolution des concentrations de protéines comportant un groupement thiol et en acide urique [52]. Il s'agit d'un facteur limitant par rapport à une population pouvant prendre des traitements modifiant les concentrations en acide urique [55]. Il a ainsi déjà été démontré que les variations de concentration en acide urique pouvaient conduire à des mauvaises interprétations des résultats en terme de CAT dans le cadre de l'insuffisance rénale [56]. Il est donc déterminant pour appréhender les

réactions au stress oxydant de posséder un test indépendant de ces variations des paramètres biologiques.

Une limite usuelle des tests permettant d'évaluer la CAT est liée aux conditions de réalisation de ces tests. En effet, la plupart de ceux-ci nécessitent des conditions de température, de pH qui entraînent la dénaturation de certains composés enzymatiques aboutissant à une modification de la CAT mesurée. Le test Patrol® nécessite pour sa réalisation un pH à 7.2 pouvant être considéré comme neutre dans le cadre d'une mesure de biochimie ainsi qu'une température de 40°C qui reste dans le cadre des intervalles de température possible du corps humain. On peut donc considérer que la mesure Patrol® est un proche reflet de la CAT in vivo.

Le test Patrol® permet donc une mesure fiable, reproductible et corrélée à l'évolution de la CAT dans des conditions physiologiques et pathologiques. Le test Randox® ne permet une mesure fiable de ces mêmes paramètres biologiques. Il est donc maintenant nécessaire d'évaluer le test Patrol® dans des populations plus importantes et de comparer celui-ci avec d'autres méthodes de mesure de la CAT tel que les tests de type ORAC afin de permettre une comparaison entre les différents tests [51].

V. CONCLUSION

En conclusion, la chirurgie cardiaque réalisée sous CEC entraîne une atteinte profonde et brève de la CAT en comparaison avec une chirurgie thoracique témoin. Cette atteinte est indépendante du type de chirurgie cardiaque. D'autres études sont nécessaires afin de déterminer le lien entre la morbidité de ce type de chirurgie et l'atteinte de la CAT afin d'envisager de nouvelles thérapeutiques spécifiques. Ces études pourront utiliser la méthode Patrol® qui est une méthode fiable, reproductible et aisément réalisable dans le cadre d'une chirurgie thoracique.

VI. ANNEXES

Les différentes méthodes de mesure du stress oxydant

1. Mesure directe de la production de ces espèces radicalaires:

La RPE est une méthode spectroscopique qui est considérée comme étant la technique de choix pour la mise en évidence la plus directe possible de radicaux libres comme l'anion superoxyde, le radical hydroxyle ou encore les radicaux de nature lipidique. Cette méthode mesure l'absorption d'énergie produite suite à l'interaction de l'électron libre du radical avec un champ magnétique extérieur produit par de puissants aimants. Cette interaction donne lieu à la formation d'un spectre RPE qui peut être visualisé sur un écran d'ordinateur, analysé et éventuellement quantifié, car la hauteur du signal est directement proportionnelle à la quantité de radicaux libres présents dans l'échantillon. Au cours de son oxydation par les ERO, l'acide ascorbique passe par un stade intermédiaire qui est le radical ascorbyl. Celui-ci pouvant facilement être décelé dans du plasma par la technique RPE, sa mesure a été proposée comme marqueur non-invasif de la présence d'un stress oxydatif. Vu leur durée de vie très courte, la détection des autres radicaux oxygénés nécessite toutefois l'utilisation de molécules stabilisantes (piégeur de spin) qui peuvent être ajoutées à l'échantillon biologique.

2. Mesure des réactions produites par l'interaction entre les ERO et les composants du corps humain

a) Peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés comme les acides linoléiques ou arachidoniques sont les cibles privilégiées des ERO et plus particulièrement des radicaux libres. Dans une première étape, ils se transforment en peroxydes lipidiques (ROOH) qui peuvent être aisément mesurés. Sous l'action de métaux de transition (fer, cuivre), les peroxydes lipidiques se décomposent ensuite en toute une série de sous-produits que sont les aldéhydes et les hydrocarbures. La détection spectrophotométrique de la MDA par le test à l'acide thiobarbiturique est

la méthode la plus ancienne et la plus populaire pour mesurer la peroxydation lipidique. Cette méthode est toutefois sujette à de très nombreux artéfacts dans la mesure où la présence d'hémoglobine dans l'échantillon sanguin ou de fer dans les produits d'analyse interfère avec le test et donne en conséquence des résultats tout-à-fait erronés et peu fiables. L'utilisation de la TBA est de plus en plus abandonnée au profit d'une méthode HPLC qui dose le MDA sous sa forme libre [57]. Néanmoins, la MDA reste un indice peu représentatif de la présence d'une peroxydation lipidique puisqu'elle ne représente qu'un pourcentage incomplet des produits de décomposition des peroxydes lipidiques. Plus sensible et beaucoup plus fiable est la mesure d'un autre aldéhyde, le HNE provenant de la dégradation des peroxydes d'acides gras. On peut aussi doser les F2-isoprostanes qui se forment suite à l'addition du radical hydroxyle sur une molécule d'acide arachidonique. Ces isoprostanes sont produites dans le sang et sont ensuite excrétées dans l'urine où elles sont dosées par spectrométrie de masse.

b) Oxydation des lipoprotéines

Le dommage oxydatif provoque des changements dans la structure des LDL qui sont riches en acides gras polyinsaturés. La peroxydation induite dans les LDL par les ERO provoque in situ la formation d'aldéhydes qui peuvent à leur tour oxyder les LDL. Ces LDL modifiées sont reconnues par les macrophages au sein desquels elles s'accumulent en formant des cellules spumeuses. Au début des années 90, des anticorps monoclonaux ont été mis au point dans les laboratoires de recherche pour mettre en évidence la présence de MDA et d'HNE dans les lipoprotéines oxydées.

c) Oxydation des protéines

Les modifications des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les ERO sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés. En présence de dinitrophénylhydrazone, ces dérivés carbonylés peuvent être mis en évidence dans des échantillons biologiques par spectrophotométrie, par technique HPLC ou via des anticorps mono et polyclonaux

d) Oxydation de l'ADN

L'ADN et l'ARN sont des cibles privilégiées pour les ERO. L'ADN nucléaire est en partie protégé par les histones contrairement à l'ADN mitochondrial situé à proximité du siège intracellulaire du métabolisme de l'oxygène. Plusieurs mécanismes de réparation interviennent alors comme le *Base Excision Repair* qui comprend des enzymes de type glycosylases et endonucléases qui reconnaissent les produits d'oxydation des purines. Les métabolites formés tel le 8-hydroxy-2' déoxyguanosine (8-OH2DG) peuvent être détectés par des méthodes HPLC assez sophistiquées [58]. Ces analyses exigent toutefois énormément de précautions lors de la préparation de l'échantillon et demandent beaucoup de temps de sorte qu'elles ne peuvent se pratiquer que dans le cadre d'un laboratoire de recherche.

e) Métabolisme du fer

Le fer joue un rôle capital dans l'initiation et la propagation des réactions radicalaires en permettant la formation de radicaux hydroxyles (OH⁻). Le fer catalyse aussi la décomposition des lipides peroxydés (ROOH) en les transformant en radicaux alkoxy (RO⁻) et peroxy (ROO⁻) qui amplifient le processus de peroxydation lipidique. Dans des conditions physiologiques, la transferrine possède une capacité de fixation importante en fer puisqu'elle est saturée à environ 30% avec ce métal de transition de sorte qu'il n'est pas possible de trouver du fer libre (à l'état actif) dans le sang de sujets en bonne santé. A ce titre, la transferrine est considérée comme étant un antioxydant important. En situations pathologiques, le fer peut toutefois être libéré de ses protéines de transport (ferritine, lactoferrine) sous l'action des ERO et se retrouver dans le sang sous une forme libre capable d'initier des réactions radicalaires. Une méthode de dosage utilisant la bléomycine permet de mettre en évidence ce fer libre.

f) Activation des neutrophiles

Les polymorphonucléaires (PMNs) ou neutrophiles jouent un rôle important dans la défense de l'organisme puisqu'ils assurent la phagocytose et la destruction de microorganismes étrangers. La cytotoxicité de ces cellules s'explique par leur

capacité à générer intracellulairement de grandes quantités d'EOA, mais aussi à libérer à partir de leurs granules des enzymes protéolytiques (élastase, collagénase) et de la MPO. Indépendamment de cette action, les PMNs peuvent aussi s'activer sous l'action de stimuli extérieurs comme les fragments de protéines, les cytokines, les endotoxines, les fragments du complément qui sont libérés en grande quantité dans l'organisme au cours de différentes situations pathologiques. Les produits de cette activation sont cette fois libérés dans le milieu extracellulaire et s'attaquent dès lors à des tissus ou organes sains déclenchant ainsi un phénomène inflammatoire aigu. Une élévation du taux plasmatique en MPO et élastase sera donc le reflet d'une intense activation leucocytaire et, par conséquent, la preuve indirecte que des ERO ont été produites dans ces situations pathologiques. Des tests spectrophotométriques et immunologiques pouvant être utilisés en routine existent pour ces deux enzymes.

3. Mesure isolée des différents mécanismes de défenses

a) Antioxydants et oligoéléments

Le plasma humain est riche en antioxydants de petite taille de types hydrophyle (acide urique, acide ascorbique (vitamine C), glutathion, bilirubine) et lipophile (α -tocophérol (vitamine E), rétinol (vitamine A), β -carotène, ubiquinone). Les globules rouges sont par contre très riches en enzymes anti-oxydantes comme la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase. De très nombreuses études chez l'animal ont montré que les antioxydants de petite taille sont généralement consommés lors d'un stress oxydatif tandis que le taux d'enzymes anti-oxydantes est soit augmenté par expression moléculaire en cas de faible stress oxydatif (adaptation), soit diminué lorsque l'intensité du stress oxydatif est trop importante. Les antioxydants de petit poids moléculaire sont facilement dosables en routine par des méthodes spectrophotométriques (acide ascorbique, glutathion) et HPLC (ubiquinone, vitamines A et E, β -carotène). Le sélénium est un élément essentiel à l'état de trace (oligoélément) qui ne possède pas à proprement d'activité anti-oxydante. Il est toutefois considéré comme tel puisqu'il participe à la constitution et à la régulation de la glutathion peroxydase, enzyme détoxifiante via

la destruction des peroxydes lipidiques. Le sélénium se dose dans le sérum ou le plasma par diverses techniques comme la fluorescence par rayons X, l'émission de particules induite par rayons X, la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse et l'absorption atomique avec correction Zeeman.

b) Détermination d'activités enzymatiques impliquées dans les défenses anti-oxydantes dans le plasma, les globules rouges ou d'autres cellules

Depuis quelques années, il existe des kits commerciaux permettant la mesure de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase dans les globules rouges.

4. Mesure globale des différents mécanismes de défenses : la capacité anti-oxydante globale

Toutes ces techniques ne permettent néanmoins que d'évaluer une partie de la cascade oxydative au sein de l'organisme et/ou présentent un problème d'accessibilité et de coût. Il est dès lors intéressant de disposer de méthodes permettant d'évaluer de manière plus globale la capacité anti-oxydante totale d'un échantillon biologique. Dans un tube à essai, un système générant des ERO est mis en contact avec une cible (acide gras, sonde fluorescente) dont la destruction oxydative est suivie en fonction du temps par spectrophotométrie ou luminescence. Si cette réaction est réalisée en présence d'un échantillon de plasma, les antioxydants présents dans celui-ci vont interagir avec les ERO, et ce n'est qu'après leur consommation complète, que l'oxydation de la cible pourra démarrer. Le temps de latence (temps avant le démarrage de l'oxydation) sera donc directement proportionnel à la quantité d'antioxydants présents dans l'échantillon plasmatique.

Schéma synaptique du test Randox®

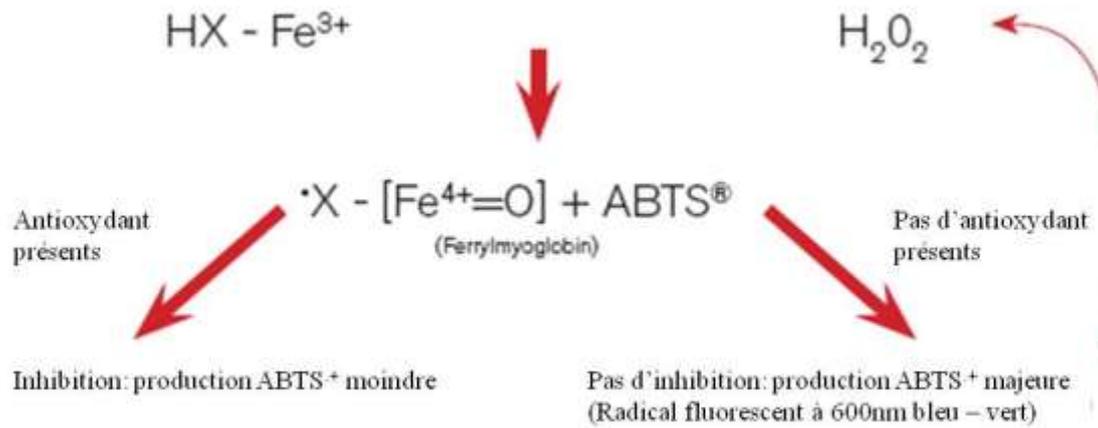
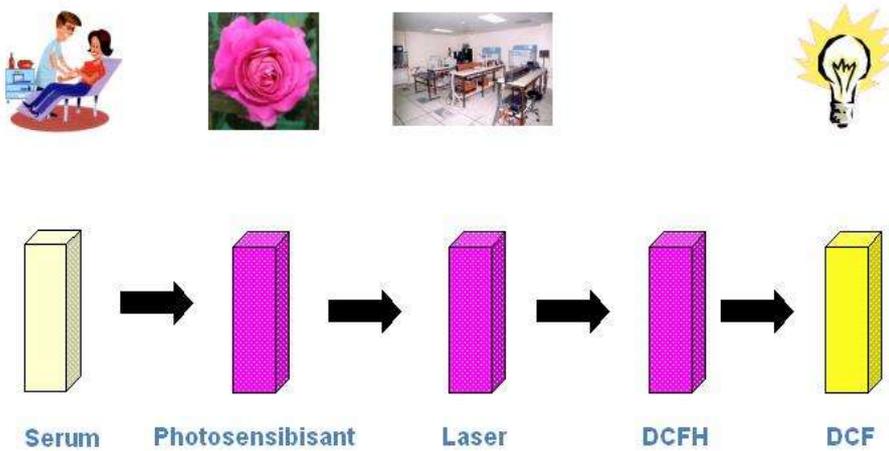


Schéma synaptique du test Patrol®



Demi-vies respectives des différentes espèces radicalaires dérivées de l'O₂

Nom	Demi-vie (37°C)
Radical superoxyde	Enzymatique*
Radical hydroxyl	10-9s
Monoxyde d'azote	1 à 10 s
Peroxyde d'hydrogène	Enzymatique
Peroxynitrite	0,05 à 1 s

* Les demi-vies du radical superoxyde et du peroxyde d'hydrogène varient en fonction de l'activité enzymatique assurant leur métabolisme. D'après Fontaine [6].

Critères de définition du SRIS d'après Bone [59]

Ce syndrome est caractérisé par la présence d'au moins deux des signes suivants :

- Une température corporelle >38°C ou <36°C,
- Une fréquence cardiaque > 90 battements par minute,
- Une fréquence respiratoire >20/min ou hyperventilation se traduisant par une PaCO₂ < 32mmHg (<4.3kPa) en air ambiant,

Une leucocytose >12000/mm³ ou < 4000/mm³ ou > 10% de cellules immatures

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Butler J, Rucker GM, and Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Annals Thoracic Surgery* 1993; 55: 552-9.
2. Christen S, Finckh B, Lykkesfeldt J, et al. Oxidative stress precedes peak systemic inflammatory response in pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass operation. *Free Radical Biology and Medicine* 2005; 38: 1323-32.
3. Hampton MB, Kettle AJ, and Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998; 92: 3007-17.
4. Wachtfogel Y, Kucich U, Greenplate J, et al. Human neutrophil degranulation during extracorporeal circulation. *Blood* 1987; 69: 324-30.
5. Kloner R, Przyklenk K, and Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation* 1989; 80: 1115-27.
6. Fontaine E. Radicaux libres. In: Cano N, Barnoud, D. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Paris: Springerlink 2007; 252.
7. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology* 1956; 11: 298-300.
8. Biasutti MA, Posadaz A, and Garcia NA. A comparative kinetic study on the singlet molecular oxygen-mediated photooxidation of alpha- and beta-chymotrypsins. *Journal Peptide Research* 2003; 62: 11-8.
9. Stocker P, Lesgards J-F, Vidal N, et al. ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochimica and Biophysica Acta* 2003; 1621: 1-8.
10. Olivier D, Douillard S, Lhommeau I, et al. Secondary oxidants in human serum exposed to singlet oxygen: the influence of hemolysis. *Photochemical Photobiology Science* 2009; 8: 1476-86.
11. De Backer WA, Amsel B, Jorens PG, et al. N-acetylcysteine pretreatment of cardiac surgery patients influences plasma neutrophil elastase and neutrophil influx in bronchoalveolar lavage fluid. *Intensive Care Medicine* 1996; 22: 900-8.

12. Karu I, Taal Gn, Zilmer K, et al. Inflammatory/oxidative stress during the first week after different types of cardiac surgery. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 2010; 44: 119-24.
13. Toivonen HJ and Ahotupa M. Free radical reaction products and antioxidant capacity in arterial plasma during coronary artery bypass grafting. *Journal Thoracic Cardiovascular Surgery* 1994; 108: 140-7.
14. Luyten CR, van Overveld FJ, De Backer LA, et al. Antioxidant defence during cardiopulmonary bypass surgery. *European Journal Cardiothoracic Surgery* 2005; 27: 611-6.
15. Berg K, Haaverstad R, Astudillo R, et al. Oxidative stress during coronary artery bypass operations: Importance of surgical trauma and drug treatment. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 2006; 40: 291-7.
16. Kunt AS, Selek S, Celik H, et al. Decrease of total antioxidant capacity during coronary artery bypass surgery. *Mont Sinai Journal Medicine* 2006; 73: 777-83.
17. Lases EC, Duurkens VAM, Gerritsen WBM, et al. Oxidative stress after lung resection therapy. *Chest* 2000; 117: 999-1003.
18. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 1993; 84: 407-12.
19. Prior RL and Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology Medicine* 1999; 27: 1173-81.
20. Redmond RW and Gamlin JN. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemical Photobiology* 1999; 70: 391-475.
21. Belboul AA-KNEC. The effect of hyperoxia during cardio-pulmonary bypass on blood cell rheology and postoperative morbidity associated with cardiac surgery. *Journal of Extracorporeal Technology* 1991; 2: 43-7.
22. Murry C, Jennings R, and Reimer K. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-36.
23. Aniya Y and Naito A. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochemical Pharmacology* 1993; 45: 37-42.

24. Hadjinikolaou L, Alexiou C, Cohen AS, et al. Early changes in plasma antioxidant and lipid peroxidation levels following coronary artery bypass surgery: a complex response. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2003; 23: 969-75.
25. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, et al. Status of myocardial antioxidants in ischemia reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 2000; 47: 446-56.
26. Ansley DM, Sun J, Visser WA, et al. High dose propofol enhances red cell antioxidant capacity during CPB in humans. *Canadian Journal Anesthesia* 1999; 46: 641-8.
27. Kahraman S and Demiryurek AT. Propofol is a peroxynitrite scavenger. *Anesthesia Analgesia* 1997; 84: 1127-9.
28. Bloom HL, Shukrullah I, Veledar E, et al. Statins decrease oxidative stress and ICD therapies. *Cardiology Research and Practice* 2010; 2010: 253803.
29. Poyrazoglu OK, Dogukan A, Yalniz M, et al. Acute effect of standard heparin versus low molecular weight heparin on oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *Renal Failure* 2006; 28: 723-7.
30. De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, et al. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology* 2004; 101: 299-310.
31. Goudeau J-J, Clermont GI, Guillery O, et al. In high-risk patients, combination of antiinflammatory procedures during cardiopulmonary bypass can reduce incidences of inflammation and oxidative stress. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2007; 49: 39-45.
32. Angdin M, Settergren G, Starkopf J, et al. Protective effect of antioxidants on pulmonary endothelial function after cardiopulmonary bypass. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 2003; 17: 314-20.
33. Gino AK, Phil M, and Jose P. Antioxidant status of South Indian patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: A role of intra operative magnesium supplementation. *International journal of cardiology* 2008; 128: 139-41.
34. Huang H, Yin R, Zhu J, et al. Protective effects of melatonin and N-Acetylcysteine on hepatic injury in a rat cardiopulmonary bypass model. *Journal of Surgical Research* 2007; 142: 153-61.

35. Piot C, Croisille P, Staat P, et al. Effect of Cyclosporine on Reperfusion Injury in Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine* 2008; 359: 473-81.
36. Mewton N, Croisille P, Gahide G, et al. Effect of Cyclosporine on Left Ventricular Remodeling After Reperfused Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2010; 55: 1200-5.
37. Cope DK, Impastato KW, Cohen MV, et al. Volatile Anesthetics Protect the Ischemic Rabbit Myocardium from Infarction. *Anesthesiology* 1997; 86: 699-709.
38. Clermont GI, Vergely C, Jazayeri Sd, et al. Systemic free radical activation is a major event involved in myocardial oxidative stress related to cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2002; 96: 80-7.
39. Alonso de Vega JM, Diaz J, Serrano E, et al. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Critical Care Medicine* 2002; 30: 1782-6.
40. Sisto T, Paajanen H, Metsa-Ketela T, et al. Pretreatment with antioxidants and allopurinol diminishes cardiac onset events in coronary artery bypass grafting. *Annals Thoracic Surgery* 1995; 59: 1519-23.
41. Sucu N, Cinel I, Unlu A, et al. N-acetylcysteine for preventing pump-induced oxidoinflammatory response during cardiopulmonary bypass. *Surgery Today* 2004; 34: 237-42.
42. Ramlawi B, Otu H, Mieno S, et al. Oxidative stress and atrial fibrillation after cardiac surgery: A case-control study. *Annals Thoracic Surgery* 2007; 84: 1166-73.
43. Biomarqueurs / scores en chirurgie cardio vasculaire. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 2009; 28: S109-S12.
44. Davies S, Duffy J, Wickens D, et al. Time-course of free radical activity during coronary artery operations with cardiopulmonary bypass. *Journal Thoracic Cardiovascular Surgery* 1993; 105: 979-87.
45. Kedziora-Kornatowska K, Bartosz M, Mussur M, et al. The total antioxidant capacity of blood plasma during cardiovascular bypass surgery in patients with coronary heart disease. *Cellular Molecular Biology Letters* 2003; 8: 973-7.

46. Krafte-Jacobs B. Effect of non-pulsatile renal blood flow on plasma erythropoietin. *American Journal of Hematology* 1998; 57: 144-7.
47. Aufricht C, Ties M, Salzer-Muhar U, et al. Erythropoietin, erythropoiesis and iron status in children after major surgical stress. *European Journal Pediatrics* 1995; 154: 458-61.
48. Bertinieri G, Parati G, Ulian L, et al. Hemodilution reduces clinic and ambulatory blood pressure in polycythemic patients. *Hypertension* 1998; 31: 848-53.
49. Franchini KG. Influence of hemodilution on the renal blood flow autoregulation during acute expansion in rats. *American Journal Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 1999; 277: R1662-74.
50. Groom RC. High or low hematocrits during cardiopulmonary bypass for patients undergoing coronary artery bypass graft surgery? An evidence-based approach to the question. *Perfusion* 2002; 17: 99-102.
51. Cao G and Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 1998; 44: 1309-15.
52. Bartosz G. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radic Res* 2010; 0: 1-10.
53. Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, et al. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry* 1997; 43: 562-8.
54. Mecozzi G, Milano AD, Carlo MD, et al. Intravascular hemolysis in patients with new-generation prosthetic heart valves: A prospective study. *Journal Thoracic Cardiovascular Surgery* 2002; 123: 550-6.
55. Modun D, Music I, Vukovic J, et al. The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols. *Atherosclerosis* 2008; 197: 250-6.
56. Evangelia D, Eleni P, Areti M, et al. Oxidative Stress Is Progressively Enhanced With Advancing Stages of CKD. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2006; 48: 752-60.
57. Fukanaga K. A simple, rapid, highly sensitive and reproducible quantification method for plasma malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* 1998; 12: 300-3.

58. Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Annals Neurology* 1993; 34: 609-16.
59. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101: 1644-55.

Travaux publiés dans le cadre de ces recherches :

Communications aux congrès internationaux :

Lascarrou JB, Rozec B, Fleury C, Patrice T, Blanloeil Y. New Oxidative Stress Evaluation Method To Compare Cardiopulmonary Bypass and Thoracic Surgery. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting 2010.

Rozec B, Lascarrou JB, Cinotti R, Douillard S, Patrice T, Blanloeil Y. Evaluation of a new measurement method of Total Antioxidant Status: comparison with the Randox method. ESICM Annual Meeting 2010.

Communications aux congrès nationaux :

Lascarrou JB, Rozec B, Fleury C, Douillard S, Pajot S, Patrice T, Blanloeil Y.
[Comparaison des modifications du pouvoir anti-oxydant sérique total au cours des pontages aorto-coronariens et des remplacements valvulaires aortique sous CEC]
Congrès de la SFAR 2010.

Lascarrou JB, Rozec B, Perigaud C, Douillard S, Pajot S, Patrice T, Blanloeil Y.
[Evaluation d'une nouvelle méthode de dosage du pouvoir anti-oxydant sérique total au cours de chirurgies cardiaques avec circulation extracorporelle et de la chirurgie pulmonaire] Congrès de la SFAR 2009.

NOM : LASCARROU

PRENOM : JEAN BAPTISTE

Comparaison de deux méthodes de dosage de la capacité anti-oxydante totale du sérum au cours de la chirurgie thoracique.

RESUME

Nous avons comparé l'évolution de la capacité anti-oxydante totale (CAT) au cours de la chirurgie thoracique avec ou sans circulation extracorporelle grâce à deux méthodes de dosage : le Randox® et le Patrol®. Mesurée par la méthode Patrol®, la CAT diminue significativement après la cardioplégie et la mise en place de la circulation extracorporelle pour se normaliser rapidement dès la 24^{ème} heure post opératoire. La CAT ne varie pas au cours de la chirurgie thoracique sous circulation extracorporelle mesurée par la méthode Randox®. La méthode de dosage Patrol® est fiable, reproductible et rapide de réalisation permettant son utilisation pour une mesure de la CAT lors de l'évaluation de thérapeutiques anti-oxydantes.

MOTS-CLES

STRESS OXYDANT, CHIRURGIE CARDIAQUE, CHIRURGIE THORACIQUE, CIRCULATION EXTRACORPORELLE, ESPECES RADICALAIRES OXYGENE,