

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

E.A. 3072 « Mitochondrie, Stress Oxydant et Protection musculaire »

THÈSE présentée par :

Eric NOLL

soutenue le : **24 Février 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Recherche clinique et innovation technologique

Physiologie et Biologie des Organismes, Population Interactions

**ISCHEMIE-REPERFUSION MUSCULAIRE SQUELETTIQUE
EXPERIMENTALE : PLACE DE LA LACTATEMIE CAPILLAIRE DANS LE
MONITORAGE DE LA REPERFUSION ET TRANSPOSITION AU MODELE
INTESTINAL**

THÈSE dirigée par :

Pr GENY Bernard
Pr DIEMUNSCH Pierre

PUPH, Université de Strasbourg
PUPH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr SAMAIN Emmanuel
Pr BELOUCIF Sadek

PUPH, Université de Franche-Comté
PUPH, Assistance Publique Hôpitaux de Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr ANDRES Emmanuel
Pr MALINOVSKY Jean-Marc

PUPH, Université de Strasbourg
PUPH, Université de Reims Champagne Ardenne

INVITÉS :

Pr MERTES Paul-Michel

PUPH, Université de Strasbourg

Remerciements

A mon épouse Mélanie, mon fil conducteur.

A nos enfants Lucie et Alexandre, pour le bonheur quotidien qu'ils nous apportent.

A mes parents et ma sœur pour leur soutien.

Au Professeur Pierre Diemunsch pour son enseignement, son enthousiasme de la connaissance scientifique et sa bienveillance permanente.

Au Professeur Bernard Geny pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir fait bénéficier de ses conseils et de son enseignement.

Au Dr Michele Diana pour son talent chirurgical.

Au Dr Anne-Laure Charles pour son aide et sa gentillesse constante.

Au Pr Julien Pottecher pour ses conseils stratégiques et son aide méthodologique.

Au Dr Joffrey Zoll pour ses conseils expérimentés.

A François Singh, Fabienne Goupilleau et Isabelle Bentz pour leur aide enthousiaste et efficace.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	2
TABLE DES MATIERES.....	3
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ISSUES DE CETTE THESE.....	7
RESUME.....	8
ABSTRACT	10
ABREVIATIONS	12
TABLE DES ILLUSTRATIONS	14
INTRODUCTION GENERALE.....	16
1. LE MUSCLE SQUELETTIQUE ET SON FONCTIONNEMENT METABOLIQUE	17
1.1. SYSTEMATISATION DE L'APPAREIL CONTRACTILE	17
1.2. BIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE	18
1.3. CLASSIFICATION DES FIBRES MUSCULAIRES STRIEES SQUELETTIQUES	20
1.3.1. LES FIBRES DE TYPE I	21
1.3.2. LES FIBRES DE TYPE II.....	21
1.4. LES DIFFERENTS PHENOTYPES METABOLIQUES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES.....	21
1.4.1. LA GLYCOLYSE.....	21
1.4.2. LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE	21
1.5. LA PHYSIOLOGIE MITOCHONDRIALE MUSCULAIRE	22
1.5.1. STRUCTURE MITOCHONDRIALE	22
1.5.2. ORGANISATION MITOCHONDRIALE CELLULAIRE.....	23
1.5.3. LA CHAINE DE TRANSPORT DES ELECTRONS	24
1.5.4. LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE	24
1.5.5. LA GENESE MITOCHONDRIALE DE STRESS OXYDANT.....	25
2. L'ISCHEMIE-REPERFUSION ET SES CONSEQUENCES MUSCULAIRES.....	26
2.1. DEFINITION DE L'ISCHEMIE	26
2.2. PHENOMENES MOLECULAIRES ASSOCIES A L'ISCHEMIE	26
2.3. DEFINITION DE LA REPERFUSION	27
2.4. PHENOMENES MOLECULAIRES ASSOCIES A LA REPERFUSION	27
2.5. MONITORAGE BIOLOGIQUE DE LA PERFUSION TISSULAIRE.....	27
2.5.1. LES MARQUEURS D'INFLAMMATION ET D'ATHEROME	29
2.5.2. LES MARQUEURS DE STRESS OXYDANT.....	29
2.5.3. LES MARQUEURS DE REMODELAGE VASCULAIRE	29

3. LE LACTATE	30
3.1. METABOLISME DU LACTATE.....	30
3.1.1. VOIES DE FORMATION DU LACTATE	31
3.1.2. ELIMINATION DU LACTATE	33
3.2. ROLE DU LACTATE DANS LES DIFFERENTS TYPES DE METABOLISME TISSULAIRE.....	34
3.2.1. LACTATE ET MUSCLE SQUELETTIQUE	34
3.2.2. LACTATE ET MYOCARDE	34
3.2.3. LACTATE ET FOIE	35
3.2.4. LACTATE ET CERVEAU	36
3.2.5. LACTATE ET REIN.....	36
3.2.6. LACTATE ET PLACENTA	36
3.3. PLACE ACTUELLE DU DOSAGE DE LACTATE POUR DETECTER UNE HYPOXIE TISSULAIRE EN CLINIQUE	37
3.3.1. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPERLACTATEMIE LORS D'UNE HYPOXIE TISSULAIRE	37
3.3.2. PERTINENCE CLINIQUE ACTUELLE DE LA LACTATEMIE POUR LA PRISE EN CHARGE DES HYPOXIES TISSULAIRES	40
3.4. DOSAGE CAPILLAIRE DU LACTATE	45
MATERIELS ET METHODES	47
1. MODELES EXPERIMENTAUX UTILISES	48
1.1. ANIMAUX.....	48
1.1.1. MODÈLE MURIN.....	48
1.1.2. MODÈLE PORCIN	48
1.2. PROTOCOLES ANESTHÉSQUES.....	48
1.2.1. MODÈLE MURIN.....	48
1.2.2. MODÈLE PORCIN	48
1.3. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	49
1.3.1. ISCHÉMIE-REPERFUSION EXPÉRIMENTALE DE MEMBRE ET MONITORAGE DE LA REPERFUSION MUSCULAIRE PAR LACTATÉMIE CAPILLAIRE (PROTOCOLE 1)	49
1.3.2. CHOC HÉMORRAGIQUE ET MONITORAGE DE L'HYPOPERFUSION MUSCULAIRE PAR LA LACTATÉMIE (ETUDE HEMOCHOC, PROTOCOLE 2)	49
1.3.3. ISCHÉMIE INTESTINALE EXPÉRIMENTALE ET LACTATÉMIE CAPILLAIRE TISSULAIRE (PROTOCOLES 3, 4).....	50
2. TECHNIQUES ANALYTIQUES	50
2.1. ETUDE EXTEMPORANEE DU FONCTIONNEMENT DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE PAR METHODE OXYGRAPHIQUE.....	50
2.1.1. SOLUTIONS.....	50

2.1.2. <i>PREPARATION TISSULAIRE</i>	50
2.1.3. <i>PROTOCOLES D'ETUDE DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE</i>	51
2.2. <i>ÉTUDE DE LA PRODUCTION TISSULAIRE ET SANGUINE DE STRESS OXYDANT (ROS) PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE</i>	52
2.2.1. <i>SOLUTIONS</i>	52
2.2.2. <i>TECHNIQUES DE MESURE</i>	52
2.2.3. <i>ÉTUDE DE LA CONCENTRATION TISSULAIRE EN METABOLITES EN SPECTROSCOPIE PAR RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE A ANGLE MAGIQUE HAUTE RESOLUTION</i>	53
2.2.4. <i>ETUDE DE LA CONCENTRATION EN LACTATE CAPILLAIRE</i>	54
RESULTATS	55
1. PROTOCOLE 1 : ISCHEMIE-REPERFUSION DE MEMBRE EXPERIMENTALE ET MONITORAGE DE LA REPERFUSION MUSCULAIRE PAR LACTATEMIE CAPILLAIRE	56
2. PROTOCOLE 2 : CHOC HEMORRAGIQUE ET MONITORAGE DE L'HYPOPERFUSION MUSCULAIRE PAR LA LACTATEMIE (ETUDE HEMOCHOC)	57
3. PROTOCOLE 3 : ISCHEMIE INTESTINALE EXPERIMENTALE ET LACTATEMIE CAPILLAIRE TISSULAIRE	58
4. PROTOCOLE 4 : DUREE DE L'ISCHEMIE INTESTINALE EXPERIMENTALE ET LACTATEMIE CAPILLAIRE TISSULAIRE	59
DISCUSSION GENERALE	60
1. ISCHEMIE-REPERFUSION DE MEMBRE ET MONITORAGE DE LA REPERFUSION MUSCULAIRE PAR LACTATEMIE CAPILLAIRE	61
1.1. <i>ÉTUDE PILOTE</i>	62
1.1.1. <i>CHOIX DU MODELE</i>	62
1.1.2. <i>INTENSITE DE LA LESION ISCHEMIQUE</i>	62
1.1.3. <i>LACTATEMIES CAPILLAIRES LOCALE ET SYSTEMIQUE</i>	63
1.2. <i>ÉTUDE CLINIQUE</i>	67
2. CHOC HEMORRAGIQUE ET MONITORAGE DE L'HYPOPERFUSION MUSCULAIRE PAR LA LACTATEMIE (ETUDE HEMOCHOC)	69
2.1. <i>CHOIX DU MODELE</i>	69
2.2. <i>INTENSITE DE L'ATTEINTE MITOCHONDRIALE MUSCULAIRE</i>	70
2.3. <i>INTENSITE DU STRESS OXYDANT</i>	71
2.4. <i>LACTATEMIES SYSTEMIQUE ET MUSCULAIRE</i>	72
2.4.1. <i>LACTATEMIE SYSTEMIQUE SUR SANG CAPILLAIRE</i>	72
2.4.2. <i>LACTATEMIE MUSCULAIRE</i>	74

2.4.3. CREATININEMIE ET PHOSPHOCREATININEMIE MUSCULAIRES.....	76
3. ISCHEMIE-REPERFUSION INTESTINALE ET MONITORAGE DE LA PERFUSION	
MUQUEUSE PAR LACTATEMIE CAPILLAIRE.....	79
3.1. CHOIX DU MODELE	79
3.2. DOSAGE CAPILLAIRE DU TAUX DE LACTATE AUX NIVEAUX INTESTINAL ET SYSTEMIQUE	80
3.3. TAUX DE LACTATE INTESTINAL PAR SPECTROMETRIE RMN	80
3.4. INTENSITE DE L'ATTEINTE MITOCHONDRIALE INTESTINALE.....	81
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	83
BIBLIOGRAPHIE	85
ANNEXES	94

Liste des publications et communications issues de cette thèse

Articles originaux :

1. Local but not systemic capillary lactate is a reperfusion biomarker in experimental acute limb ischaemia. Noll E, Bouitbir J, Collange O, Zoll J, Charles AL, Thaveau F, Diemunsch P, Geny B. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012;43:339-40.
2. Enhanced-Reality Video Fluorescence: A Real-Time Assessment of Intestinal Viability. Diana M, Noll E, Diemunsch P, Dallemagne B, Benahmed MA, Agnus V, Soler L, Barry B, Namer IJ, Demartines N, Charles AL, Geny B, Marescaux J. *Ann Surg*. 2014 Apr;259(4):700-7.
3. Metabolism-Guided Bowel Resection: Potential Role and Accuracy of Instant Capillary Lactates to Identify the Optimal Resection Site. Diana M, Noll E, Diemunsch P, Moussallieh F-M, Namer I-J, Charles A-L, Lindner V, Agnus V, Geny B, Marescaux J: Metabolism-Guided Bowel Resection: Potential Role and Accuracy of Instant Capillary Lactates to Identify the Optimal Resection Site. *Surg Innov* 2015; 22:453–61

Article soumis :

1. Comparative analysis of human serum albumin and 130/0.4 HES resuscitation on skeletal muscle metabolic profile during experimental hemorrhagic shock in swine. Noll E, Diana M, Charles AL, Singh F, Gan TJ, Pottecher J, Moussallieh FM, Namer IJ, Geny B, Diemunsch P. Soumis à *l'European Journal of Anesthesia*.

Communications orales et affichées :

1. Société Française d'Anesthésie Réanimation Septembre 2010 : La lactatémie capillaire in situ est un marqueur de l'ischémie-reperfusion d'un membre. Noll E, Collange O, Diemunsch P, Pottecher T, Zoll J, Geny B
2. ASA Annual Meeting Chicago October 15-19 2011: Correlation between Two Capillary Lactate Measurement Devices and the Delta Pulse Pressure: Preliminary Evaluation in the Setting of an Experimental Haemorrhagic Shock. Noll E, Pottecher J, Fischer F, Collange O, Geny B, Diemunsch P.

RESUME

I. Introduction

Le **muscle squelettique** est le tissu quantitativement le plus important du corps humain. Il peut être agressé par des mécanismes **d'ischémie-reperfusion (IR)** que ce soit :

- par une insuffisance circulatoire locale telle qu'une oblitération de l'arbre artériel comme dans l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs ou globale par défaillance de l'éjection myocardique comme dans le choc hémorragique,
- par des manipulations chirurgicales telles que les clampages artériels pour chirurgie vasculaire(1) ou l'utilisation de garrots de membres pour la chirurgie orthopédique(2).

Cette double agression que constituent l'ischémie puis la reperfusion sur le muscle squelettique est responsable de cascades physiopathologiques médiées notamment par l'inflammation(3) et le stress oxydant. L'organelle responsable de la production énergétique musculaire : la mitochondrie constitue une cible critique pour les effets délétères liés à l'IR. En effet, la dysfonction mitochondriale va induire une baisse de la production énergétique tissulaire mais également une amplification des mécanismes lésionnels oxydatifs(4). En situation physiologique, la mitochondrie exerce une action régulatrice sur les espèces réactives de l'oxygène en modulant leur production et leur élimination(5). L'étude de la dysfonction mitochondriale musculaire est donc essentielle pour évaluer finement l'intensité d'une agression ischémique ou l'efficacité d'une thérapeutique protectrice des lésions d'IR, qu'elle soit pharmacologique ou chirurgicale.

Notre équipe avait déjà montré que :

1. Plus que l'ischémie, la reperfusion est responsable d'une part importante des atteintes tissulaires, en particulier mitochondriales. L'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale est altérée au décours de la restauration d'une perfusion hémodynamiquement efficace.
2. La modulation des conditions de restauration d'une perfusion efficace par les techniques de post conditionnement ischémique, par exemple, peut permettre de limiter la dysfonction mitochondriale musculaire.

Cependant il reste difficile, sur le plan expérimental comme clinique, d'établir avec précision et de manière non invasive la qualité de la restauration d'une perfusion tissulaire.

L'étude du **lactate**, sel de l'acide lactique, présente de multiples intérêts potentiels dans ce contexte. Il est produit en quantité dans le cytosol du muscle squelettique en situation de prédominance du métabolisme glycolytique anaérobie. L'ischémie aiguë est responsable d'hypoxie musculaire, ce qui induit une conversion métabolique vers les voies anaérobies(6). Le dosage, en temps réel, du lactate dans un compartiment soumis à une IR pourrait permettre d'améliorer l'étude des modèles expérimentaux ainsi que la qualité de la prise en charge clinique des situations d'hypoperfusion tissulaire.

II. Objectifs

Les objectifs de ce travail étaient :

1. Évaluer la place de la lactatémie capillaire comme dispositif de monitoring de l'ischémie et de la reperfusion tissulaire.
2. Comparer le suivi local du taux de lactate, au niveau du compartiment ischémié, par rapport au taux systémique du lactate lors des ischémies compartimentales telles que l'ischémie de membre ou l'ischémie intestinale ainsi que durant le choc hémorragique.

III. Synthèse des résultats

1. Lactatémie locale *versus* lactatémie systémique dans l'ischémie de membre

Dans un modèle expérimental murin d'ischémie-reperfusion de membre par garrot, l'augmentation de la lactatémie capillaire dans la patte ischémisée permet de confirmer la présence d'un métabolisme anaérobie en rapport avec une ischémie. De la même manière, sa décroissance après levée du garrot traduit la reprise d'un métabolisme aérobie correspondant à une reperfusion efficace. De manière intéressante, l'augmentation réversible de la lactatémie capillaire de membre ne s'accompagne pas d'une modification de la lactatémie systémique.

Le **dosage compartimental du lactate** pourrait donc permettre un **monitorage en temps réel de l'efficacité d'une reperfusion d'un territoire ischémié** que ce soit au laboratoire ou en clinique humaine. En revanche, la mesure du taux de lactate systémique ne permet pas ce monitoring.

2. Lactatémie capillaire et ischémie intestinale

Dans un modèle expérimental porcin d'ischémie intestinale, les segments intestinaux présentant une atteinte ischémique montraient une augmentation du taux de lactate capillaire local. Le dosage capillaire local du lactate au niveau intestinal pourrait aider à identifier les zones de résection optimales lors d'une chirurgie avec ischémie intestinale.

3. Lactatémie capillaire et choc hémorragique

Dans un modèle de choc hémorragique pré-clinique secondairement réanimé, l'augmentation de la lactatémie capillaire systémique durant la période de choc n'est pas accompagnée d'une augmentation du taux de lactate intramusculaire ni d'une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

La lactatémie capillaire systémique ne semble donc pas représenter une méthode fiable d'évaluation du degré de souffrance musculaire squelettique au cours d'une hypoperfusion tissulaire globale consécutive à un choc hémorragique.

IV. Conclusions

La mesure capillaire du taux de lactate en situation d'ischémie-reperfusion pourrait permettre:

1. d'affirmer l'existence d'une ischémie tissulaire régionale. En revanche, le taux systémique du lactate ne permet pas d'établir ce diagnostic,
2. de confirmer l'efficacité d'une reperfusion au niveau d'un membre préalablement ischémique tandis que la mesure systémique des lactates ne le permet pas. L'affirmation de l'efficacité de la reperfusion et de sa constance, par une mesure aussi simple que la lactatémie capillaire compartimentale représente une avancée majeure en comparaison avec les autres méthodes existantes.

La mesure capillaire du taux de lactate systémique dans une situation d'hypoperfusion par choc hémorragique n'est pas associée à une dysfonction mitochondriale ou une augmentation du taux de lactate intra-musculaire. D'autres hypothèses pourraient donc être explorées pour déterminer l'origine de l'hyperlactatémie dans cette situation.

ABSTRACT

I. Introduction

Skeletal muscle is quantitatively a major compound of human body.

It can be exposed to ischemia and reperfusion (IR) insults like:

- Circulatory failure: caused by regional vascular supply impairment or global hypo perfusion like hemorrhagic shock.
- Surgical manipulation like arterial clamping (1) or tourniquet inflation (2).

The dual insult caused by ischemia and reperfusion on skeletal muscle is responsible for pathophysiological pathway involving inflammation and oxidative stress. Mitochondrion, the organelle involved in energy supply is a critical target for IR insults. Being highly involved in oxidative stress managing during physiological conditions, mitochondrial failure induces a decrease in energy supply but also an increase in oxidative stress damages.

The study of mitochondrial dysfunction appears to be essential for the assessment of an ischemic insult and a protective strategy.

Our group has already described that:

1. More than ischemia, reperfusion is responsible for a major part in tissular insult particularly mitochondria. Mitochondrial respiratory chain can be impaired during reperfusion of skeletal muscle.
2. Skeletal muscle mitochondria protection can be obtained with modulation of the reflow procedure called post conditioning.

However it remains challenging on both experimental and clinical field to precisely assess skeletal muscle perfusion quality without being highly invasive.

Lactate presents several interests in this context. It is highly produce in skeletal muscle in cases of glycolytic anaerobic metabolism. Skeletal muscle ischemia induced anaerobic only metabolism. Real time assessment of regional lactate in case of IR could improve experimental study and clinical car of tissular hypo perfusion.

II. Objectives

Our objectives were:

1. Assessment of capillary lactate for tissue ischemia and reperfusion monitoring.
2. Compare the local and systemic capillary lactate time course during compartmental ischemia insults like limb ischemia, intestinal ischemia or during hemorrhagic shock.

III. Results

1. Local lactatemia versus systemic lactatemia during acute limb ischemia

In a rodent experimental model of acute limb IR, the increase in limb capillary lactate could help in assessing the ongoing anaerobic metabolism. Similarly, its decrease after tourniquet deflation could help in assessing efficient reperfusion. Local capillary lactate increase was not associated with an increase in systemic capillary lactate during limb ischemia.

Compartmental capillary lactate could allow for real time monitoring of the reperfusion efficiency of an ischemic compartment, in the laboratory and the clinical field.

2. Capillary lactatemia during intestinal ischemia

In an experimental model of intestinal ischemia, bowel segments presenting ischemic insult showed an increase in local capillary lactate. Local capillary lactate could be of interest for bowel resection optimization during intestinal ischemia surgery.

3. Hemorrhagic shock

In a pre clinical model of treated acute hemorrhagic shock, the increase in systemic capillary lactate was not associated with an impairment of the skeletal muscle mitochondrial respiratory chain or intramuscular lactate increase. Capillary lactate does not seem to be a suitable tool for assessing skeletal muscle insult during global tissular hypo perfusion like hemorrhagic shock.

IV. Conclusions

The capillary measurement of the lactate in IR could be interesting for:

- Assessing a limb or intestinal tissue ischemia. On the opposite, the systemic measurement could not assess this diagnosis.
- Assessing the efficiency of a limb reperfusion. On the opposite, the systemic measurement could not assess this diagnosis.

The systemic capillary lactate measurement during hemorrhagic shock related hypo perfusion could not be associated with an increase in intra muscular lactate. Further research is needed to confirm the origin of hyperlactatemia during hemorrhagic shock.

ABREVIATIONS

AcylCoA : acyl-coenzyme A
AcétylCoA : acétyl-coenzyme A
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
ALAT : alanine aminotransférase
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ANT : adénine nucléotide translocase
AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs
ATP : adénosine triphosphate
CMH : cyclic 3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine
Cr : créatine
CRM : chaîne respiratoire mitochondriale
Crn : créatinine
CRP : protéine C réactive
FADH₂ : flavine adénine dinucléotide
GLUT : transporteur transmembranaire du glucose
HES : hydroxyéthylamidon
IC : index cardiaque
IPS : index de pression systolique
IR : ischémie-reperfusion
IRM : imagerie par résonnance magnétique
LDH : lactate déshydrogénase
MCT : transporteur transmembranaire monocarboxylate couplé au proton
Mi-CK : créatine kinase mitochondriale
mmHg : millimètre de mercure
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : forme réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide
PAM : pression artérielle moyenne
PRI : projet de recherche interne
PCr : phosphocréatine
PVC : pression veineuse centrale
PDH : pyruvate déshydrogénase
ROS : dérivés réactifs de l'oxygène
RMN : résonnance magnétique nucléaire
RPE : résonnance paramagnétique électronique
SMCT : transporteur transmembranaire monocarboxylate couplé au sodium
UCP : uncoupling proteins

VDAC : voltage dependent anion channel

VEGF : vascular endothelial growth factor

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1 : Organisation histologique du muscle squelettique</i>	17
<i>Figure 2 : Organisation de l'unité contractile musculaire striée</i>	18
<i>Figure 3 : Composition protéique d'un sarcomère</i>	19
<i>Figure 4 : Mécanique moléculaire de la contraction musculaire</i>	20
<i>Figure 5 : Typage histologique des fibres musculaires squelettique</i>	20
<i>Figure 6 : Le cycle de Krebs</i>	22
<i>Figure 7 : Schématisation de la structure mitochondriale</i>	23
<i>Figure 8 : Chaîne mitochondriale de transport des électrons</i>	24
<i>Figure 9 : Production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale</i>	25
<i>Figure 10 : Nature et proportions des éléments limitant l'utilisation de l'IPS</i>	28
<i>Figure 11 : Exemples de résultats d'examen radiographique d'imagerie vasculaire périphérique</i>	28
<i>Figure 12 : Schématisation semi-développée de l'ion lactate</i>	30
<i>Figure 13 : Schématisation de la réaction d'oxydo-réduction entre pyruvate et lactate catalysée par l'enzyme lactate déshydrogénase</i>	31
<i>Figure 14 : Schématisation de la production de lactate à partir de la L-alanine</i>	31
<i>Figure 15 : Interaction entre l'action de la lactate déshydrogénase et la glycolyse</i>	32
<i>Figure 16 : Régulation de la glycolyse par l'inhibition de la phosphofructokinase liée à la concentration en ATP et proton (H⁺)</i>	33
<i>Figure 17 : Evolution de la captation hépatique de lactate en fonction du pH intracellulaire (pHi) sur un modèle murin de foie perfusé</i>	35
<i>Figure 18 : Métabolisme du lactate systématisé par organe</i>	36
<i>Figure 19 : Couplage entre délivrance et consommation d'oxygène par l'organisme</i>	38
<i>Figure 20 : Filière énergétique liée à l'activation de l'échangeur transmembranaire Na/K</i>	39
<i>Figure 21 : Concentration en lactate chez 12 patients en choc septique durant 24 heures</i>	40
<i>Figure 22 : Aire sous la courbe (AUC) du taux de lactate systémique en fonction du temps</i>	41
<i>Figure 23 : Taux d'infection (barres blanches) et de mortalité (barres grises) en fonction de la durée d'hypoperfusion occulte</i>	42
<i>Figure 24 : Proportion de mortalité en fonction du taux de lactate initial (A) ou de la clairance du lactate (B)</i>	43
<i>Figure 25 : Corrélation entre les mesures séquentielles du lactate entre 0-2h, 0-4h et 2-4h</i>	43
<i>Figure 26 : Modèle expérimental de choc hémorragique utilisé dans l'étude Hémocho</i>	49
<i>Figure 27 : Formule semi-développée de la sonde moléculaire d'anion superoxyde</i>	52
<i>Figure 28 : Exemples de spectres RMN à angle magique avec signal caractéristique de l'alanine et du lactate</i>	53
<i>Figure 29 : Taux de lactate par microdialyse dans la loge du gastrocnémien</i>	64
<i>Figure 30 : Taux de lactate par microdialyse dans la loge du pectoral</i>	65

<i>Figure 31 : Taux moyen de lactate dans le liquide de microdialyse le jour opératoire</i>	65
<i>Figure 32 : Représentation schématique du métabolisme myocytaire énergétique centré sur le lactate</i>	66
<i>Figure 33 : Représentation de Bland et Altman comparant le dosage capillaire et artériel du lactate</i>	72
<i>Figure 34 : Représentation de Bland et Altman comparant le dosage capillaire et artériel du lactate</i>	73
<i>Figure 35 : Taux de lactate interstitiel quadricipital par microdialyse</i>	75
<i>Figure 36 : Représentation schématique du métabolisme myocytaire énergétique centré sur le lactate</i>	77
<i>Figure 37 : Schématisation de la vascularisation muqueuse intestinale chez le porc</i>	81
<i>Figure 38 : Représentation schématique du métabolisme cellulaire énergétique centré sur le lactate</i>	82
 <i>Image 1 : Cellule oxygraphique avec électrode de Clark en place</i>	 51
<i>Image 2 : Dispositif de mesure du taux de lactate, lactate Pro</i>	54
<i>Image 3 : Dispositif de mesure du taux de lactate, The Edge, lactate analyzer</i>	54

INTRODUCTION GENERALE

1. Le muscle squelettique et son fonctionnement métabolique

Nous allons exposer cette thématique telle qu'elle a été développée de manière collaborative au sein de notre équipe d'accueil l'EA 3072. Ces rappels sont le fruit du travail de toute l'équipe de l'EA 3072.

Le tissu musculaire est quantitativement le plus représenté au sein de l'organisme. Le tissu musculaire squelettique représente approximativement 40% du poids du corps chez l'homme et 32% chez la femme.

Sur le plan fonctionnel, chez les vertébrés, il permet notamment la motricité spatiale par sa fonction contractile. Cette fonction contractile impose aux cellules musculaires une spécialisation architecturale et moléculaire qui explique les variations fonctionnelles importantes observées en terme de vitesse de contraction, puissance et fatigabilité.

Nous allons voir successivement les principales caractéristiques fonctionnelles des unités musculaires puis leur fonctionnement métabolique.

1.1. Systématisation de l'appareil contractile

Le mouvement d'un membre est initié par la contraction d'un ou de plusieurs muscles squelettiques, fixés sur le squelette osseux par leurs extrémités myotendineuses.

Un muscle (Figure 1) est subdivisible en fibres musculaires, contenant des cellules musculaires et s'étendant entre chaque extrémité myotendineuse. Une gaine conjonctive, l'endomysium recouvre les fibres musculaires. Celles-ci sont rassemblées en faisceaux par le périmysium, recouvrant de manière commune l'ensemble des fibres. Un muscle est constitué de plusieurs faisceaux, recouverts par l'épimysium, lui-même recouvert par plusieurs fascias. Le diamètre des fibres musculaires varie de 10 à 100µm et leurs longueurs de plusieurs centaines de µm à plusieurs dizaines de mm. Ces fibres musculaires sont un syncytium résultant de la fusion de plusieurs cellules avec un positionnement périphérique de leurs noyaux à proximité de la membrane plasmique appelée sarcolemme.

Les tendons situés aux extrémités musculaires sont constitués du prolongement commun de l'ensemble des endomysiums.

La vascularisation des fibres musculaires est assurée par un fin réseau capillaire issu d'un réseau vasculaire intégré à l'épimysium, au périmysium et à l'endomysium.

La jonction neuromusculaire constitue l'interface entre le système nerveux périphérique et la cellule musculaire permettant de commander le déclenchement d'une contraction musculaire.

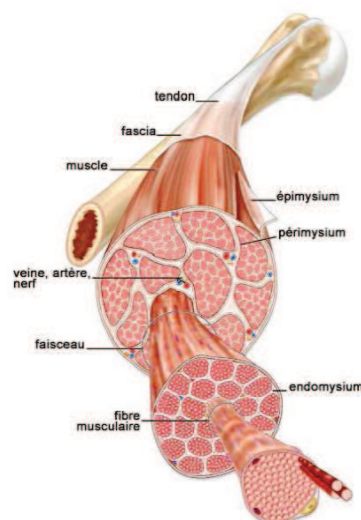


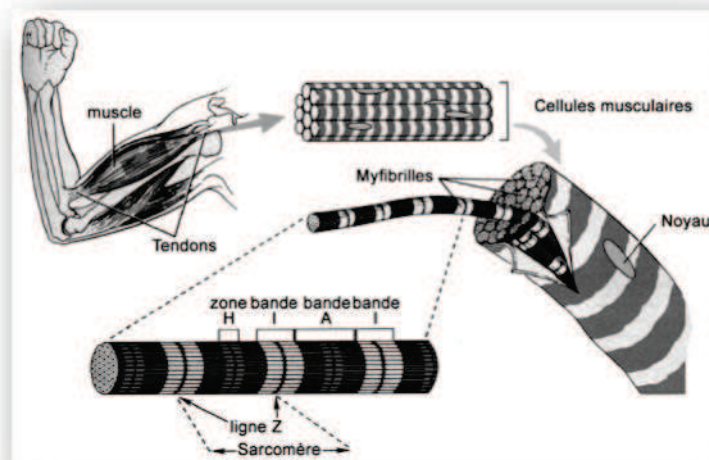
Figure 1 : Organisation histologique du muscle squelettique

[Pottecher(7)] adapté du site www.academic.kellog.cc.mi.us

1.2. Biologie moléculaire de la contraction musculaire

Chaque fibre musculaire est constituée d'un syncytium de plusieurs cellules musculaires (rhabdomyocytes). Dans le syncytium, on retrouve de nombreux noyaux en périphérie situés sous la membrane cytoplasmique appelée sarcolemme. Le cytoplasme des rhabdomyocytes est appelé sarcoplasme. L'unité fonctionnelle de la contraction musculaire est constituée par le sarcomère. Un sarcomère est constitué par des protéines contractiles assemblées en filaments appelés myofibrilles. Ces assemblages occupent jusqu'à 90 % du volume sarcoplasmique. Un sarcomère peut se décrire en microscopie comme la zone séparée par deux lignes Z qui centrent les bandes I. On retrouve en son centre une bande A sombre séparée par une zone H et une ligne M (Figure 2 B). Les bandes A (pour Anisotropes) correspondent à un enchevêtrement de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine. Les bandes I (pour Isotropes) sont composées de filaments d'actines.

A



B

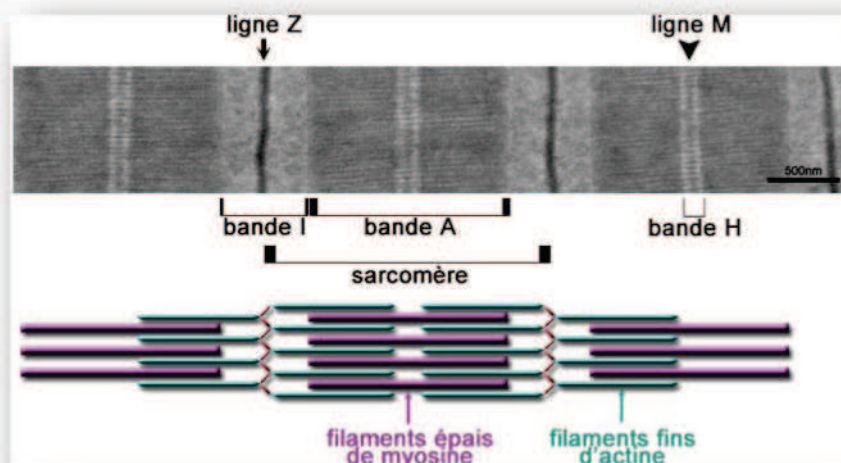


Figure 2 : Organisation de l'unité contractile musculaire striée

A. Au sein d'une cellule musculaire, la contraction est assurée par les myofibrilles, constituées par une succession de sarcomères. B. Observation d'un segment de myofibrille de muscle squelettique de souris en microscopie électronique. On visualise trois sarcomères assemblés. [Pottecher(7)] adapté de [Goll(8)].

Sur le plan protéique, la structure d'un sarcomère est représentée sur la figure 3. La myosine est constituée d'une chaîne légère, longitudinale, flexible et d'une chaîne lourde sur laquelle se situent les têtes de myosine. On retrouve la myosine au sein de la bande A, la bande H étant matérialisée par les segments de myosine sans chevauchement d'actine. La ligne M qui centre la bande H est constituée par l'assemblage de myoméline et de protéine M qui stabilise les connexions de myosines.

Six filaments d'actine recouvrent chaque filament de myosine. Ce sont des polymères d'actine globulaire (actine G). La conformation du polymère d'actine est en double hélice avec en son centre une colonne de tropomyosine qui fixe l'actine. Sur la tropomyosine se trouve à intervalles réguliers des complexes de troponines comprenant : troponine C (avec site de fixation au calcium), troponine I (qui au repos inhibe la fixation actine-myosine) et la troponine T (qui réalise la fixation à la tropomyosine).

Les connexions de filaments d'actine sont effectuées au niveau de la ligne Z par un polymère protéique d'a-actine, téléthonine, g-filamine, myotiline, obscurine, titine et nébuline.

La titine a également pour rôle de rendre le sarcomère élastique, elle s'étend d'une ligne Z à une ligne M.

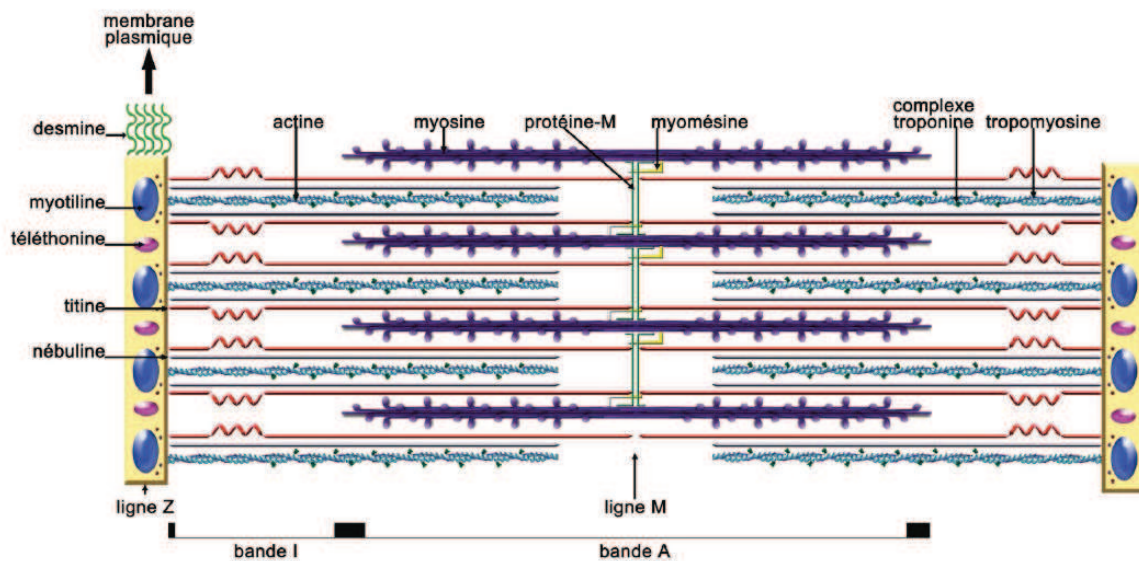


Figure 3 : Composition protéique d'un sarcomère

[Pottecher(7)] adapté du site www.massaoit-bio.net

La contraction musculaire (Figure 4) est réalisée sur le plan moléculaire par la fixation de l'actine et de la myosine puis les têtes de myosine se replient et raccourcissent le sarcomère. Ce mécanisme est assuré sur le plan énergétique par l'hydrolyse d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP). La fixation de l'actine et de la myosine nécessite la fixation de calcium sur la troponine C. Cette fixation va induire une modification conformationnelle de la troponine C. Cette modification conformationnelle va déplacer la troponine I sur la tropomyosine ce qui va permettre la fixation actine-myosine.

Au moment de la décontraction musculaire, le sarcomère se rallonge. Ce phénomène est initié par la défixation des têtes de myosine. Sur le plan moléculaire, on note à ce moment la fixation d'un nouvel ATP et le relargage du calcium de la troponine C.

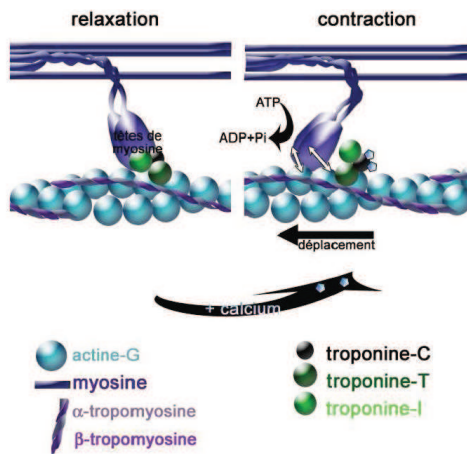


Figure 4 : Mécanique moléculaire de la contraction musculaire

[Pottecher(7)] adapté du site www.biology.berkeley.edu

1.3. Classification des fibres musculaires striées squelettiques

Les fibres musculaires striées squelettiques ne sont pas identiques en terme de morphologie et de caractéristiques fonctionnelles. Il existe plusieurs classifications reposant sur des paramètres qui ont évolué en fonction des progrès de la biologie.

Brooke et Kaiser(9) ont ainsi proposé une classification basée sur la réaction histochimique incluant l'ATPase à des pH différents(Figure 5). Cette méthode de classification histologique permet de définir trois types de fibres. Les fibres I sont appelées fibres lentes et les fibres II, fibres rapides. Les fibres rapides (type II) sont dichotomisées en fibres à contraction moyennement rapides (IIa) et fibres rapides (IIb).

Nemeth et Pette ont proposé de combiner l'activité ATPasique avec l'analyse du métabolisme oxydatif basée sur la teneur en succinate déshydrogénase(10).

Une classification basée sur des méthodes immunohistochimiques ciblant les chaînes lourdes de la myosine permet de distinguer les fibres de type IIX.

Comme cela est illustré dans la figure 5, un muscle n'est pas homogène en composition fonctionnelle de fibres musculaires de type I ou II. Selon le rôle physiologique d'un muscle, la majorité de type de fibres va varier. Un muscle postural est plus riche en fibres lentes qu'un muscle destiné à assurer la gestuelle par exemple.

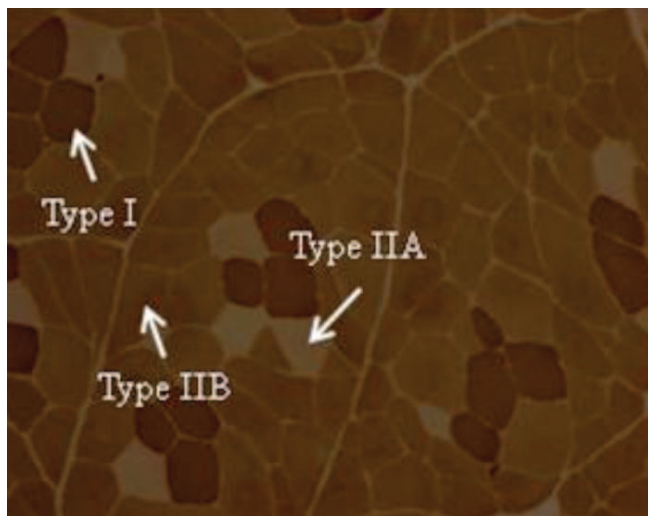


Figure 5 : Typage histologique des fibres musculaires squelettique

Coloration à la myosine adénosine triphosphatase (mATPase) selon Brooke et Kaiser de muscle *Longissimus dorsi* porcins(11). Type I : fibres à contraction lente. Type IIa : fibres à contraction moyenne. Type IIb : fibres à contraction rapide.

L'innervation d'un motoneurone va cibler plusieurs fibres musculaires qui auront toutes le même profil fonctionnel témoignant d'un probable déterminisme neurogénique.

1.3.1. Les fibres de type I

Les fibres de type I sont des fibres à contraction lente. Leur métabolisme énergétique est à prédominance oxydative, basé sur la phosphorylation oxydative aérobie intramitochondriale. Ces fibres ont une forte teneur en myoglobine et sont de couleur rouge en microscopie optique. Sur le plan fonctionnel ces fibres développent une force limitée mais sont peu fatigables.

1.3.2. Les fibres de type II

Par opposition avec les fibres de type I, les fibres de type II sont à contraction plus rapide, induisant une force supérieure mais sont fatigables. Leur métabolisme énergétique est de type glycolytique anaérobie. Ces fibres sont blanches optiquement, riches en glycogène.

Les fibres de type IIa sont à métabolisme énergétique mixte oxydatif et glycolytique. Leur composition comprend du glycogène en quantité importante et moins de mitochondries par rapport aux fibres de type I.

Les fibres de type IIb sont à métabolisme essentiellement glycolytique anaérobie, pauvres en mitochondries et en enzymes oxydatives. Elles contiennent très peu de mitochondries ou d'enzymes oxydatives.

Les fibres IIx ont une structure fonctionnelle intermédiaire entre les fibres IIa et IIb.

1.4. Les différents phénotypes métaboliques musculaires squelettiques

Comme nous venons de le voir, le phénotype métabolique musculaire est un paramètre fondamental des propriétés fonctionnelles d'un muscle squelettique. Deux voies métaboliques permettent l'essentiel de la production énergétique : la glycolyse et la phosphorylation oxydative.

1.4.1. La glycolyse

La glycolyse est une voie métabolique qui a pour substrat le glucose. Elle a lieu dans le cytoplasme cellulaire et ne nécessite pas d'oxygène dans sa cascade enzymatique. Le produit catabolique final est le pyruvate qui pourra en présence d'oxygène intégrer la voie du métabolisme énergétique oxydatif intramitochondrial (Figure 6). Le rendement énergétique est faible puisqu'une molécule de glucose générera deux molécules d'ATP (contre 36 pour la phosphorylation oxydative).

1.4.2. La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est un processus enzymatique qui a lieu au niveau mitochondrial dans un complexe protéique appelé chaîne respiratoire mitochondriale et sera détaillé dans le chapitre « physiologie mitochondriale ». Elle nécessite la présence d'oxygène qui sera réduit en eau et la présence d'équivalents réducteurs NADH, et FADH₂. Ces équivalents réducteurs sont produits lors d'une étape préliminaire appelé cycle de Krebs. Ce cycle intramitochondrial nécessite la conversion de pyruvate ou d'acyl-CoA, les produits cataboliques respectifs de la glycolyse et de la bêta-oxydation des acides gras, en acétyl-CoA. L'acétyl-CoA va être métabolisé par une succession d'enzymes (Figure 6) pour produire au total deux molécules de CO₂, trois molécules de NADH, une molécule de FADH₂ et une molécule d'ATP.

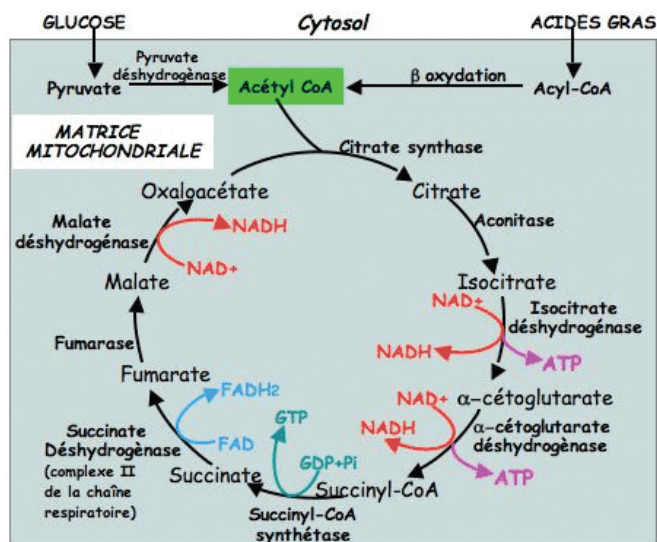


Figure 6 : Le cycle de Krebs

Adapté d'après le site www.members.chello.nl

En résumé :

Nous venons de voir l'importante relation entre le profil métabolique et le rôle fonctionnel d'un muscle squelettique. Le tissu musculaire squelettique est spécialisé dans la production d'énergie mécanique au moyen d'un complexe assemblage protéique lui permettant un raccourcissement réversible. Ce phénomène peut se faire avec puissance et rapidité ce qui implique une forte demande énergétique. La mitochondrie est une organelle du rhabdomyocyte qui a pour mission, entre autres, d'assurer cette charge.

Nous allons détailler dans la partie suivante la structure et le fonctionnement mitochondrial qui dépasse la production énergétique avec notamment la genèse de radicaux libres oxygénés.

1.5. La physiologie mitochondriale musculaire

La mitochondrie est une organelle dont un des rôles majeurs est la production énergétique. Elle renferme son propre ADN (mtADN)(12). Cependant, les protéines constituant la mitochondrie ne sont pas exclusivement codées par cet ADN. Les protéines mitochondriales codées au niveau de l'ADN nucléaire sont synthétisées puis transportées au sein de la mitochondrie. Le rôle de la mitochondrie dépasse celui de la production énergétique avec une implication dans l'homéostasie calcique, l'équilibre du pH intracellulaire, la synthèse d'hème et d'hormones stéroïdiennes, l'équilibre du stress oxydant et la thermogénèse.

1.5.1. Structure mitochondriale

La mitochondrie possède une enveloppe membranaire composée de deux membranes, externe et interne (Figure 7).

La membrane externe doit assurer les échanges entre le milieu cytosolique et l'espace intermembranaire. Des protéines spécialisées assurent ces échanges que se soit, par des pores pour transloquer les protéines ou des porines par lesquelles transitent les substrats intégrant la respiration mitochondriale. La principale porine est dénommée Voltage Dependent Anion Channel (VDAC). Il existe trois isoformes différentes (VDAC1, 2 et 3) dont les propriétés et les conséquences en terme de régulation du fonctionnement mitochondrial diffèrent(13).

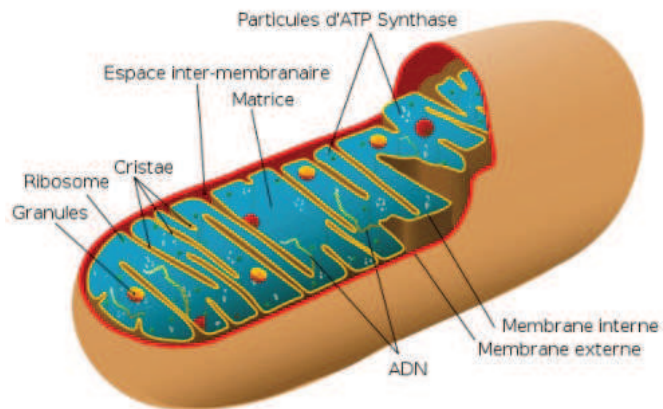


Figure 7 : Schématisation de la structure mitochondriale

Adapté du site www.lewebpedagogique.com

L'espace intermembranaire doit, entre autres, assurer la transition des composés phosphorylés hautement énergétiques vers leur site d'action extra-mitochondrial. La créatine kinase mitochondriale (mi-CK) participe à cette mission. Elle se situe sur la membrane interne et va transformer la créatine en phosphocréatine, une forme plus stable de composé phosphorylé à haute énergie(14). Il existe également une mi-CK sur la membrane externe dont le rôle serait l'importation de créatine intra-mitochondriale et l'exportation de phosphocréatine.

La membrane interne possède une perméabilité encore plus limitée du fait de son rôle de barrière pour les gradients électrochimiques nécessaires à la respiration mitochondriale. Plusieurs protéines permettent de réaliser les échanges moléculaires et métaboliques entre les deux versants membranaires :

- Les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale constituent le cœur du processus énergétique aérobie et sont détaillés dans le paragraphe suivant.
- L'adénine nucléotide translocase (ANT) est un échangeur transmembranaire d'ATP/ADP. Il existe trois isoformes décrites (ANT1, ANT2, ANT3). L'ANT 1 est l'isoforme majoritaire dans le myocarde et les muscles squelettiques murin et humain. L'ANT 2 est ubiquitaire et dépendant de l'activité respiratoire du tissu.
- Les protéines découplantes (UCP -uncoupling protein) ont pour rôle de laisser passer les protons au travers de la membrane interne. Leur ouverture induisant une fuite protonique transmembranaire conduit à un découplage entre l'oxydation et la phosphorylation de l'ADP. Sur le plan énergétique, l'énergie électrochimique ainsi dissipée est évacuée sous forme de chaleur.

Le compartiment interne à la membrane interne est appelé matrice mitochondriale. Les enzymes du cycle de Krebs, de la bêta-oxydation des acides gras y sont situés ainsi que l'ADN mitochondrial et les éléments nécessaires à son expression.

1.5.2. Organisation mitochondriale cellulaire

Plus qu'un organelle isolé, les mitochondries sont principalement organisées en réseau tel qu'ont permis de constater les techniques de fluorescence(15). Les protéines sont intégrées dans une matrice protéique du cytosquelette qui participe au dynamisme spatial de l'organisation mitochondriale (myosine, dynéine, kinésine). Les mitochondries sont organisées en un cristal inter-myofibrillaire afin d'optimiser la disponibilité de la production énergétique.

En terme quantitatif, dans le tissu myocardique à métabolisme principalement oxydatif, les mitochondries représentent 30 à 40 % du volume cellulaire. La proportion de mitochondries intramusculaires va dépendre du profil métabolique glycolytique (faible teneur en mitochondries) ou oxydatif (forte teneur en mitochondries).

1.5.3. La chaîne de transport des électrons

Le métabolisme énergétique mitochondrial se réalise, comme nous l'avons vu précédemment, grâce à l'action conjointe de réactions enzymatiques d'oxydation des substrats énergétiques et de la chaîne respiratoire. Les équivalents réducteurs (NADH, FADH₂) vont fournir des électrons à la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM). La CRM est composée de cinq complexes protéiques (Figure 8):

- le complexe I ou NADH déshydrogénase,
- le complexe II ou succinate déshydrogénase,
- le complexe III ou ubiquinol cytochrome C réductase,
- le complexe IV ou cytochrome C oxydase,
- le complexe V ou ATP synthase.

Chacun de ces complexes se forme de sous-unités protéiques. Le complexe II résulte de la transcription uniquement d'ADN nucléaire tandis que les autres complexes sont issus de la transcription d'ADN nucléaire et mitochondrial(16).

1.5.4. La phosphorylation oxydative

Le flux électronique est initié par l'oxydation du NADH et du FADH₂ au niveau des complexes I et II respectivement. L'ubiquinone va alors médier le transfert d'électrons vers le complexe III et le cytochrome C du complexe III vers le complexe IV. Au niveau du complexe IV, cet électron va réduire de l'oxygène en eau. Chaque flux électronique va initier le passage de protons vers l'espace intermembranaire mitochondrial au travers des complexes exposés au flux électronique. Le gradient électrochimique de protons constitue une force proton-motrice que le complexe V va exploiter pour phosphoryler des molécules d'ADP en ATP. L'ensemble du mécanisme nécessite donc le couplage par le complexe V entre la chaîne des oxydoréductions et la production d'ATP(17).

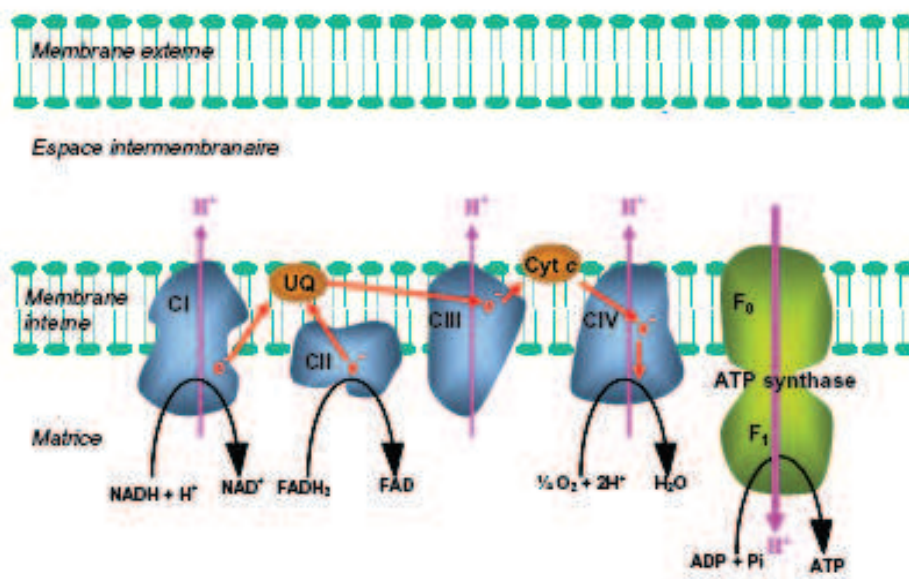


Figure 8 : Chaîne mitochondriale de transport des électrons

CI complexe I, CII complexe II, CIII complexe III, CIV complexe IV. [Stock(17)].

Plusieurs éléments influent sur la régulation de la production d'ATP par la CRM.

La proportion entre les équivalents réducteurs NADH/FADH₂ va ainsi modifier le rendement de phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire mitochondriale car l'amplitude du flux électronique généré n'est pas le même entre les deux équivalents. Ce rendement de phosphorylation oxydative peut être approché en mesurant le rapport entre flux d'ATP et flux d'oxygène (JATP/JO). Le FADH₂ génère un rendement de phosphorylation oxydative moindre que le NADH car il court-circuite le complexe I lors de

l'initiation du flux d'électrons. Selon le substrat métabolisé, ce rapport NADH/FADH₂ diffère. Par exemple, ce rapport est à 4 pour le glucose et 2 pour les acides gras.

La concentration en ADP extra-mitochondriale est également un facteur influençant la phosphorylation oxydative(18). Le niveau de respiration mitochondriale est corrélé de manière hyperbolique avec la concentration en ADP extra-mitochondriale. L'adénine nucléotide translocase (ANT) régule la concentration en ADP extra-mitochondriale.

Parmi les autres facteurs influençant la phosphorylation oxydative, on retrouve la concentration extra-mitochondriale en phosphate inorganique, la disponibilité en H⁺ au niveau des équivalents réduits ou encore l'activité du cytochrome C oxydase(19).

1.5.5. La genèse mitochondriale de stress oxydant

La mitochondrie est l'organelle majoritairement impliquée dans la genèse de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) cellulaires(20). Plus précisément, la CRM est une source de ROS qui peuvent être produits au niveau des complexes I et III (Figure 9).

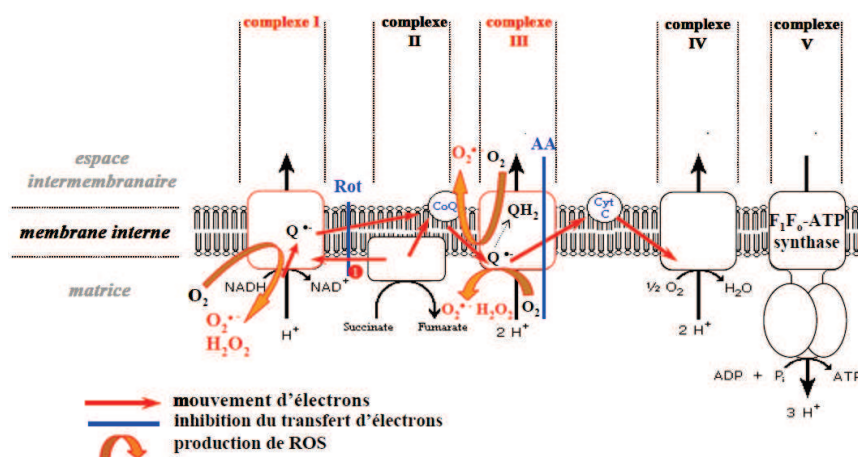


Figure 9 : Production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale

Adapté de [Boveris(21)].

Le complexe I génère des ROS au niveau matriciel alors que le complexe III génère des ROS aux niveaux matriciel et intermembranaire. La proportion de production de ROS entre ces deux complexes va dépendre de leurs sollicitations relatives et donc du rapport NADH/FADH₂ à proximité. Le site exact impliqué dans la production de ROS est encore l'objet de recherches.

En conclusion :

Le muscle squelettique est un tissu spécialisé dans la production d'énergie mécanique. Son profil histologique et métabolique correspond à cette spécialisation. La mitochondrie et en particulier la chaîne respiratoire mitochondriale tiennent un rôle central dans la production énergétique. La mitochondrie du fait de son importance fonctionnelle et quantitative sera une cible d'intérêt pour l'étude des agressions tissulaires musculaires rencontrées en clinique telles que l'ischémie-reperfusion.

2. L'ischémie-reperfusion et ses conséquences musculaires

2.1. Définition de l'ischémie

L'ischémie musculaire est la conséquence tissulaire de la diminution de l'apport musculaire en oxygène et en éléments nutritifs. En fréquence, cela va correspondre majoritairement à une interruption de la circulation sanguine à destination du territoire ischémié.

L'origine de l'interruption du flux sanguin peut être multiple : embolie, thrombose, compression tumorale, traumatique, iatrogène...

Des ischémies peuvent également être causées par des altérations de la délivrance en oxygène non liées à une interruption du flux sanguin (anémie, anomalie du débit cardiaque ou de la pression de perfusion, hypoxémie par exemple). Ces situations correspondent plus fréquemment à une hypoperfusion qu'à une réelle ischémie mais partagent le continuum physiopathologique.

L'ischémie musculaire squelettique pure, sans reperfusion, n'a pas fait l'objet d'études extensives. Au niveau myocardique, il est clairement établi que la durée d'ischémie conditionne l'étendue de la lésion nécrotique. Ce concept a été regroupé sous le terme d'onde de progression ischémique par Reimer dans des travaux expérimentaux sur myocarde de chien(22). En ce qui concerne le muscle squelettique, à durée de reperfusion identique, la viabilité musculaire squelettique commence à être significativement impactée à partir de 3h d'ischémie selon un modèle *in vitro*(23) étudiant du tissu humain. De la même manière que pour le myocarde, l'altération musculaire squelettique est proportionnelle à la durée d'ischémie.

2.2. Phénomènes moléculaires associés à l'ischémie

L'ischémie engendre initialement une baisse de production aérobie d'ATP. La genèse d'ATP est alors principalement assurée par la glycolyse à partir des stocks cellulaires de glycogène et de glucose. L'absence de catabolisme du pyruvate augmente la concentration en acide lactique par conversion du pyruvate en acide lactique(24). Pour compenser l'augmentation de la concentration protonique intracellulaire, l'échangeur transmembranaire Na^+/H^+ va faire augmenter la concentration intracellulaire en sodium ; créant un appel osmotique d'eau et un oedème cellulaire. Le phénomène de glycolyse étant saturable et peu rentable en ATP, une diminution de la concentration tissulaire en ATP s'installe. Ceci va aggraver l'oedème cellulaire par diminution de l'activité de l'échangeur transmembranaire Na^+/K^+ ATP-dépendant. Secondairement, l'échangeur transmembranaire $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ va corriger l'augmentation de la quantité de sodium intracellulaire en augmentant la concentration de calcium intracellulaire. En conséquence, il existe une augmentation des concentrations en sodium et calcium intracellulaires lors des ischémies prolongées(25). A ces altérations va succéder une activation de certains mécanismes enzymatiques conduisant à la mort cellulaire, notamment la phospholipase A2 et les lysozymes. La phospholipase A2 va dégrader la bicouche phospholipidique membranaire en acide arachidonique. Cet acide arachidonique est un précurseur de médiateurs pro inflammatoires tels que les leukotriènes et les prostaglandines. Une activation de l'inflammation notamment cellulaire sera alors observée(26). Les lysozymes vont également dégrader les composants cellulaires.

D'autres mécanismes sont également impliqués dans les altérations tissulaires liées à l'ischémie : la production de cytokines, de kinines, du complément et des voies de coagulation.

L'activation biologique de l'inflammation est retrouvée sur le plan histologique. Formigil a étudié des biopsies quadricipitales de patients opérés pour anévrisme aortique avec clampage aortique et a retrouvé un infiltrat granulocytaire dans les muscles ischémiés et reperfusés(27).

L'ischémie même sans reperfusion est responsable d'une dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale des muscles squelettiques sur des modèles expérimentaux murins(28, 29).

2.3. Définition de la reperfusion

La reperfusion est le rétablissement de l'apport tissulaire en oxygène et nutriments qui faisait précédemment défaut. Son existence est un prélude nécessaire au sauvetage du tissu agressé. La recherche médicale s'est d'ailleurs efforcée de développer différentes stratégies de reperfusion (chirurgicales, endovasculaires, médicales par exemple).

Cependant, contrairement à ce que l'on pouvait anticiper initialement, la reperfusion, à son stade initial induit une majoration de l'agression tissulaire initiée par la période d'ischémie(30).

Cerra(31) a ainsi décrit sur cœur isolé de chien soumis à différents protocoles d'ischémie-reperfusion, une nécrose hémorragique après la reperfusion proportionnelle à la durée de la phase ischémique.

2.4. Phénomènes moléculaires associés à la reperfusion

Au niveau électrolytique, la reperfusion va induire des altérations spécifiques. Initialement l'extrusion de sodium intracellulaire par l'échangeur Na/Ca va perdurer puis rapidement, la correction de l'acidose et la réactivation de la synthèse d'ATP va permettre à ces phénomènes de se réguler puis au calcium intracellulaire de diminuer(32).

Le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale musculaire squelettique est altéré par la reperfusion(33).

La reprise d'une activité fonctionnelle de la CRM alors qu'elle a subi un stress ischémique va s'accompagner d'une importante augmentation de sa production de ROS. En parallèle, la xanthine oxydase produite durant l'ischémie va également augmenter le débit de production de ROS. Cette situation va créer un déséquilibre de la balance stress oxydant – défenses anti-oxydantes(34). Cette augmentation du statut pro oxydant cellulaire va induire une peroxydation des acides gras de la bicouche phospholipidique cellulaire. Cette peroxydation lipidique s'accompagne de l'activation du complément et de la libération d'acide arachidonique.

Si la conjonction de ces éléments est trop importante en amplitude, une variation de la perméabilité membranaire mitochondriale et en particulier l'ouverture des pores de transition mitochondriale (mPTP) va s'observer, ce qui va découpler l'énergie générée par le flux électronique de la production d'ATP par le complexe V de la CRM. La baisse de production énergétique cellulaire est alors telle que des mécanismes d'apoptose vont s'enclencher(25).

En résumé :

Les phénomènes physiopathologiques d'ischémie et de reperfusion sont extrêmement complexes et dynamiques. Chaque stade possède un continuum progressivement croissant en intensité responsable de dommages tissulaires, et en particulier mitochondriaux, réversibles ou non. Il est donc important autant sur le plan expérimental que clinique de pouvoir évaluer l'intensité de l'agression tissulaire musculaire représentée par une ischémie-reperfusion.

2.5. Monitoring biologique de la perfusion tissulaire

Le développement de biomarqueurs performants de l'ischémie et de la reperfusion du tissu musculaire est un enjeu considérable pour la prise en charge des patients souffrant d'atteinte vasculaire périphérique(35). Les méthodes de diagnostic et de suivi des dysfonctions vasculaires périphériques actuellement utilisées en routine clinique ont chacune leurs limites d'utilisation.

Les méthodes d'exploration fonctionnelle telles que l'échographie-doppler artériel ou l'index de pression systolique (IPS) de cheville posent principalement des problèmes de coût, de disponibilité et de maîtrise technique. Mohler(36) a ainsi déterminé, en interrogeant une base de données de 886 praticiens ayant utilisé l'IPS dans leur pratique, les points les plus limitants de son utilisation : le temps de mise en œuvre,

le coût et la disponibilité des personnes compétentes sont parmi les premiers freins d'utilisation (Figure 10).

Les méthodes radiographiques telles que l'angiographie, l'angioscanner et l'angio-IRM (Figure 11) sont très performantes(37) pour diagnostiquer une anomalie anatomique de perfusion artérielle mais au prix d'un coût important, d'une utilisation de produit de contraste iodé néphrotoxique (chez une population à risque d'insuffisance rénale) ou à base de gadolinium et d'une irradiation non négligeable pour l'imagerie scannographique. Tous ces éléments rendent leur utilisation peu pratique.

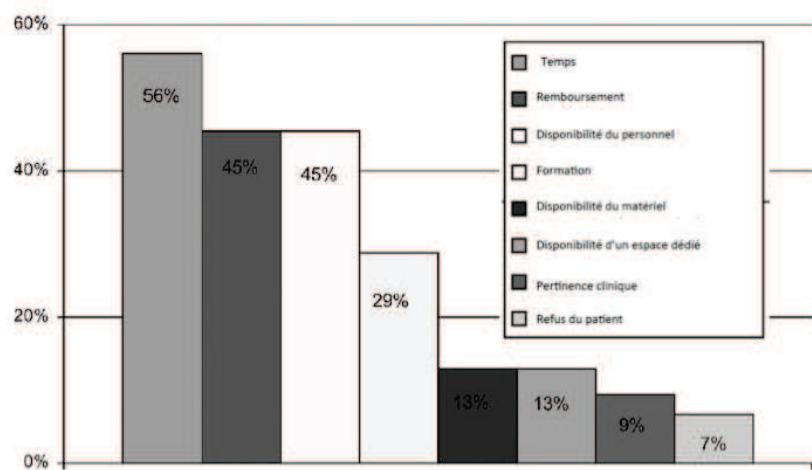


Figure 10 : Nature et proportions des éléments limitant l'utilisation de l'IPS

D'après une base de données de 886 praticiens aux Etats Unis [Mohler(36)].

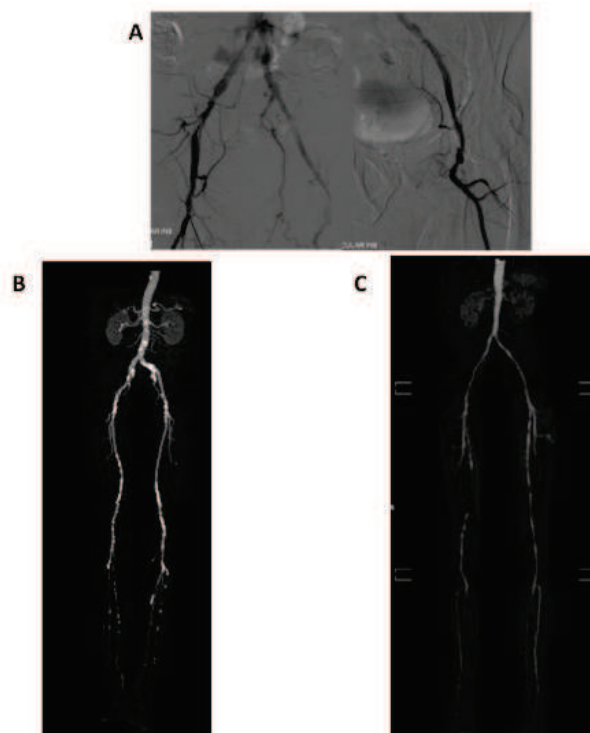


Figure 11 : Exemples de résultats d'examen radiographique d'imagerie vasculaire périphérique

A : Artériographie ; B : Angioscanner ; C : AngioIRM. [Iglesias(37)].

Un biomarqueur d'ischémie musculaire permettrait, en théorie, de répéter de manière plus fréquente, et d'intensifier dans des situations à risque (telles que la période périopératoire) l'évaluation de la perfusion tissulaire périphérique. Idéalement ce biomarqueur devrait :

- posséder une sensibilité et une spécificité d'ischémie tissulaire adaptées à un usage clinique,
- être de dosage précis, reproductible et économiquement réaliste.

Un tel biomarqueur n'est actuellement pas disponible en routine.

Les biomarqueurs actuellement développés pour le diagnostic et le suivi des artériopathies oblitérantes des membres inférieurs (AOMI) peuvent être regroupés en trois catégories :

- marqueurs d'inflammation et d'athérome,
- marqueurs de stress oxydant,
- marqueurs de remodelage vasculaire.

2.5.1. Les marqueurs d'inflammation et d'athérome

Le lien physiopathologique entre inflammation et athérome étant clairement établi(38), beaucoup d'attention a été récemment portée sur l'étude de la protéine C réactive (CRP) comme biomarqueur d'ischémie de membre(39, 40).

L'étude de la cohorte nord-américaine N.H.A.N.E.S. par Shanker(39) a mis en évidence une augmentation du rapport des cotes (odds ratio) de la présence d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs dans la cohorte de patients présentant un taux de CRP plus élevé par rapport à la population présentant un taux normal. Cette association restait présente même après ajustement portant sur des facteurs confondants tels que la présence de diabète et d'hypertension artérielle.

Cependant, la CRP présente une spécificité faible du fait des nombreuses pathologies ayant pour conséquence une activation de l'inflammation. Son utilisation clinique comme outil diagnostique reste limitée.

2.5.2. Les marqueurs de stress oxydant

Un certain nombre de données expérimentales et cliniques mettent en évidence les conséquences au niveau de l'équilibre redox systémique des phénomènes d'ischémie-reperfusion qui ont lieu tout au long de l'histoire naturelle des pathologies ischémiques de membre(41). Par exemple, la myéloperoxydase, enzyme catalysant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au sein des polynucléaires neutrophiles, voit son activité augmentée au cours de l'insuffisance circulatoire artérielle(42). L'augmentation de son taux d'activité plasmatique est associée à un plus fort risque de complications cardiovasculaires(43).

Cependant, le principal frein à l'utilisation des méthodes biologiques d'évaluation du stress oxydant comme marqueurs de dysfonction vasculaire reste la difficulté de mise en œuvre de méthodes fiables, reproductibles et compatibles avec une utilisation de routine clinique.

2.5.3. Les marqueurs de remodelage vasculaire

Dans une étude de cohorte, Gardner(44) a retrouvé un taux plasmatique de VEGF-A significativement diminué dans une population de patients ayant un IPS inférieur à 0,9 par rapport à un groupe contrôle partageant des facteurs de risque cardiovasculaires mais sans altération de l'IPS. Un taux diminué de VEGF suggère une altération de l'angiogenèse dans la population présentant une insuffisance vasculaire des membres inférieurs. En effet, il a été retrouvé une diminution du ratio capillaire/myofibrille avec la diminution du VEGF-A dans une population de patients atteints d'AOMI(45).

Cependant la spécificité de la diminution du taux de VEGF-A est remise en question par les études de Kikuchi(46) qui a montré dans un travail clinique et expérimental que l'isoforme pro-angiogénique VEGF-A_{165a} était bien diminuée au niveau systémique mais que l'isoforme anti-apoptotique VEGF-A_{165b} était augmentée dans les populations de patients avec ischémie chronique des membres inférieurs. Ces données rendent l'intérêt du VEGF-A comme biomarqueur systémique d'insuffisance vasculaire périphérique peu probable.

Ces différentes données concernant la recherche et le développement d'un biomarqueur d'ischémie de membre ne permettent pas d'isoler un candidat répondant à l'ensemble du cahier des charges détaillé précédemment. Les principaux écueils des molécules reflétant la réponse inflammatoire et la néoangiogenèse sont leur manque de spécificité. Les marqueurs reflétant le niveau de stress oxydant sont également difficiles d'utilisation en routine clinique du fait de leur technique de dosage.

Dans ce contexte, le lactate qui reflète la quantité de pyruvate produit par la glycolyse et accumulé lors des défauts d'utilisation des voies énergétiques oxydatives, pourrait constituer une molécule de choix pour quantifier la perfusion tissulaire.

3. Le lactate

De manière historique, le lactate était considéré comme un déchet métabolique accumulé en situation d'hypoxie tissulaire(47). Une des premières descriptions cliniques d'accumulation systémique de lactate a été faite au 19^e siècle par Johann Joseph Scherer chez deux patientes décédées de fièvre puerpérale.

A partir des années 1950, Huckabee(48-52) a permis de relier l'augmentation du taux systémique de lactate avec des situations d'altération de la délivrance tissulaire en oxygène telles que l'hypoxie, les altérations du débit cardiaque et l'exercice physique intense.

Ce n'est qu'avec les progrès de la connaissance sur les mécanismes énergétiques cellulaires que l'explication mécanistique de cette association entre hypoxie tissulaire et augmentation de la production de lactate a pu être apportée.

Les avancées sur la connaissance de la physiologie du lactate à partir de la deuxième moitié du 20^e siècle ont permis d'élargir la place du lactate dont le statut de déchet métabolique a évolué vers celui de maillon dans certaines voies de production et de transport énergétique tissulaire que nous allons décrire ci-après.

3.1. Métabolisme du lactate

Le lactate (2-hydroxypropanoate) est un sel d'acide hydroxycarboxylique. Le carbone en position 2, porteur d'un groupe hydroxyle est asymétrique expliquant l'existence d'énantiomères : L-lactate (lévogyre) et D-lactate (dextrogyre) (Figure 12). Le L-lactate est le stéréoisomère prédominant en physiologie humaine(53, 54), le D-lactate n'étant produit majoritairement que par certains organismes inférieurs. Dans la suite de notre propos, nous désignerons sous le terme lactate la forme lévogyre.

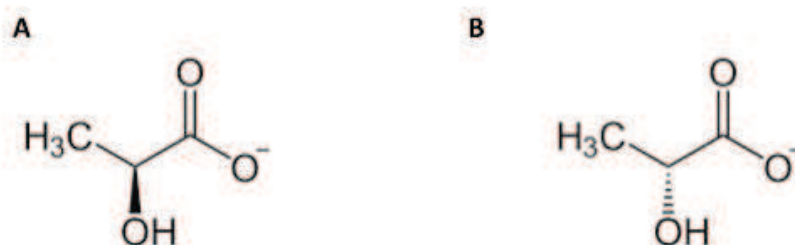


Figure 12 : Schématisation semi-développée de l'ion lactate

A : énantiomère S (L-lactate) et **B** : énantiomère R (D-lactate).

Le lactate est la forme ionique, dissociée de l'acide lactique qui est un acide carboxylique. Il est d'usage d'utiliser le terme lactate en physiologie humaine car le pKa du binôme acide lactique/lactate étant de 3,8, la forme dissociée est donc largement majoritaire.

Le lactate forme un couple de conversion par oxydo-réduction avec le pyruvate (Figure 13) catalysé au niveau cytosolique par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH). La réduction du pyruvate en lactate entraîne une oxydation de NADH en NAD et inversement l'oxydation de pyruvate à partir de lactate entraîne la réduction de NAD en NADH.

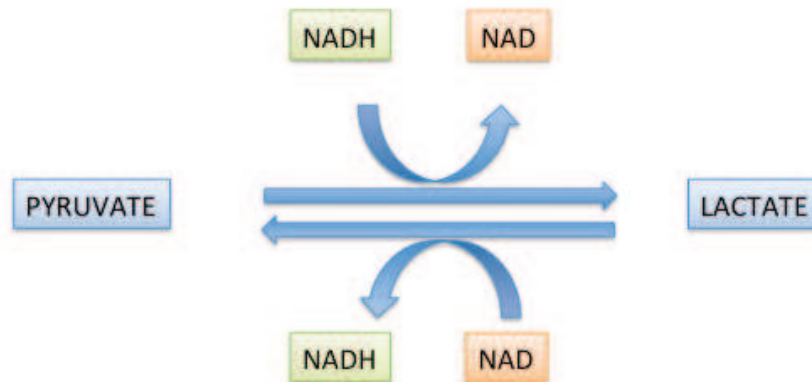


Figure 13 : Schématisation de la réaction d'oxydo-réduction entre pyruvate et lactate catalysée par l'enzyme lactate déshydrogénase

3.1.1. Voies de formation du lactate

Le lactate est produit à partir du glucose et de l'alanine, le pyruvate étant un intermédiaire commun à ces voies de production. En termes quantitatifs, les deux tiers du lactate plasmatique sont issus du catabolisme glucidique alors qu'un cinquième est issu de l'alanine. La proportion résiduelle est issue du catabolisme de certains acides aminés tels que la sérine, la thréonine et la cystéine(55).

- **La production de lactate à partir de L-alanine**

La production de lactate à partir de L-alanine est catalysée par l'alanine aminotransférase (ALAT)(56) présente au niveau cytoplasmique, du réticulum endoplasmique et du réseau mitochondrial (Figure 14).

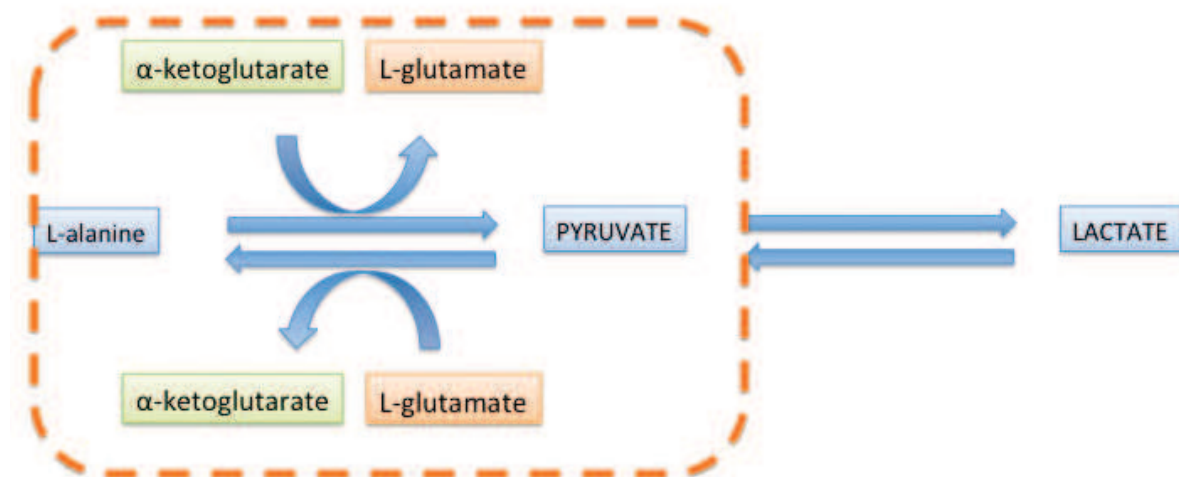


Figure 14 : Schématisation de la production de lactate à partir de la L-alanine

Pointillés orange : réaction catalysée par l'alanine aminotransférase.

- **La production de lactate à partir de glucose**

Cette série de réactions est fondamentale pour le métabolisme énergétique cellulaire en physiologie humaine car elle comprend la glycolyse. La glycolyse comprend une série de réactions métaboliques produisant *in fine* du pyruvate puis du lactate (Figure 16).

Sur le plan bioénergétique, une molécule de glucose produira deux molécules de lactate, deux molécules d'ATP et deux protons.

Cette voie métabolique est d'un rendement énergétique faible et responsable d'une acidification du cytosol par production protonique. Cependant, elle possède l'avantage de ne pas nécessiter de molécule d'oxygène.

Une autre conséquence de l'étude de cette réaction est la possibilité offerte de catabolisme protonique au prix d'une réaction endergonique qui pourrait contribuer à maintenir l'équilibre acide-base intracellulaire(57).

Le fonctionnement de cette série de réactions cataboliques à partir du glucose nécessite comme coenzyme la présence de NAD qui sera réduit en NADH lors de la transformation du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-biphosphoglycérate. Il y a donc une interdépendance entre la réduction de pyruvate en lactate produisant du NAD et la glycolyse (figure 15).

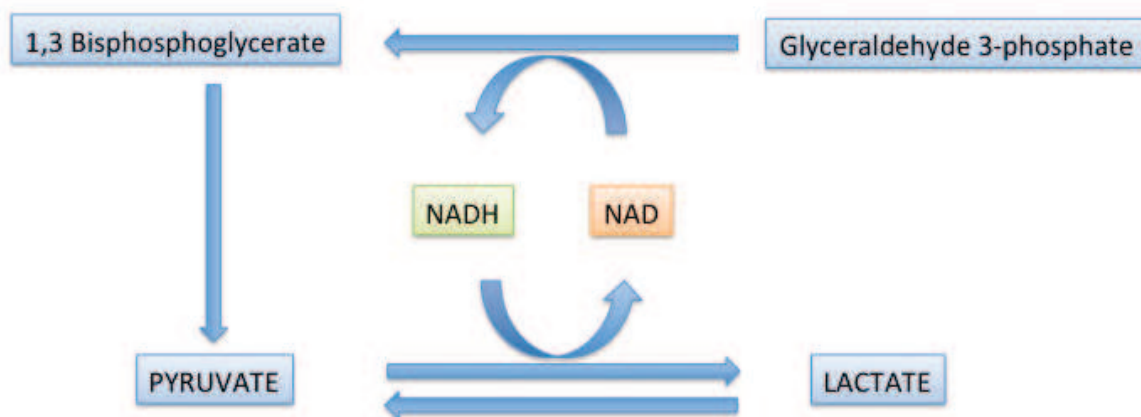


Figure 15 : Interaction entre l'action de la lactate déshydrogénase et la glycolyse

La glycolyse est une cascade métabolique finement régulée. Ainsi, la conversion du fructose-6-phosphate en fructose 1,6-diphosphate par l'enzyme phosphofructokinase évolue inversement à la concentration en ATP, citrate et proton (figure 16).

Ainsi, l'action de l'ATP sur la phosphofructokinase permet au métabolisme cellulaire de diminuer la consommation de glucose par glycolyse lorsque la production en composés phosphorylés à haute valeur énergétique est suffisante(58).

A l'inverse, durant l'hypoxie, la diminution de la production énergétique oxydative va engendrer une baisse de la concentration cellulaire en ATP et donc une augmentation de la glycolyse via l'action de la phosphofructokinase.

De la même manière, l'action du proton sur cette enzyme va jouer un rôle de régulation, empêchant une diminution trop importante du pH intracellulaire par suractivation de la filière glycolytique anaérobie qui est responsable de la production de proton en parallèle de la production de lactate(59).

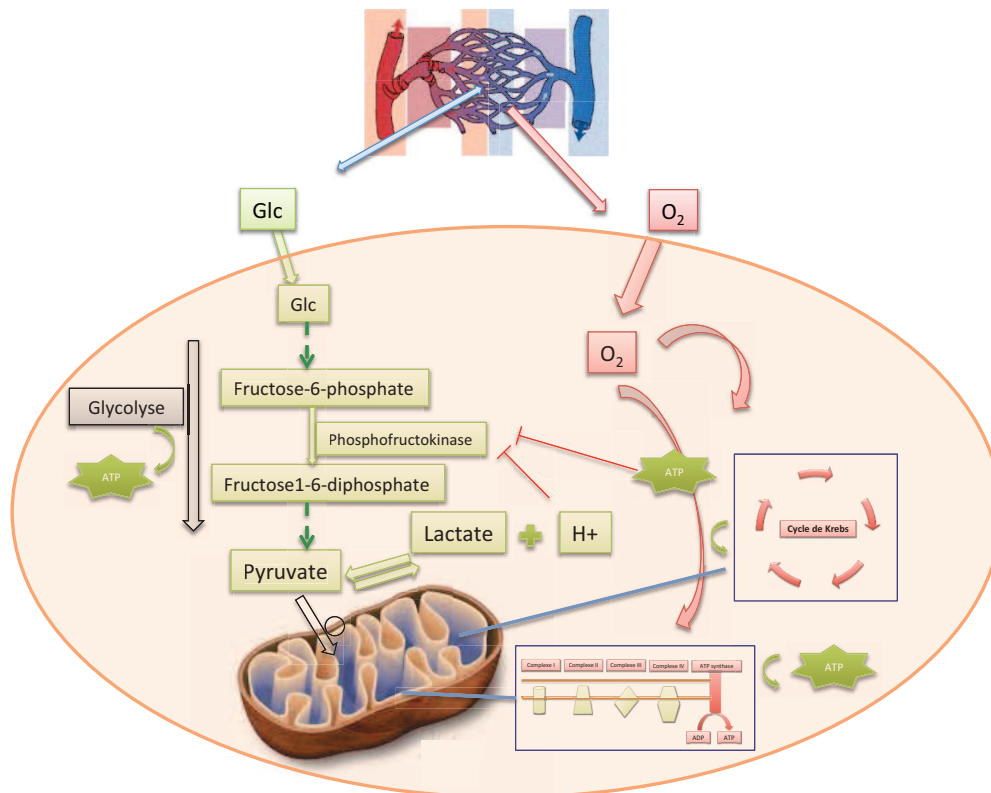


Figure 16 : Régulation de la glycolyse par l'inhibition de la phosphofructokinase liée à la concentration en ATP et proton (H⁺)

Adapté selon [Alberti(58)].

3.1.2. Elimination du lactate

• Catabolisme

Le lactate pour être catabolisé doit obligatoirement être oxydé en pyruvate par la LDH, cette réaction ayant lieu dans le cytosol. Par la suite, le pyruvate sera métabolisé dans la matrice mitochondriale par :

- l'enzyme pyruvate déshydrogénase (PDH) en acétyl-CoA par décarboxylation oxydative pour rejoindre les circuits de production oxydative d'ATP (cycle de Krebs et respiration phosphorylante mitochondriale). En termes quantitatifs, pour une molécule de glucose oxydée, 36 molécules d'ATP sont générées à partir de deux molécules de pyruvate(58),
- l'enzyme pyruvate carboxylase en oxaloacétate(60) pour entrer dans la néoglucogenèse.

• Transport extracellulaire

Le lactate peut être transporté à travers les membranes cellulaires grâce à des familles de cotransporteurs dont deux sont actuellement décrites :

- les transporteurs monocarboxylates couplés au proton (MCT)
- les transporteurs monocarboxylates couplés au sodium (SMCT)

Les transporteurs monocarboxylates couplés au proton sont une famille moléculaire (MCT1, MCT2, MCT3 et MCT4). Ils assurent le transport d'acides carboxyliques au travers de la membrane cellulaire de manière bidirectionnelle et couplée à un proton (cotransporteurs). Ces différentes molécules ont une spécificité variable pour le lactate par rapport aux autres acides carboxyliques et il semble que MCT4 ait

un rôle majeur dans le transport du lactate(61). En effet, Gerlinger a mis en évidence sur des lignées cellulaires de cancer rénal à cellules claires que l'extinction du gène codant pour MCT4 était délétère pour le maintien du transport transmembranaire de lactate et de la production énergétique cellulaire.

Chez l'homme, les MCT1 et 4 sont présents sur la membrane du sarcolemme(62). La capacité de transport du lactate au niveau musculaire par les MCT est inductible par l'exercice physique(63) et l'hypoxie(64). A l'inverse, Borthaku(65) a montré sur des cultures cellulaires de cancer colorectal qu'*Escherichia coli* entéropathogène était responsable d'une diminution de l'expression de MCT1. Actuellement les MCT font l'objet d'un effort de recherche important en oncologie car ils sont surexprimés dans un certain nombre de types histologiques et leur inactivation semble pouvoir perturber le fonctionnement cellulaire de certains cancers(66).

Les transporteurs monocarboxylates couplés au sodium ont été décrits plus récemment(67). Deux sous-types sont actuellement identifiés SMCT1 et SMCT2. Encore une fois, ces familles moléculaires sont l'objet de variation d'expression au cours de certains types de cancérogénèses et constituent des cibles potentielles d'impacts thérapeutiques.

3.2. Rôle du lactate dans les différents types de métabolisme tissulaire

3.2.1. Lactate et muscle squelettique

Le muscle squelettique peut à la fois consommer et produire du lactate. Son statut global (producteur ou consommateur) va dépendre :

- du niveau d'activité musculaire,
- de la période post-prandiale ou non de l'organisme.

Au repos, le muscle squelettique est perçu comme un producteur de lactate bien qu'aucun argument physiologique ne le démontre avec certitude.

Ahlborg(68) a ainsi montré chez le volontaire sain par cathétérisme sélectif veineux et artériel de membre que l'efflux veineux de lactate était plus important que l'influx artériel. Ces techniques n'étudient cependant pas le muscle squelettique spécifiquement mais toute la production du membre cathétérisé (vaisseaux, tissus adipeux, musculaire, osseux et cutané). De manière plus sélective, Muller(69) a retrouvé chez des volontaires sains au repos une concentration de lactate plus importante dans le liquide interstitiel du muscle fémoral que dans le plasma. Cette constatation pourrait également s'expliquer par des différences de niveau d'activité des transporteurs monocarboxyliques entre cellules endothéliales et sarcolemmales plutôt que par un gradient d'efflux de la cellule musculaire vers le plasma.

A l'effort musculaire intense, Juel(70) a retrouvé une augmentation d'un facteur 30 de la quantité de lactate sur des biopsies musculaires quadricipitales. Cette production musculaire de lactate à l'effort, une fois transportée au niveau plasmatique pourra être utilisée comme substrat pour la production énergétique oxydative par le myocarde(71), le cerveau(72) et les muscles au repos(73).

Durant le sepsis, la capacité de métabolisation musculaire du lactate est diminuée par baisse d'activité de la PDH(74). Cette baisse d'activité est médiée par une augmentation de l'activité de l'enzyme PDHkinase(75) qui va par phosphorylation de la PDH diminuer son activité de décarboxylation du pyruvate.

3.2.2. Lactate et myocarde

De la même manière que pour le muscle squelettique, le myocarde est à la fois sécréteur de lactate et consommateur de lactate par rapport au compartiment systémique(76). A l'inverse du muscle squelettique, le myocarde possède une balance globale en faveur de la consommation. Les travaux de Bergman(77) chez le volontaire sain ont permis de montrer qu'au repos et à l'effort le myocarde est globalement responsable d'une consommation de lactate du secteur plasmatique. Ces travaux ont été réalisés grâce à une cathétérisation artérielle et du sinus coronaire permettant de réaliser un dosage comparatif du taux de lactate ainsi que des débits sanguins.

Le lactate extrait par le myocarde permet d'alimenter la production énergétique oxydative comme a pu le confirmer Gertz(71) chez le volontaire sain par méthode radioisotopique.

3.2.3. Lactate et foie

Le foie est responsable d'une consommation importante de lactate plasmatique en situation physiologique. Cette notion est connue par les physiologistes depuis longtemps car le foie utilise le lactate comme substrat pour la néoglucogenèse, dans le cadre notamment du cycle de Cori. Ce cycle revêt une importance fondamentale car le rendement énergétique de la glycolyse anaérobie (deux molécules d'ATP pour une molécule de glucose) est beaucoup faible que l'oxydation phosphorylante aérobie (36 molécules d'ATP pour une molécule de pyruvate). En conséquence, dans les situations de métabolisme anaérobie, le rendement énergétique de chaque molécule de glucose est faible et la non consommation du lactate résiduel serait une source de déperdition énergétique majeure pour l'organisme(78).

La consommation hépatique de lactate dans le cadre de la néoglucogenèse est influencée négativement par l'insuline et positivement par l'adrénaline(79) ou l'activité physique.

De manière plus globale, une acidification du milieu intracellulaire hépatocytaire, comme cela peut être le cas en situation de choc, est responsable d'une diminution de la consommation de lactate par l'hépatocyte. Cette notion a été mise en évidence par Lloyd il y a déjà fort longtemps sur un modèle expérimental de foie perfusé(80). Cette équipe a mis en évidence une diminution de la captation de lactate par le foie perfusé lorsque le pH intracellulaire diminuait (Figure 17). Il apparaît donc que dans un état de choc avec présence d'une acidose métabolique, la clairance hépatique du lactate soit diminuée, ce qui peut contribuer à l'hyperlactatémie observée.

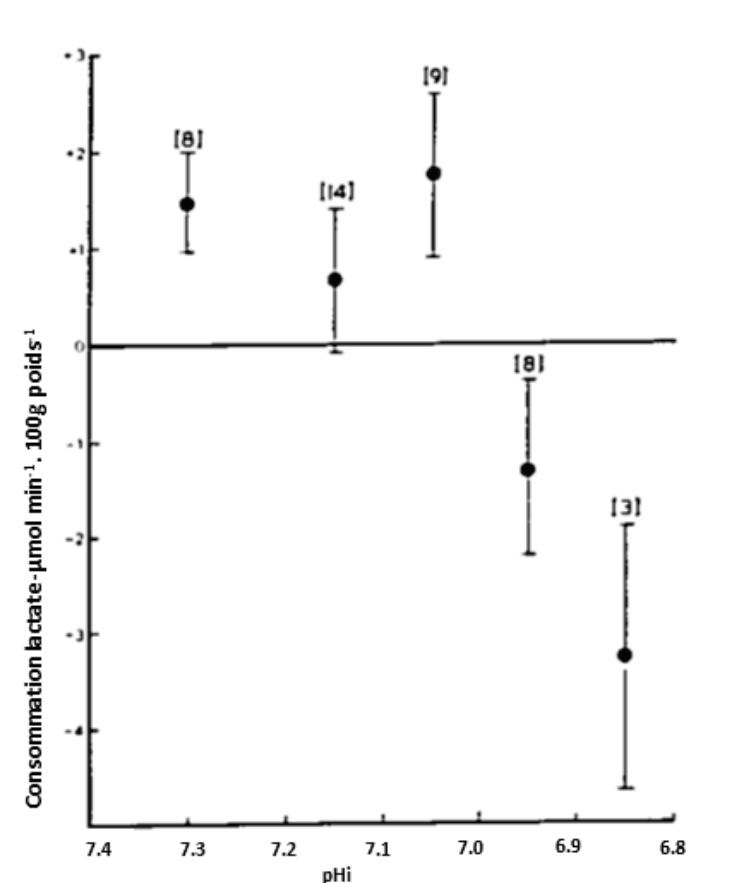


Figure 17 : Evolution de la captation hépatique de lactate en fonction du pH intracellulaire (pHi) sur un modèle murin de foie perfusé [Lloyd(80)].

Une hépatopathie peut également expliquer une baisse de la clairance plasmatique de lactate. Ainsi, une dysfonction hépatique majeure aiguë telle que dans les hépatites fulminantes(81) ou chroniques(82) est responsable d'une accumulation plasmatique de lactate par diminution de sa clairance.

Vary(74) a pu mettre en évidence que le sepsis était responsable d'une diminution de l'activité de la PDH, diminuant ainsi la capacité de clairance du lactate par décarboxylation du pyruvate en oxaloacétate.

3.2.4. Lactate et cerveau

Au repos, le cerveau est globalement sécréteur de lactate(83). Cependant, lorsque la concentration artérielle en lactate arrivant au niveau cérébral augmente, l'extraction cérébrale augmente(84). Par méthode radioisotopique, Boumezbeur(85) a estimé la part maximale du lactate parmi les substrats énergétiques plasmatiques jusqu' 60%.

A l'inverse, le cerveau peut redevenir sécréteur de lactate dans certaines situations pathologiques telles que l'hypoxie(72).

3.2.5. Lactate et rein

Le métabolisme du lactate par le rein est très similaire à celui du foie. Le rein est responsable d'une néoglucogenèse à partir du lactate(76). Cette néoglucogenèse est elle aussi influencée positivement par l'adrénaline et négativement par l'insuline.

La figure 18 résume le métabolisme du lactate dans les différents organes.

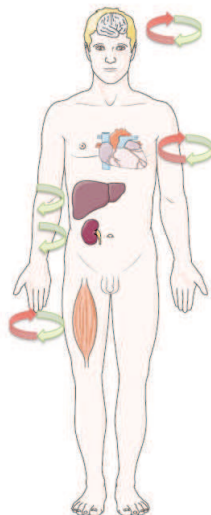


Figure 18 : Métabolisme du lactate systématisé par organe

Flèche verte : consommation de lactate ; flèche rouge : production de lactate.

3.2.6. Lactate et placenta

Les travaux de Piquard(86) ont suggéré une production de lactate fœtal en fin de grossesse ainsi qu'un métabolisme partiel de cette production par le placenta.

3.3. Place actuelle du dosage de lactate pour détecter une hypoxie tissulaire en clinique

3.3.1. Physiopathologie de l'hyperlactatémie lors d'une hypoxie tissulaire

3.3.1.1. Rôle de l'hypoxie tissulaire

Il est communément admis que la production de lactate est globalement augmentée en situation d'hypoxie tissulaire(87). Cette hypoxie tissulaire peut s'expliquer par différents mécanismes en fonction de la pathologie sous-jacente.

- **Présence d'une altération de la délivrance en oxygène présente au niveau macrocirculatoire**

Cette notion constitue le concept de dette d'oxygène(88, 89). En effet, la délivrance artérielle global en oxygène de l'organisme (DO_{2i}) peut être calculée à partir du produit des mesures de l'index cardiaque (IC) et de la contenance artérielle en oxygène (CaO_2) :

$$DO_{2i} = IC * CaO_2 * 10 \quad (\text{avec IC en l/min/m}^2 \text{ et } CaO_2 \text{ en ml/dl})$$

où CaO_2 correspond à :

$$CaO_2 = (1,34 * Hb * SaO_2) + (PaO_2 * 0,0031) \quad (\text{avec Hb en g/dl, } PaO_2 \text{ en mmHg et } SaO_2 \text{ en } \%).$$

De la même manière, la consommation de l'organisme en oxygène (VO_{2i}) peut se calculer par le produit de l'index cardiaque par la différence entre le contenu artériel et veineux en oxygène ($C(a-v)O_2$) :

$$VO_{2i} = IC * C(a-v)O_2$$

où

$$C(a-v)O_2 = CaO_2 - CvO_2 \\ = (1,34 * Hb * SaO_2) + (PaO_2 * 0,0031) - (1,34 * Hb * SvO_2) + (PvO_2 * 0,0031)$$

(avec Hb en g/dl, PxO_2 en mmHg et SxO_2 en %)

La consommation en oxygène de l'organisme varie en fonction de nombreux paramètres physiologiques et pathologiques. Lorsque la DO_2 diminue en dessous du seuil de VO_2 minimale nécessaire, appelée DO_2 critique, une dette d'oxygène s'installe(90). Cette dette d'oxygène qui peut avoir de multiples étiologies (diminution de l'oxygénation artérielle, du débit cardiaque, du taux d'hémoglobine par exemple) est fréquemment associée à une augmentation du taux de lactate. En effet, comme nous l'avons déjà décrit précédemment, en situation d'hypoxie, le métabolisme énergétique oxydatif n'étant plus fonctionnel par manque d'oxygène, le pyruvate issu de la glycolyse va s'accumuler(76). Ce pyruvate sera transformé en lactate par la LDH.

Cependant la modélisation du lien entre niveau de dette d'oxygène et taux de lactate systémique est probablement plus complexe qu'une simple relation linéaire inversée (figure 19) telle que classiquement décrite(90, 91).

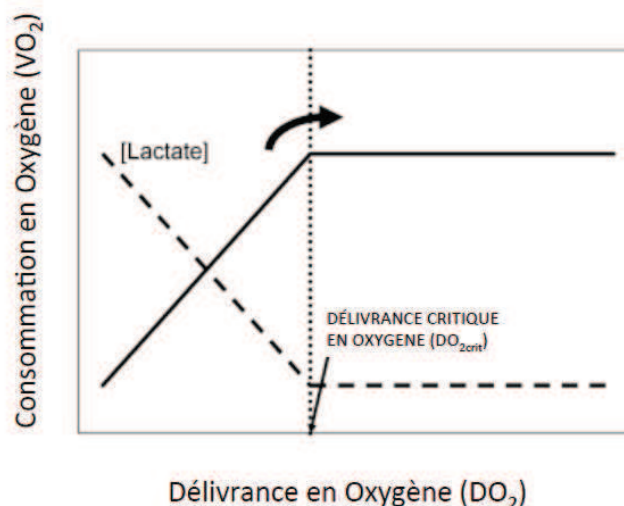


Figure 19 : Couplage entre délivrance et consommation d'oxygène par l'organisme

[Barbee(90)].

En effet, l'approche macrocirculatoire, telle que décrite par le concept de dette d'oxygène ne tient pas compte des perturbations pouvant survenir au niveau microcirculatoire.

- **Altération de la microcirculation**

Cette notion de microcirculation défaillante permet d'expliquer que dans certaines situations, notamment au décours du choc septique, on puisse observer des signes d'hypoxie tissulaire malgré une restauration des paramètres d'oxygénation macrocirculatoire(92). L'altération de la microcirculation dans ces situations a pu être confirmée par des méthodes d'imagerie spectrale polarisée orthogonale(93). De plus, une augmentation du gradient d'oxygène entre la microcirculation sereuse iléale et le réseau veineux au décours du choc hémorragique expérimental(94) a été retrouvée par Sinaasappel, ce qui corrobore la contribution d'une altération de la microcirculation à l'hypoxie tissulaire dans certaines situations pathologiques.

3.3.1.2. Autres éléments pathogéniques

La relation liant de manière quasiment proportionnelle, hypoxie tissulaire et taux de lactate est une considération historique. En effet, le confinement du lactate au sein d'une « impasse métabolique » de la filière énergétique anaérobie n'est plus valide eu égard aux découvertes successives sur le rôle métabolique du lactate(76).

De plus, cette conception ne permet pas d'expliquer certaines constatations. La pression tissulaire en oxygène peut ne pas être diminuée dans certains états de choc associés à une hyperlactatémie. Boekstegers(95) a pu montrer chez l'homme en plaçant des électrodes polarographiques intramusculaires chez des patients en sepsis, des patients présentant une infection sans retentissement systémique et des patients en état de choc cardiogénique, que la pression en oxygène intramusculaire était augmentée dans le groupe sepsis. Il est donc nécessaire d'envisager d'autres mécanismes expliquant une hyperlactatémie et qui sont susceptibles d'interférer avec le rôle du lactate comme biomarqueur d'hypoperfusion tissulaire.

- **Stimulation de la glycolyse en situation aérobie**

Ce phénomène complexe est responsable d'une augmentation de la glycolyse et donc de la production de lactate alors même que la cellule n'est pas en hypoxie(96). Gore a mis en évidence ce phénomène dans une population de patients en sepsis sévère en utilisant une méthode de traceurs métaboliques isotopiques pour évaluer le métabolisme glycolytique et oxydatif(97). Il a pu montrer que la perfusion de dichloroacétate qui augmente l'oxydation du pyruvate permettait de diminuer l'hyperlactatémie par augmentation de la consommation de pyruvate du système

oxydatif. Il n'y avait donc pas d'hypoxie tissulaire directement responsable de l'hyperlactatémie. Plusieurs mécanismes peuvent contribuer à ce phénomène :

- Expérimentalement, le sepsis est responsable d'une modification phénotypique du système de transport de glucose avec une surexpression d'ARN messenger codant pour le transporteur membranaire du glucose GLUT-1(98) au niveau hépatique, musculaire et graisseux bien que les effets sur le phénotype protéique(99) ne soient pas aussi franc.
- D'autres voies de production du pyruvate peuvent être activées, notamment à partir de la protéolyse musculaire(100).
- La modulation de l'activité de l'échangeur ionique transmembranaire Na^+/K^+ ATPase par l'adrénaline influe sur le niveau d'activité de la cascade glycolytique. Plusieurs études ont montré un couplage entre la production d'ATP glycolytique à proximité de la Na^+/K^+ ATPase membranaire musculaire et le niveau d'activité de cet échangeur. Ce couplage compartimentalisé à l'échelle cellulaire est médié par l'AMPc (Figure 20). En effet, l'adrénaline va activer le récepteur membranaire β -adrénergique, ce qui va augmenter la production d'AMPc intracellulaire. Cette AMPc va augmenter l'activité de la glycogénolyse et de la filière glycolytique entraînant une augmentation de la production d'ATP. L'ATP produite permettra notamment d'alimenter en énergie l'activité de l'échangeur transmembranaire Na^+/K^+ ATPase dont le niveau de fonctionnement est également stimulé par le couplage adrénaline/ récepteur β -adrénergique membranaire.

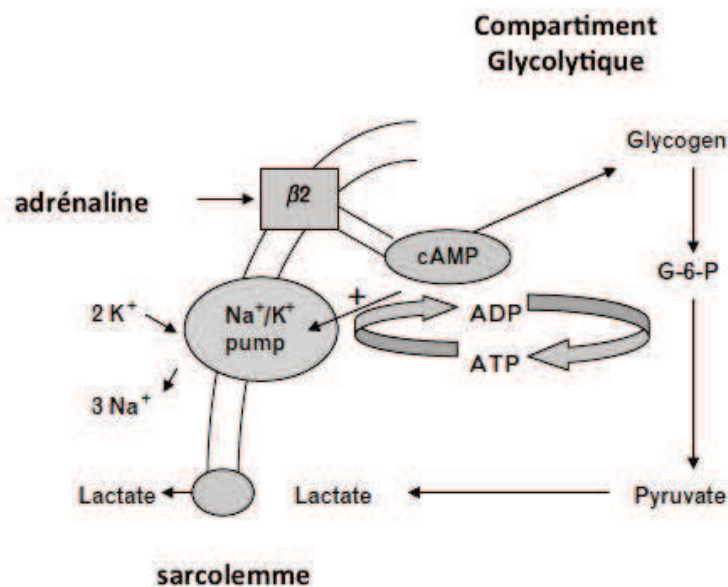


Figure 20 : Filière énergétique liée à l'activation de l'échangeur transmembranaire Na^+/K^+ par le récepteur β_2 adrénérique. G-6-P : glucose 6 phosphate. [Levy(100)].

Ce mécanisme a été conforté par le travail de Levy qui a, dans une cohorte de patients en choc septique, retrouvé une concentration interstitielle musculaire en lactate par microdialyse supérieure à la concentration artérielle. De plus, l'adjonction dans le perfusat de microdialyse de ouabaine (un inhibiteur de la Na^+/K^+ ATPase) entraînait une baisse significative de la concentration interstitielle musculaire en lactate (figure 21).

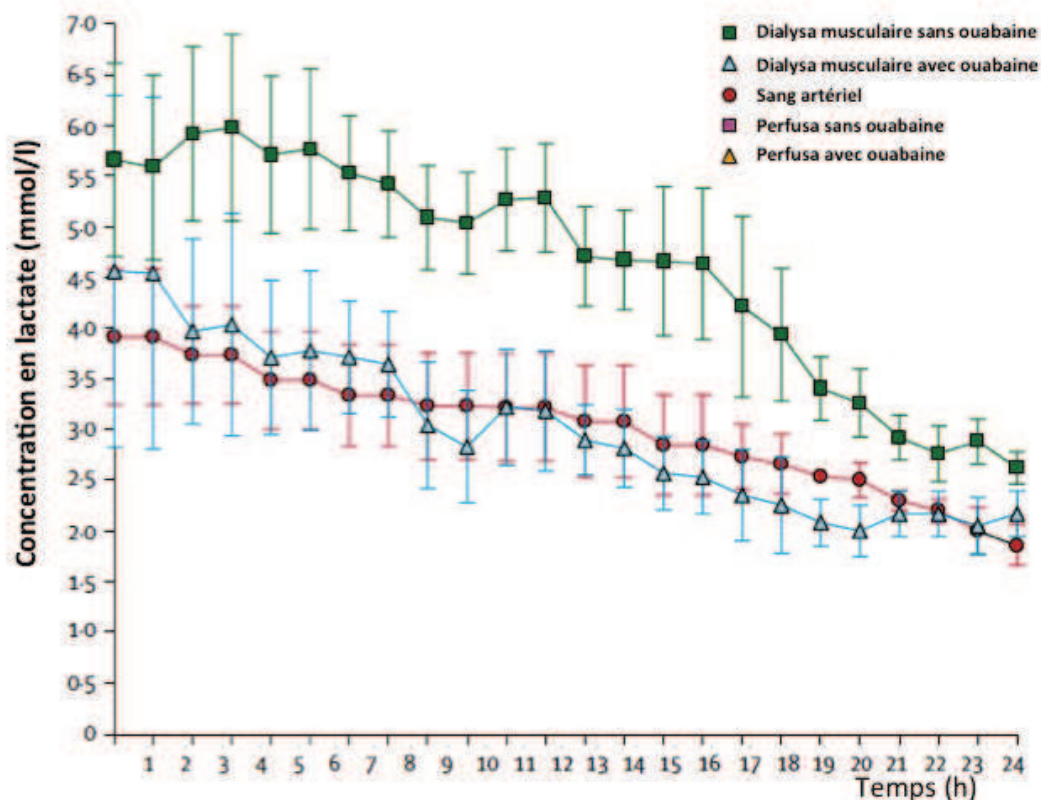


Figure 21 : Concentration en lactate chez 12 patients en choc septique durant 24 heures [Levy(101)].

▪ Altération de la clairance tissulaire du lactate

Comme nous l'avons décrit précédemment, dans certaines situations pathologiques telles que le sepsis, la clairance tissulaire du lactate notamment musculaire et hépatique est diminuée par diminution du niveau d'activité de la PDH(74). La phosphorylation de la PDH par la PDH kinase entraîne une baisse de la décarboxylation du pyruvate qui constitue une des voies de catabolisme du lactate après sa conversion en pyruvate.

Llyod(80) avait également montré sur des travaux de foie perfusé qu'une acidification du milieu intracellulaire hépatique était responsable d'une diminution de la clairance hépatique en lactate. L'acidose métabolique, retrouvée dans beaucoup de situations correspondant à un état de choc contribue donc à une altération de la capacité de métabolisation du lactate par le tissu hépatique.

3.3.2. Pertinence clinique actuelle de la lactatémie pour la prise en charge des hypoxies tissulaires

En conséquence des différents phénomènes que nous venons de décrire, au décours des situations d'altération globale de la perfusion tissulaire telle que dans les états de choc, la production augmentée et l'élimination diminuée entraînent une augmentation du taux de lactate systémique dosable au niveau artériel ou veineux.

De ce fait, le lactate peut, dans ces situations d'hypoperfusion globale, servir d'élément pronostic et thérapeutique.

3.3.2.1. Hypoxie tissulaire et valeur pronostique du taux de lactate

Pour le réanimateur, le lactate constitue depuis fort longtemps un marqueur de gravité global à l'admission en réanimation.

Ainsi, dans une cohorte de 87 patients en choc septique, Bakker(102) (Figure 22) a pu montrer que l'aire sous la courbe de lactate systémique en fonction du temps était corrélée avec la survenue de défaillances d'organes selon un score cumulatif de défaillance d'organe (respiratoire, rénale, hépatique et hémostasie).

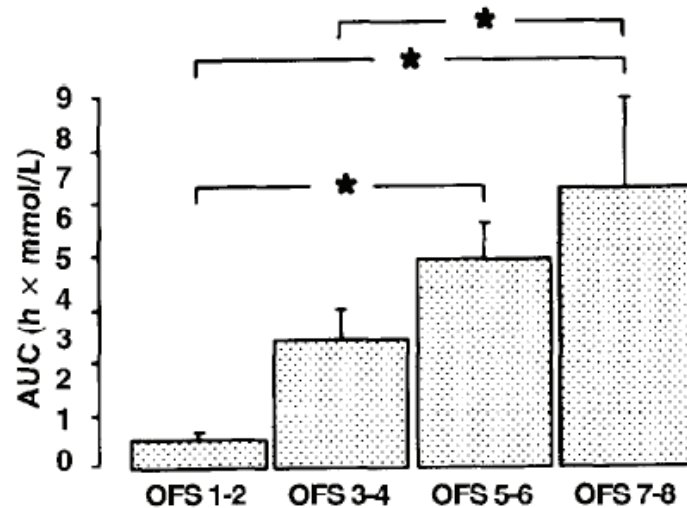


Figure 22 : Aire sous la courbe (AUC) du taux de lactate systémique en fonction du temps catégorisée par niveau de score de défaillance d'organe (OFS) chez 87 patients en choc septique. [Bakker(102)].

La première justification étiopathogénique de la corrélation entre augmentation du taux de lactate systémique et survenue d'une défaillance d'organe est la survenue d'une hypoxie tissulaire constatée lors des états de choc. Comme nous l'avons vu précédemment, cette hypoxie est causée par une altération de la délivrance tissulaire macrocirculatoire en oxygène(102). Cependant dans les états de choc, l'hypoxie tissulaire par défaillance macrocirculatoire n'est actuellement plus considérée comme le seul élément étiologique de l'hyperlactatémie.

En effet, une augmentation du taux de lactate même accompagnée d'une normalisation des paramètres macrocirculatoires est associée à une agression tissulaire avec altération de la régulation inflammatoire, oxydative et énergétique. Cette agression peut engendrer une ou plusieurs défaillances viscérales, prélude au décès par défaillance multiviscérale.

Ainsi, Claridge(103) a étudié une cohorte de patients polytraumatisés en hypoperfusion occulte (taux de lactate systémique augmenté sans signes macro hémodynamiques de choc). Il a ainsi pu montrer que cette augmentation du taux de lactate persistante malgré la correction macro hémodynamique était associée à une augmentation de la survenue de complications infectieuses et une augmentation de la mortalité (Figure 23).

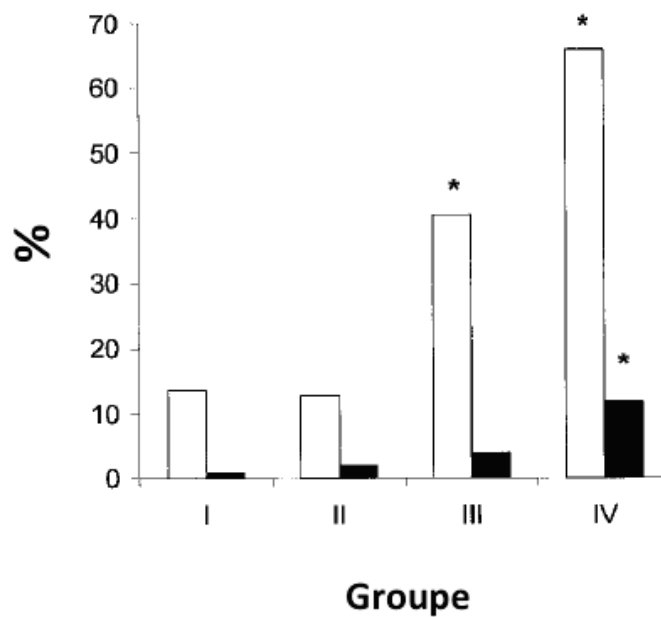


Figure 23 : Taux d'infection (barres blanches) et de mortalité (barres grises) en fonction de la durée d'hypoperfusion occulte

Groupe II : moins de 12h, groupe III : entre 12 et 24h, groupe IV : après 24 heures. Le groupe I correspond au groupe sans hypoperfusion occulte. * = $p < 0,05$ par rapport aux autres groupes. [Claridge(103)].

Par exemple, chez le polytraumatisé, Dunne(104) a déterminé sur une cohorte de 15 000 patients hospitalisés dans un trauma-center pour polytraumatisme que le taux de lactate supérieur à 6 mmol.l^{-1} à l'admission constituait un facteur prédictif de mortalité et de durée d'hospitalisation. Ainsi, dans le contexte du polytraumatisme, en routine clinique, la pertinence du lactate est pour les valeurs pathologiques un élément d'évaluation et de triage en plus du contexte et du bilan lésionnel.

Afin d'affiner encore plus la pertinence pronostique du lactate à l'admission du polytraumatisé, Abramson(105) a proposé d'évaluer la variation sur 48h du taux de lactate. Il a ainsi retrouvé 14 % de survie sur une cohorte de patients n'ayant pas normalisé leur taux de lactate systémique sur 48 heures contre 100 % de survie pour les patients ayant normalisé leur taux de lactate systémique en moins de 24 heures.

Ces constatations, valides sur le plan statistique sont cependant peu adaptées à l'usage clinique puisque l'échelle de temps, décisive dans la prise en charge des patients traumatisés et/ou en choc hémorragique, repose sur les toutes premières heures.

Ainsi, Régnier(106) a étudié la valeur pronostique de la clairance du lactate sur les 2 et 4 premières heures après l'admission en unité de déchoquage. Sur une cohorte de 586 patients, les auteurs ont retrouvé une pertinence de la variation du taux de lactate pour prédire la mortalité globale (Figure 24) permettant une amélioration de la capacité discriminante des scores évaluant le risque de mortalité globale tels que le score Mechanism, Glasgow Coma Scale, Age and Arterial Pressure (M.G.A.P.) et le Trauma Related Injury Severity Score (T.R.I.S.S.).

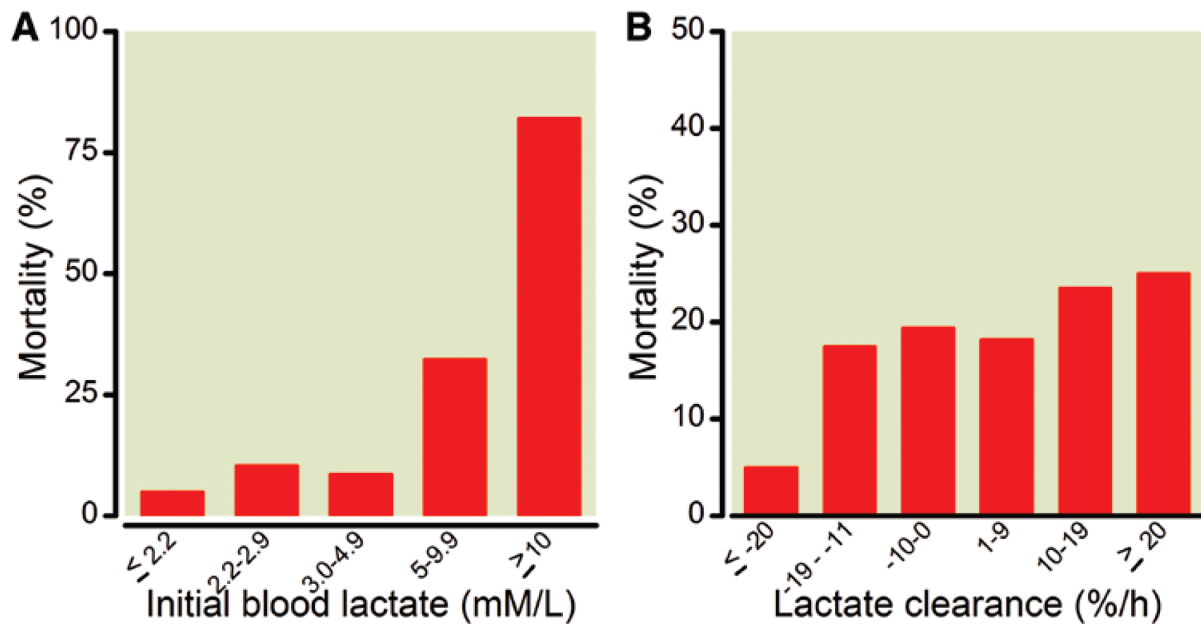


Figure 24 : Proportion de mortalité en fonction du taux de lactate initial (A) ou de la clairance du lactate (B) [Régnier (106)].

Cependant, il convient de considérer que dans cette étude la variation du taux de lactate :

- avait un effet plafond en terme de prédiction de mortalité à partir de moins de 20% de diminution du taux de lactate,
- n'était pertinente que lors de son évaluation précoce (à l'admission) (Figure 25). En effet, la variation entre 2 et 4h après l'admission ne fût pas corrélée à la variation entre 0 et 2 heures.

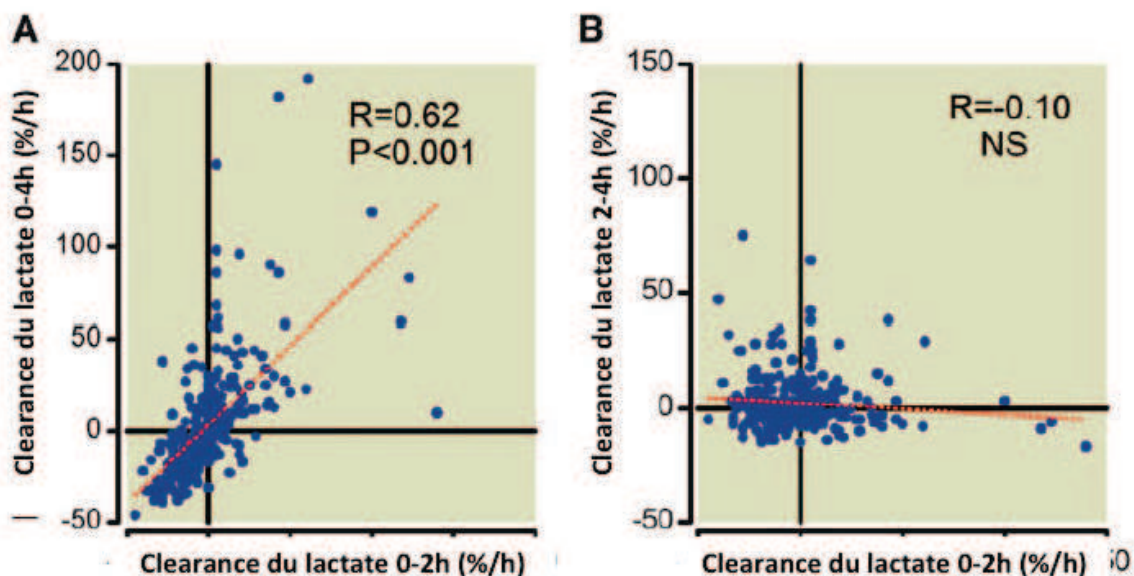


Figure 25 : Corrélation entre les mesures séquentielles du lactate entre 0-2h, 0-4h et 2-4h

Ligne pointillée rouge : courbe de régression linéaire. R : coefficient de corrélation NS : non significatif.

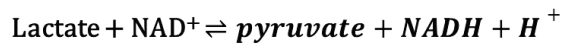
Les mêmes constatations ont été faites pour le sepsis sévère(107), la période post arrêt cardiaque(108), en post opératoire de chirurgie cardiaque(109) et hépatique(110).

Ainsi, une lactatémie supérieure ou égale à 4 mmol.l⁻¹ constitue pour les recommandations de la surviving sepsis campaign(111) un élément de gravité imposant en plus de l'antibiothérapie, l'instauration d'une réanimation hémodynamique sans délai.

De la même manière, les recommandations formalisées d'experts de la Société Française d'Anesthésie-Réanimation « Recommandation sur la réanimation du choc hémorragique » de 2014(112) soulignent que le lactate constitue « un marqueur indirect de degré d'hypoperfusion tissulaire et de la sévérité des états de choc ».

Pour certains, le ratio lactate/pyruvate a été proposé comme marqueur d'hypoxie tissulaire(58, 78). Lactate et pyruvate sont reliés par un équilibre d'oxydo-réduction catalysé par l'enzyme LDH avec le NAD et NADH comme cofacteurs (Figure X).

Le rapport lactate/pyruvate est donc selon la loi d'action de masse proportionnel au ratio NADH/NAD. Le ratio NADH/NAD permettrait d'évaluer l'apport en oxygène au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale qui va lors de son fonctionnement normal en présence d'oxygène réduire le NADH en NAD. Une hypoxie va donc augmenter la ration NADH/NAD en limitant l'oxydation de NAD.



$$\frac{[\text{lactate}]}{[\text{pyruvate}]} = \frac{[\text{NADH}]}{[\text{NAD}^+]} k [\text{H}^+]$$

Cependant, cette approche de l'oxygénation tissulaire par le rapport lactate/pyruvate présente plusieurs approximations :

- Le rapport entre NADH/NAD et l'apport en oxygène mitochondrial ne s'applique que lors de l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la chaîne respiratoire mitochondriale.
- La relation qui lie lactate/pyruvate et NADH/NAD est dépendante de la concentration en proton qui n'est pas strictement constante au cours du temps et particulièrement en situation d'hypoxie(59).
- Le rapport lactate/pyruvate n'est pas homogène en fonction du lieu intracellulaire et intratissulaire.

Dans l'ensemble de ces travaux évaluant le lactate comme élément pronostic, le dosage était effectué au niveau systémique sur prélèvement artériel ou veineux. Or dans certaines situations, une hyperlactatémie était associée à un déficit d'apport tissulaire en oxygène(102) tandis que dans d'autres cas, cette constatation n'était pas valide. Dans le travail de Levy(101) évaluant la concentration interstitielle musculaire et systémique en lactate parmi une cohorte de patients en choc septique, malgré une hyperlactatémie systémique, la pression intra tissulaire en oxygène n'était pas altérée.

Il apparaît donc que du fait de son origine métabolique diversifiée, l'hyperlactatémie systémique ne saurait être obligatoirement considérée comme un biomarqueur d'hypoxie tissulaire. D'autres facteurs, comme par exemple la stimulation β_2 adrénergique, sont susceptibles d'expliquer une hyperlactatémie. Il convient donc d'évaluer la part de l'augmentation du taux de lactate systémique médiée par l'hypoxie en fonction des types de situations pathologiques étudiées.

3.3.2.2. Hypoxie tissulaire et utilisation clinique du taux de lactate

Comme nous l'avons vu précédemment, le taux de lactate systémique est susceptible d'augmenter de manière significative des suites d'une hypoxie tissulaire. En conséquence, sa variation est susceptible de refléter l'efficacité d'une prise en charge thérapeutique visant à restaurer une normoxie tissulaire.

Ainsi Jones(113) a pu confirmer ce concept avec une étude clinique évaluant la non infériorité de la clairance du lactate systémique par rapport à la SCVO₂ comme objectif d'oxygénation tissulaire pour la

prise en charge initiale, aux urgences, des patients en sepsis sévère ou choc septique. Le protocole de soins de cette étude contenait en plus de l'antibiothérapie et des prélèvements bactériologiques :

- une correction de la précharge dépendance telle que la pression veineuse centrale (PVC) soit supérieure à 8 mmHg par un remplissage vasculaire,
- une optimisation de la pression de perfusion tissulaire telle que la pression artérielle moyenne (PAM) soit supérieure à 65 mmHg par perfusion de vasoconstricteurs tels que la dopamine ou la noradrénaline,
- une optimisation de l'oxygénation tissulaire telle que
 - la clairance du lactate soit supérieure ou égale à 10 % ou le taux de lactate soit normal à deux reprises successives,
 - la SCVO₂ soit supérieure ou égale à 70 %.

Les interventions utilisées pour optimiser l'oxygénation tissulaire étaient pour un hémocrite inférieur à 30 % une transfusion de globules rouges et pour les hémocrites supérieurs à 30 % la perfusion de dobutamine.

300 patients en sepsis sévère ou choc septique ont été inclus dans cette étude multicentrique. Les résultats n'ont pas montré de différence entre chacun des groupes de l'étude (clairance du lactate ou SCVO₂) en ce qui concerne le taux de mortalité (17,11-24% vs 23,17-30%, respectivement).

Cette étude confirme le potentiel d'utilisation du dosage du lactate comme élément d'une stratégie thérapeutique pour guider l'oxygénation tissulaire.

Le dosage du lactate, dans les situations d'hypoxie tissulaire comporte donc un intérêt potentiellement supérieur à la simple évaluation pronostique. Il pourrait permettre de guider la thérapeutique à objectifs macrocirculatoires. Cependant, ce concept nécessite d'être confirmé dans chaque entité pathologique du fait de la contribution potentielle de mécanismes non hypoxiques à l'hyperlactatémie. Par exemple, les résultats du travail de Jones dans une population en sepsis sévère ou choc septique ne seraient peut être pas extrapolables à une population en choc hémorragique.

En ce qui concerne l'ischémie périphérique par insuffisance circulatoire, le dosage du lactate n'a jamais été utilisé comme élément pronostic ou thérapeutique. En effet, le dosage conventionnel du lactate nécessitant plusieurs millilitres de sang, il n'est pas possible techniquement de recueillir cette quantité de sang dans un membre ou un tissu qui n'est plus alimenté par un flux artériel.

Récemment, le développement de dispositif de mesure du lactate sur quelques microlitres permet un dosage du lactate sur une goutte de sang capillaire permettant d'envisager une utilisation du dosage de lactate sur des tissus en ischémie aiguë.

Nous allons voir dans la suite de ce travail les caractéristiques du dosage capillaire du lactate.

3.4. Dosage capillaire du lactate

Les progrès de la maîtrise des techniques de biosenseurs électrochimiques ont permis l'élaboration de dispositifs de mesure de la concentration de lactate dans une solution de quelques microlitres pour une durée d'analyse de quelques secondes. Ces biosenseurs ont pu être miniaturisés dans des lecteurs portatifs utilisant des bandelettes réactives.

Il existe sur le marché, plusieurs dispositifs reposant sur le principe de l'ampérométrie(114). Une réaction enzymatique utilisant le lactate comme substrat est catalysée par une enzyme présente dans la bandelette de mesure, le plus souvent la lactate oxydase et les produits de cette réaction produiront une modification de la tension électrique mesurée par le dispositif au sein de la solution. Cette variation de tension électrique conduira à une estimation de la quantité de lactate présente initialement dans la solution.

Par exemple, pour le dispositif Lactate Pro® (Arkray, Japon), les bandelettes réactives contiennent du ferricyanide de potassium et de la lactate oxydase, ce qui va en présence de lactate catalyser la formation

de ferroxyanide de potassium et de pyruvate. Lors de l'application d'une différence de potentiel à la solution, le ferrocyanide est oxydé produisant un flux électronique. Ce flux électronique est quantifié de manière ampérométrique et son intensité sera proportionnelle à la concentration initiale en lactate de la solution(115).

Ces dispositifs ont été développés initialement pour l'évaluation du bien être fœtal en salle de naissance(116) et la détermination du seuil lactique, correspondant à la capacité physique maximale aérobie(117) en médecine du sport.

En ce qui concerne l'évaluation du bien être fœtal par détermination de la lactatémie au scalp, Nordstrom(116) a pu montrer sur une série de 177 parturientes que la lactatémie au scalp du fœtus était corrélée avec le taux de pH et de lactate prélevé au niveau de l'artère ombilicale.

En physiologie du sport, le dosage capillaire du lactate est utilisé pour évaluer son degré d'optimisation énergétique durant un effort(117). En effet, lors d'effort d'intensité progressivement croissante, il existe un seuil de puissance à partir duquel le taux de lactate systémique va augmenter. Ce niveau de puissance minimum est appelé seuil lactatique(118). La signification physiologique de cette accumulation du lactate systémique est encore l'objet d'un débat parmi les physiologistes du sport mais il semble qu'un déséquilibre entre production musculaire et capacité de clairance, à partir d'un certain seuil de puissance, constitue le substratum métabolique. La corrélation entre l'augmentation de ce seuil et la performance athlétique est reconnue comme supérieure à la consommation maximale d'oxygène ($VO_2\text{max}$) par beaucoup d'équipes pour l'évaluation des capacités d'endurance d'un individu(117). Le seuil lactique permet également de mesurer l'intensité d'un exercice suivi par un athlète durant un entraînement(119).

L'utilisation du dosage capillaire de lactate pourrait posséder un intérêt pour :

- le monitoring de la perfusion d'un membre ou d'une anse digestive lors d'une insuffisance vasculaire en reflétant le métabolisme énergétique aérobie mitochondrial,
- le monitoring du degré de perfusion tissulaire lors d'un état de choc hémorragique toujours en reflétant le métabolisme énergétique aérobie mitochondrial.

Cependant ces concepts théoriques nécessitent d'être évalués. Cette évaluation est l'objet de ce travail expérimental.

MATERIELS ET METHODES

1. Modèles expérimentaux utilisés

Les manipulations expérimentales animales durant les études présentées ont respecté les recommandations ARRIVE(120) ainsi que les directives de la communauté européenne (2010/63/EU) concernant la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Les protocoles expérimentaux ont été validés par les comités d'éthique animale de nos structures (CREMEAS AL/02/21/12/09 et IRCAD 38.2012.01.031).

1.1. Animaux

1.1.1. Modèle murin

25 souris femelles *FVB* de phénotype sauvage âgées de 90 à 110 jours ont été étudiées dans notre modèle murin d'ischémie-reperfusion de membre (protocole 1).

Les animaux étaient élevés dans un environnement tempéré avec une période lumineuse de 12 heures par jour et un accès *ad libitum* à l'eau et la nourriture.

1.1.2. Modèle porcin

Dans le protocole de choc hémorragique (protocole 2), 20 porcs de type *large white* (26 ± 4 kg) ont été étudiés.

Dans le protocole d'ischémie intestinale (protocole 3), 6 porcs de type *large white* (38 ± 10 kg) ont été étudiés.

Les animaux étaient élevés dans un environnement tempéré avec une période lumineuse de 12 heures par jour et un accès *ad libitum* à l'eau et la nourriture excepté pour les 24 heures précédant l'expérimentation.

1.2. Protocoles anesthésiques

1.2.1. Modèle murin

Les souris étaient étudiées sous anesthésie générale. L'induction anesthésique avait lieu sur le mode inhalatoire en plaçant les animaux dans une cage ventilée avec un mélange oxygène-isoflurane 4% (Aerrane Baxter). L'entretien anesthésique était assuré par la mise en place d'un masque délivrant un mélange oxygène-isoflurane 2% en ventilation spontanée. Les animaux étaient placés sur une table chauffante (multistation temperature control unit, Minerve) réglée à 37°C. La fréquence cardiaque était monitorée par des électrodes précordiales (AD instruments).

A la fin de l'expérimentation, les animaux étaient sacrifiés sous anesthésie générale par dislocation atloïdo-axoïdienne.

1.2.2. Modèle porcin

Les porcs étaient également étudiés sous anesthésie générale.

Les animaux sont prémédiqués 1 heure avant l'induction anesthésique par une injection intramusculaire de kétamine (20mg.kg^{-1}) et azapérone (2mg.kg^{-1}). A l'arrivée au laboratoire expérimental, une voie veineuse périphérique (22G) était mise en place sur une veine auriculaire postérieure et une perfusion continue de sérum physiologique débutée.

L'anesthésie générale était alors induite par l'injection de propofol (3mg.kg^{-1}) et l'intubation trachéale (Portex Blue line 6 mm) était facilitée par l'injection de rocuronium (1mg.kg^{-1}). L'entretien de l'anesthésie était assuré par l'adjonction d'isoflurane dans les gaz inhalés (concentration de 2 %, Aysis care station, GE Healthcare). La ventilation mécanique était réalisée sur le mode volume contrôlé avec adaptation du volume minute afin d'obtenir une fraction télé expiratoire de CO_2 entre 35 et 45mmHg.

L'hydratation intraveineuse consistait en la perfusion de chlorure de sodium 9 pour 1000 à un débit de 6 ml par kg et par heure environ.

La normothermie était assurée par un monitoring œsophagien de la température centrale et par l'utilisation d'une couverture chauffante placée sous l'animal.

Le monitoring de la pression artérielle et les prélèvements sanguins étaient obtenus par mise en place d'un cathéter artériel en fémoral droit.

Le sacrifice des animaux était obtenu sous anesthésie générale profonde par injection d'une solution saturée en chlorure de potassium.

1.3. Protocoles expérimentaux

1.3.1. Ischémie-reperfusion expérimentale de membre et monitoring de la reperfusion musculaire par lactatémie capillaire (protocole 1)

Dans cette étude, nous avons formé deux groupes expérimentaux de souris sauvages :

- un groupe contrôle de 13 animaux soumis au protocole anesthésique mais sans ischémie,
- un groupe ischémie-reperfusion de 12 animaux soumis à 2 heures d'ischémie puis 2 heures de reperfusion.

L'ischémie était induite par la mise en place d'un garrot en racine de cuisse gauche. Le garrot était constitué par un fil de suture enroulé autour de la cuisse de l'animal et clampé par une pince de Kocher. La procédure de clampage était systématiquement réalisée par le même opérateur et l'ischémie confirmée par la cyanose et la perte de pouls pulpaire au niveau plantaire.

Après 2 heures d'ischémie, la reperfusion était réalisée par déclampage de la pince de Kocher et retrait du fil.

La lactatémie capillaire était mesurée avant mise en place du garrot au niveau systémique (patte arrière droite) puis, après 2 heures d'ischémie et après 2 heures de reperfusion :

- au niveau de la patte arrière droite (mesure systémique),
- au niveau de la patte arrière gauche (mesure ischémique).

La zone de prélèvement capillaire de patte était située au niveau de la voûte plantaire.

L'évaluation du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale par méthode oxygraphique était réalisée au niveau du muscle gastrocnémien au niveau de la patte arrière droite chez les animaux contrôles et au niveau de la patte arrière droite (non ischémisée) et gauche (ischémisée) à la fin des deux heures de la période de reperfusion.

1.3.2. Choc hémorragique et monitoring de l'hypoperfusion musculaire par la lactatémie (Etude Hemocho, protocole 2)

Dans cette étude, tous les animaux étudiés (20 porcs *Large White*) ont été placés en choc hémorragique par soustraction sanguine jusqu'à obtention d'une PAM cible de 40 ± 5 mmHg et maintenus à ce niveau de PAM durant 120 minutes (Figure 26).

A l'issue de ces 120 minutes, une réanimation volémique à objectif de PAM (90 % PAM initiale) était réalisée par perfusion de colloïdes : albumine 4 %, Vialebex®, LFB Biomédicaments, n=10 ou HEA 130/0,4, Voluven®, Fresenius, n=10 attribués de manière randomisée.



Figure 26 : Modèle expérimental de choc hémorragique utilisé dans l'étude Hemocho

PAM = pression artérielle moyenne, BL = PAM initiale.

Le dosage du lactate était réalisé à T0, T1, T2 et T3 :

- sur sang artériel,
- sur sang capillaire par ponction du groin,
- par spectroscopie HR-MAS sur biopsie musculaire.

L'évaluation du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale par méthode oxygraphique était réalisée de manière extemporanée sur biopsie du muscle gastrocnémien à T0, T1, T2 et T3.

L'évaluation de la production d'anion superoxyde était évaluée sur sang artériel et veineux ainsi que sur biopsies tissulaires gastrocnémiennes à T0, T1, T2 et T3 par résonnance paramagnétique électronique.

1.3.3. Ischémie intestinale expérimentale et lactatémie capillaire tissulaire (protocoles 3, 4)

Durant ce protocole, six porcs *large white* ont été étudiés sous anesthésie générale. Après création d'un pneumopéritoine (Thermoflator, Karl Stortz) pour insertion de trocars laparoscopiques, une anse d'intestin grêle était soumise à une ischémie par ligature laparoscopique des vaisseaux mésentériques. Après 60 minutes d'ischémie, l'anse était extériorisée par un orifice de laparotomie afin de réaliser des biopsies tissulaires grêliques et une mesure du taux de lactate tissulaire sur :

- la zone ischémique,
- la zone de résection théorique (zone marginale),
- en zone saine.

2. Techniques analytiques

2.1. Etude extemporanée du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale par méthode oxygraphique

2.1.1. Solutions

Les solutions utilisées pour la dissection (S) et la respiration (R) étaient élaborées pour reconstituer le contenu intracellulaire.

La base commune à ces deux solutions comprend :

CaK₂EGTA 2,77mM, K₂EGTA 7,23mM (100nM de Ca²⁺ libre), MgCl₂ 6,56mM (1mM de Mg²⁺ libre), imidazole 20mM, taurine 20mM, dihydrothreitol 0,5mM, K-sulfonate de méthane 50mM (160mM de force ionique). Le pH des solutions a été ajusté à 7.

La solution S contient en plus : Na₂ATP 5,7mM et PCr 15mM.

La solution R contient en plus : 5mM de glutamate, 2mM de malate, 3mM de phosphate et 2mg/ml d'albumine bovin sérique (BSA).

2.1.2. Préparation tissulaire

2.1.2.1. Tissu musculaire squelettique

Les biopsies tissulaires musculaires étaient immédiatement plongées dans la solution S puis placées sur glace. Les biopsies étaient alors disséquées sous microscope binoculaire afin de retirer les fascias aponévrotiques et favoriser la pénétration de la saponine. En effet, après l'étape de dissection, les fibres sont plongées dans une solution S contenant 50µg/ml de saponine et soumis à une agitation de 30 minutes à +4°C. Ceci permet de perméabiliser le sarcolemme en préservant la structure mitochondriale. La perméabilisation est interrompue par immersion des fibres dans de la solution S pendant 10 minutes puis à deux reprises dans de la solution R pendant 5 minutes afin d'éliminer l'ATP, ADP et la PCr.

2.1.2.2. Tissu intestinal

Les biopsies tissulaires intestinales étaient immédiatement plongées dans la solution S puis placées sur glace. Des fragments de 1 à 2mm³ sont découpés sous microscope binoculaire afin d'être placés dans la chambre oxygraphique (5 fragments par biopsie).

2.1.3. Protocoles d'étude de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les biopsies sont placées dans une chambre oxygraphique thermorégulée par un bain-marie à +22,1°C (Strathkelvin Instruments, Ecosse) (Image 1). Le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale est approché par sa consommation de l'oxygène dissout dans la solution de la chambre oxygraphique. Cette concentration en oxygène dissout est mesurée par des électrodes de Clark et monitorée en continu par un logiciel de mesure (Oxygen 571). Cet enregistrement va permettre de calculer la vitesse de consommation en oxygène pour chaque échantillon. Afin d'évaluer le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale par différents modes d'activation, différents substrats et inhibiteurs vont alors être injectés de manière séquentielle dans la chambre oxygraphique.

- L'activité basale des complexes I, III et IV (V_0) est mesurée dans la solution R sans adjuvant.
- L'adjonction d'ADP (2mM) dans la solution permet un fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale avec un flux électronique au travers des complexes I, III et IV en situation saturante de substrat (V_{max}).
- L'adjonction d'amytal (0,02mM) permet alors de bloquer sélectivement le fonctionnement du complexe I. Ceci permettra après injection dans la solution de succinate (25mM) l'activité des complexes II, III et IV. Le FADH₂ généré par l'action de la succinate déshydrogénase va constituer un substrat pour le complexe II. Le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale va se faire par un flux électronique au travers des complexes II, III et IV (V_{succi}).
- L'adjonction du TMPD (0,5mM) et d'ascorbate (0,5mM) stimule l'activité du complexe IV, permettant l'étude isolée de son fonctionnement (V_{tmpd}).

A l'issue du protocole de mesure, le tissu est récupéré pour être déshydraté puis pesé afin d'exprimer les résultats en $\mu\text{molO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de fibres déshydratées.

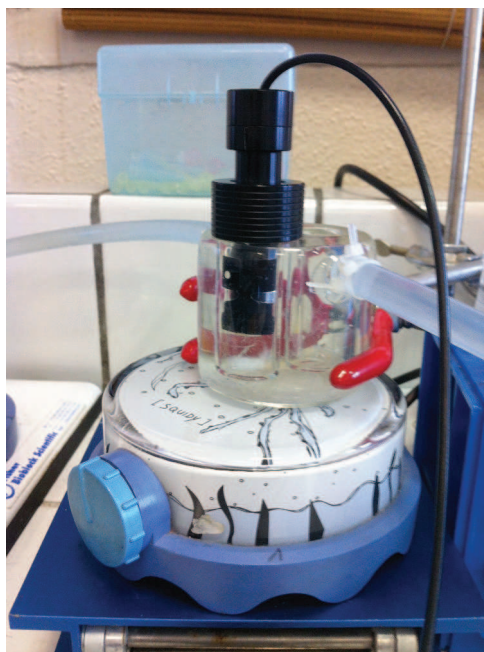


Image 1 : Cellule oxygraphique avec électrode de Clark en place

2.2. Étude de la production tissulaire et sanguine de stress oxydant (ROS) par résonance paramagnétique électronique

2.2.1. Solutions

La solution de base d'étude des biopsies tissulaires est une solution de Krebs-Hepes. Elle vise à mimer les conditions physiologiques et se compose de : NaCl 99mM, KCl 4,69mM, CaCl₂ 2,5mM, MgSO₄ 1,2mM, NaHCO₃ 25mM, KH₂PO₄ 1,03mM, D(+) Glucose 5,6mM, Na Hepes 20mM. Afin de diminuer le bruit de fond oxydatif, 25μM de déféroxamine et 5μM de DETC sont ajoutés.

En raison de la durée de vie extrêmement brève des ROS, il est nécessaire d'utiliser une sonde moléculaire qui, au contact des ROS va s'oxyder de manière plus pérenne dans le temps. La quantité d'électrons non appariés au niveau des molécules de la sonde moléculaire va alors être quantifiée par résonance paramagnétique électronique.

Afin d'étudier la production de ROS, nous avons choisi d'utiliser une sonde relativement spécifique de la production d'anion superoxyde (O²⁻) : le 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH)(121) (Figure 27).

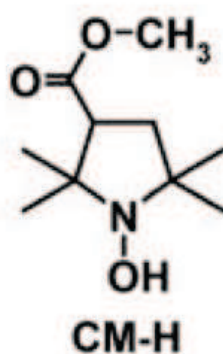


Figure 27 : Formule semi-développée de la sonde moléculaire d'anion superoxyde

1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH) [Dikalov(121)].

Pour l'étude de la production tissulaire de ROS une solution de Krebs-Hepes contenant 200μM de CMH était utilisée.

Pour l'étude de la production sanguine de ROS une solution de Krebs-Hepes contenant 400μM héparinée à 100UI.ml⁻¹ était utilisée.

2.2.2. Techniques de mesure

2.2.2.1. Mesure de la production d'anion superoxyde sur prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins étaient stockés sur glace dans une seringue héparinée. Après une heure, 20μl de sang étaient mélangés avec 20μl de solution CMH puis placés dans un capillaire. Ce capillaire était alors placé dans la cellule de mesure d'un spectromètre e-scan (Bruker, Allemagne) pour l'acquisition du signal paramagnétique électronique.

La mesure était effectuée dans une chambre thermostatée à 37°C. Le protocole d'acquisition comprenait : centrage de champ $g=3,477$; balayage de champ de 60G ; puissance de micro-ondes de 21,85mW ; modulation d'amplitude 2,4G ; temps de conversion de 10,24ms ; constante de temps de 40,96ms, nombre de balayages à 10.

L'amplitude du signal de résonance paramagnétique électronique est proportionnelle au nombre d'électrons non appariés et peut donc être convertie en quantité de ROS produites (μmol.min⁻¹).

2.2.2.2. Mesure de la production d'anion superoxyde sur prélèvements tissulaires

Les prélèvements tissulaires (biopsies musculaires) étaient découpés en fragments millimétriques puis rincés à deux reprises avec la solution tamponnée de Krebs-Hepes. Les biopsies étaient alors placées dans un incubateur thermorégulé à 37°C dans la solution contenant 200µM de sonde moléculaire pour une durée de 30 minutes. L'atmosphère de l'incubateur contenait 20mmHg de pression partielle en oxygène (Noxygen Sciences Transfer, Elzach, Allemagne). L'incubation était stoppée à l'issue des 30 minutes en plaçant le plateau d'incubation sur glace. 40µl du surnageant était alors insérés dans un capillaire afin d'être placés dans la cellule d'analyse du spectromètre e-scan pour l'acquisition du signal paramagnétique électronique. La mesure était effectuée dans une chambre thermostatée à 15°C. Le protocole d'acquisition comprenait : centrage de champ $g=3482,579$, puissance de micro-ondes 21,85mW, modulation d'amplitude 2,40G, temps de balayage 5,24sec (10 balayages), largeurs de champ 60G. L'amplitude du signal était mesurée puis convertie en concentration de CMH oxydé après calibration.

Après la mesure de résonnance paramagnétique électronique, les biopsies étaient déshydratées à 150°C durant 15 minutes et la concentration de ROS exprimée en $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de poids sec.

2.2.3. Étude de la concentration tissulaire en métabolites en spectroscopie par résonnance magnétique nucléaire à angle magique haute résolution

La technique de résonnance magnétique nucléaire (RMN) permet de réaliser une analyse spectroscopique de la composition chimique et donc métabolique d'un échantillon. La mesure est basée sur l'étude du moment magnétique de l'échantillon, variation d'un champ magnétique mesuré après application à un échantillon en fonction de sa composition en noyaux atomiques.

Des analyses mathématiques dont notamment la transformée de Fourier permettent la représentation spectroscopique de la contenance chimique de l'échantillon (Figure 28).

Une quantification est également possible par analyse de l'aire sous la courbe.

La résonnance magnétique nucléaire à angle magique permet l'analyse spectroscopique de la composition chimique d'un échantillon solide. En effet, l'absence de liberté de mouvement moléculaire de type Brownien tel que retrouvé en solution rend difficile l'interprétation des spectres RMN des solides. La mise en rotation extrêmement rapide de l'échantillon (30KHz) autour d'un angle de 54,74° par rapport à l'axe du champ magnétique, appelé angle magique, permet d'augmenter la résolution du signal RMN.

Les biopsies tissulaires étaient techniquées à une température de -20°C. Un fragment tissulaire était introduit dans un insert de 30µl avec 10µl d'eau lourde. Les échantillons étaient placés dans un spectromètre par résonnance magnétique nucléaire (Bruker Avance III 500) utilisant une fréquence de travail protonique de 500,13MHz. La séquence d'acquisition impulsée était une séquence de Carr-Purcell-Meibrrm-Gill(122). Après transformée de Fourier, une correction phasique et de distorsion était réalisée à l'aide du logiciel Topspin 2.1 (Bruker, Allemagne). Le déplacement chimique était référencé par rapport à celui du pic correspondant au proton du groupement méthyl de la molécule de L-lactate à la concentration de 1,33ppm. Les spectres étaient normalisés selon le poids de l'échantillon et calibrés selon le signal d'intensité d'une solution de lactate de 19,3nmol dans les mêmes conditions de mesure. Les résultats étaient exprimés en $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ de tissu.

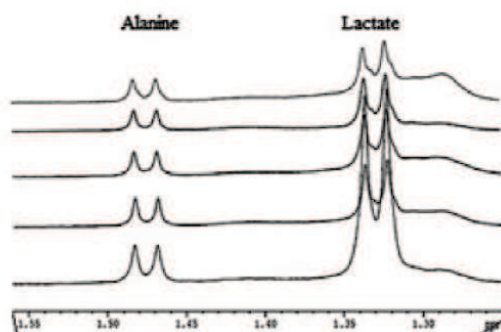


Figure 28 : Exemples de spectres RMN à angle magique avec signal caractéristique de l'alanine et du lactate

2.2.4. Etude de la concentration en lactate capillaire

La concentration en lactate sur sang capillaire était réalisée sur une goutte de sang capillaire prélevée à l'aide d'une ponction à l'aiguille.

La goutte de sang était alors appliquée sur une bandelette autoréactive dont la concentration en lactate était mesurée par méthode ampérométrique électrochimique au niveau d'un boîtier portable.

Dans les protocoles 1 et 2, le dispositif utilisé était le lactate Pro (Arkray, Japon) (Image 2).



Image 2 : Dispositif de mesure du taux de lactate, lactate Pro

La méthode ampérométrique de ce dispositif est basée sur la présence de ferricyanide de potassium et de la lactate oxydase dans la bandelette autoréactive. En présence de lactate, la lactate oxydase va catalyser la formation de ferroxyanide de potassium et de pyruvate. Lors de l'application d'une différence de potentiel à la solution, le ferrocyanide est oxydé, ce qui génère un flux électronique quantifié de manière ampérométrique. L'intensité de ce flux électronique sera proportionnelle à la concentration initiale en lactate de la solution (115).

Dans le protocole 3, le dispositif utilisé était le Edge, lactate analyzer (Transatlantic Science, USA). Les bandelettes de ce dispositif portable contiennent un biosenseur électrochimique (Image 3).



Image 3 : Dispositif de mesure du taux de lactate, The Edge, lactate analyzer

RESULTATS

1. Protocole 1 : Ischémie-reperfusion de membre expérimentale et monitoring de la reperfusion musculaire par lactatémie capillaire

But de l'étude : Le dosage capillaire du lactate permet d'estimer le taux de lactate au niveau d'un membre. Le but de cette étude est de contrôler l'hypothèse selon laquelle le dosage capillaire du lactate au niveau d'un membre ischémié peut permettre d'évaluer l'ischémie, la reperfusion de ce membre et de refléter la présence d'une altération du métabolisme énergétique mitochondrial.

Matériels et méthodes : L'étude a porté sur 25 souris de phénotype sauvage. Le groupe témoin (SHAM, n=13) n'a pas subi d'ischémie alors que le groupe ischémie-reperfusion (IR n=12) était exposé à 2 heures d'ischémie de la patte arrière gauche par garrot en racine de cuisse et 2 heures de reperfusion par levée du garrot.

La lactatémie capillaire systémique (LC-S) était mesurée au niveau de la voûte plantaire de la patte arrière droite et la lactatémie capillaire du membre ischémique (LC-I) au niveau de la voûte plantaire de la patte arrière gauche dans le groupe IR.

L'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale était évaluée au niveau du muscle gastrocnémien des pattes non ischémiques et ischémiques à l'issue des 2 heures de reperfusion.

Résultats : L'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale en présence d'ADP (substrat du complexe I, V_{max}) n'était pas différente entre les groupes SHAM ($8,58 \pm 0,85 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) et la patte non ischémique du groupe IR ($9,39 \pm 1,33 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). La V_{max} était modérément diminuée dans le muscle gastrocnémien de la patte ischémique ($5,40 \pm 1,33 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) par rapport au groupe SHAM ($p=0,04$) et à la patte controlatérale ($p=0,03$). La LC-I augmentait de manière significative après 2 heures d'ischémie par rapport à l'état de base ($14,73 \pm 1,50 \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ versus $4,71 \pm 0,64 \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $p=0,00013$, respectivement) puis diminuait de manière significative après 2 heures de reperfusion ($5,94 \pm 0,95 \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ $p=0,00017$). La LC-S ne présentait pas de variation significative après 2 heures d'ischémie par rapport à l'état de base ($5,99 \pm 0,57 \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $p>0,05$) ni après 2 heures de reperfusion ($6,34 \pm 0,91 \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $p>0,05$).

Conclusion : La lactatémie capillaire au niveau du membre ischémique présente une augmentation significative lors d'une ischémie vasculaire et une baisse significative après une revascularisation. *A contrario*, la lactatémie capillaire systémique ne varie pas durant ce modèle d'IR de membre.

2. Protocole 2 : Choc hémorragique et monitoring de l'hypoperfusion musculaire par la lactatémie (Etude Hemocho)

But de l'étude : Les lactatémies capillaire et artérielle sont augmentées durant la phase non réanimée d'un choc hémorragique. Le but de cette étude est d'évaluer la présence d'une altération du métabolisme énergétique et au niveau du muscle squelettique associée à cette augmentation du taux de lactate et leurs évolutions respectives durant des phases de réanimation.

Matériels et méthodes : L'étude a porté sur 20 porcs *Large white*. Tous les animaux étaient placés en état de choc hémorragique par soustraction sanguine sur cathéter veineux central jugulaire afin d'obtenir une pression artérielle moyenne (PAM) de 40mmHg durant une période de 2 heures puis réanimés par perfusion de colloïdes (albumine humaine 4%, n=10 ou hydroxyéthylamidon 130/0,4 4%, n=10) jusqu'à obtention d'une PAM correspondant à 90 % de la PAM initiale pour une durée de période réanimée de 3 heures.

L'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau gastrocnémien, la production d'anion superoxyde au niveau artériel, veineux et gastrocnémien, la composition gastrocnémienne en lactate, créatine et phosphocréatine au niveau musculaire, la lactatémie artérielle et capillaire étaient évaluées à l'état de base (T0), à la fin des 2 heures de choc hémorragique (T1), après 90 minutes de réanimation (T2) et après 180 minutes de réanimation (T3).

Résultats : On retrouvait une augmentation significative au T1 par rapport au T0 du taux de lactate artériel ($3,19 \pm 0,32 \text{ mmol.l}^{-1}$ vs $1,59 \pm 0,21 \text{ mmol.l}^{-1}$, $p < 0,05$ respectivement) et capillaire ($3,56 \pm 0,34 \text{ mmol.l}^{-1}$ vs $1,75 \pm 0,19 \text{ mmol.l}^{-1}$, $p < 0,05$ respectivement) et une baisse significative à T2 et T3 du taux artériel ($1,78 \pm 0,22 \text{ mmol.l}^{-1}$ et $1,36 \pm 0,11 \text{ mmol.l}^{-1}$, respectivement) et capillaire ($2,16 \pm 0,29 \text{ mmol.l}^{-1}$ et $1,49 \pm 0,22 \text{ mmol.l}^{-1}$).

L'évaluation des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale musculaire ne retrouvait pas de modification entre T0, T1, T2 et T3 pour les complexes I (V_{max}), II ($V_{\text{succinate}}$) et IV (V_{tmpd}). En spectroscopie RMN, la composition tissulaire en lactate et phosphocréatine n'était pas modifiée aux différents temps. Sur le plan métabolomique, le taux de créatine musculaire présentait une baisse à T2 et T3 par rapport à T0. La production d'anion superoxyde n'était pas modifiée au niveau musculaire aux différents temps mais présentait une diminution significative entre T2 ($0,33 \pm 0,03 \text{ mmol.l}^{-1}$) et T0 ($0,46 \mu\text{mol.min}^{-1}$).

Conclusion : Au cours du choc hémorragique et de son traitement, la lactatémie systémique (capillaire et artérielle) présentait une variation superposable aux conditions macrocirculatoires mais ne correspondait pas à une altération du métabolisme énergétique mitochondrial musculaire.

3. Protocole 3 : Ischémie intestinale expérimentale et lactatémie capillaire tissulaire

But de l'étude : Déterminer le degré de perfusion vasculaire d'un segment intestinal reste difficile en routine clinique. Le dosage capillaire du lactate pourrait constituer un biomarqueur performant pour évaluer une ischémie intestinale. Le but de cette étude est d'évaluer l'hypothèse selon laquelle la lactatémie capillaire intestinale augmente au décours d'une ischémie vasculaire par diminution de l'activité oxydative mitochondriale.

Matériels et méthodes : L'étude a porté sur 6 porcs *large white*. Une ischémie de l'intestin grêle était induite sur une anse par clampage des vaisseaux mésentériques distaux durant un modèle préclinique de coeliochirurgie. Le taux de lactate capillaire était évalué au bout d'une heure d'ischémie, au niveau systémique et au niveau intestinal : sur la zone ischémique (1), les zones marginales (2) et en zones saines (3). L'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale était évaluée par oxygraphie et la composition tissulaire en lactate et glucose par spectrométrie RMN après 60 minutes d'ischémie sur biopsie intestinale.

Résultats : Après 60 minutes d'ischémie intestinale, le taux de lactate systémique ne présentait pas de niveau pathologique ($0,95 \pm 0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$). Au même temps, le taux de lactate capillaire intestinal était significativement augmenté au niveau de la zone ischémique ($3,98 \pm 1,91 \text{ mmol.l}^{-1}$) par rapport à la zone marginale ($1,05 \pm 0,46 \text{ mmol.l}^{-1}$) et saine ($0,74 \pm 0,34 \text{ mmol.l}^{-1}$). L'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale était altérée dans les zones ischémiques par rapport aux zones marginales et saines en ce qui concerne la stimulation des complexes I (V_{max} , $104,4 \pm 52,3$ vs $191,1 \pm 25,08$ et $180,4 \pm 37,36 \text{ pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectivement) et II ($V_{\text{succinate}}$, $105,3 \pm 58,14$ vs $213,2 \pm 22,75$ et $219,1 \pm 63,86 \text{ pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectivement). Le taux de lactate tissulaire était augmenté de manière significative dans les segments intestinaux ischémiques par rapport aux segments marginaux et sains. Inversement, le taux de glucose tissulaire était diminué de manière significative dans les segments intestinaux ischémiques par rapport aux segments marginaux et sains.

Conclusion : La lactatémie capillaire tissulaire pourrait constituer un biomarqueur d'ischémie intestinale et d'atteinte du métabolisme oxydatif mitochondrial dans ce tissu.

4. Protocole 4 : Durée de l'ischémie intestinale expérimentale et lactatémie capillaire tissulaire

But de l'étude : Le dosage de la lactatémie capillaire au niveau de la séreuse intestinale ischémisée a montré un intérêt sur le plan expérimental pour contribuer à identifier le segment intestinal ischémique. L'effet de la durée d'ischémie intestinale sur le taux de lactate capillaire local n'est pas connu. Le but de cette étude expérimentale est d'évaluer l'effet de la durée de l'ischémie intestinale sur le taux de lactate capillaire local et systémique, la fonction mitochondriale et la composition métabolique intestinale.

Matériels et méthodes : L'étude a porté sur 6 porcs *large white*. Une ischémie de l'intestin grêle était induite sur une anse intestinale par clampage des vaisseaux mésentériques distaux. Sur chaque animal, six anses étaient soumises à une durée d'ischémie totale variable allant de 1 à 6 heures. Au total, 36 anses ont ainsi été étudiées, 6 par durée d'ischémie. A l'issue de la période d'ischémie, le taux de lactate capillaire était évalué au niveau systémique et au niveau intestinal : sur la zone ischémique (1), les zones marginales (2) et en zones contrôles (3). L'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale intestinale était évaluée par oxygraphie et la composition tissulaire intestinale métabolite telle que le lactate par spectrométrie RMN à 1h, 3h et 5h d'ischémie.

Résultats : Pour chaque durée d'ischémie, de 1 à 6 heures, le taux de lactate capillaire local était augmenté de manière statistiquement significative dans les segments ischémiques par rapport aux segments contrôles. Il ne semblait pas exister de proportionnalité entre la durée d'ischémie et le taux de lactate en zone ischémique. Le coefficient de corrélation entre le taux de lactate capillaire et le taux de lactate mesuré par spectrométrie de masse était de 0,69. L'activité maximale (V_{max}) de la chaîne respiratoire mitochondriale était altérée dans les zones ischémiques par rapport aux zones contrôles après 1 heure d'ischémie ($p=0,03$). La vitesse de respiration de la chaîne respiratoire mitochondriale en concentration saturante d'ADP (V_{ADP}) était statistiquement altérée en zone ischémique par rapport aux zones contrôles ($p=0,1$) après 3 heures d'ischémie.

Conclusion : La lactatémie capillaire tissulaire est utile pour identifier les segments intestinaux ischémiques pour une durée d'ischémie allant de une heure à six heures. Cependant, la valeur absolue du taux de lactate capillaire local ne semble pas permettre d'évaluer précisément la durée d'ischémie qui a précédé la mesure.

DISCUSSION GENERALE

L'objectif commun des études présentées était d'évaluer la performance d'un dosage capillaire du lactate comme biomarqueur de lésion ischémique tissulaire au niveau musculaire et intestinal.

Nous avons envisagé différents types d'agression ischémiques :

- l'ischémie suraiguë par interruption complète du flux artériel dans un membre,
- l'ischémie par bas débit global liée à un état de choc hémorragique.

Plusieurs sites de dosages du lactate ont également été évalués :

- au niveau systémique, reflétant la lactatémie globale de l'organisme en dehors du compartiment ischémié,
- au niveau du territoire ischémié, afin d'étudier les cinétiques compartimentales du lactate.

Lors de chaque protocole expérimental nous avons étudié, en parallèle des taux de lactate compartimentaux, des paramètres liés à la sévérité de l'atteinte tissulaire qui pouvaient être :

- le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale,
- la production tissulaire de stress oxydant,
- le taux intratissulaire de certains métabolites énergétiques.

1. Ischémie-reperfusion de membre et monitoring de la reperfusion musculaire par lactatémie capillaire

L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs est une maladie fréquente du système artériel périphérique, qui atteint jusqu'à 4% de la population mondiale(123). Son incidence ne cesse de croître dans la population du fait d'un allongement de l'espérance de vie et de la persistance d'une exposition intense aux facteurs de risque cardiovasculaires dans les pays faiblement et modérément développés(124). Cette maladie est responsable, à un stade évolué, d'une limitation du périmètre de marche, de douleurs importantes et de lésions tissulaires par diminution du flux sanguin artériel dans les membres atteints(125, 126). Ces stades de sévérité évolués correspondent fréquemment à une entité pathologique dénommée ischémie critique(125, 127). Un geste thérapeutique de revascularisation est, à ce stade, fréquemment nécessaire(128, 129) malgré les thérapeutiques médicales(130) entreprises. Les modalités de revascularisation peuvent être des procédures endovasculaires percutanées ou des gestes chirurgicaux par abord direct. Ces procédures sont dotées d'un taux de succès important mais malgré tout, une proportion significative de patients voit l'ischémie artérielle récidiver en post opératoire(128).

La détection de cette récurrence en post opératoire immédiat est rendu particulièrement difficile par :

- le blocage de l'afflux nociceptif lié à l'anesthésie locorégionale ou les antalgiques systémiques(131, 132) qui va rendre la douleur liée à la récurrence de l'ischémie peu intense,
- les pansements chirurgicaux qui empêchent un examen sonographique exhaustif,
- la fragilité de la fonction rénale périopératoire qui rend la réalisation d'examens d'imagerie avec injection de produits de contraste iodés risquée sur le plan néphrologique(133, 134).

La détection de cet échec de revascularisation est cependant un enjeu majeur afin de pouvoir mettre en place des mesures de restauration du flux artériel le plus précocement possible.

Comme nous l'avons discuté précédemment, le dosage du lactate capillaire compartimental semble prometteur pour détecter une baisse de l'apport sanguin artériel.

Nous avons donc choisi dans le cadre de ce travail de thèse, d'évaluer dans un premier temps, le dosage capillaire du lactate dans un modèle expérimental murin d'ischémie-reperfusion de patte par garrot en racine de cuisse.

1.1. Étude pilote

1.1.1. Choix du modèle

La technique du garrotage de la patte telle que nous l'avons utilisée dans notre modèle expérimental présente plusieurs intérêts :

- La patte controlatérale à la mise en place du garrot peut servir de contrôle interne(135) pour l'évaluation du fonctionnement de la chaîne respiratoire musculaire.
- Il s'agit d'un mode d'interruption du flux vasculaire qui respecte l'intégrité artérielle et assure une reperfusion efficace sur le plan macroscopique comme l'atteste son utilisation courante en chirurgie orthopédique(136).

Les durées des périodes d'ischémie (2h) et de reperfusion (2h) ont été déterminées au cours de l'expérience acquise, par notre équipe notamment, sur des modèles murins d'ischémie-reperfusion de patte :

- Chez le rat, 3 heures d'ischémie par clampage aortique suivi de 2 heures de reperfusion étaient suivies d'une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le muscle gastrocnémien(137).
- Chez la souris, 2 heures d'ischémie par garrot en racine de cuisse suivi par 2 heures de reperfusion étaient responsables d'une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le muscle gastrocnémien(138).

En outre, deux heures d'ischémie correspondent aux durées d'agressions ischémiques retrouvées en pratique clinique peropératoire que ce soit pour la chirurgie vasculaire ou orthopédique. Les deux heures de reperfusion correspondent également à l'intervalle de temps moyen entre le moment de la reperfusion chirurgicale et l'installation en salle de surveillance post-interventionnelle. C'est à cette période que débute habituellement l'apparition des symptômes cliniques liés à un échec de revascularisation (altérations microvasculaires, pâleur cutanée, douleurs) et que l'intérêt d'une nouvelle revascularisation de sauvetage peut encore se discuter.

1.1.2. Intensité de la lésion ischémique

Le protocole d'ischémie-reperfusion que nous avons appliqué était responsable d'une altération modérée d'environ 30% de la capacité oxydative du muscle gastrocnémien en présence de concentration saturante d'ADP (V_{max}) par rapport au contrôle controlatéral. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Mansour qui, chez la souris, retrouvait après 2 heures d'ischémie et 2 heures de reperfusion une altération de 20% de la capacité oxydative du muscle gastrocnémien(138). Guillot(137) et Pottecher(139) retrouvaient une amplitude d'altération légèrement supérieure avec une baisse de 30% de la capacité oxydative du muscle gastrocnémien chez le rat. Cependant, leurs protocoles d'ischémie-reperfusion étaient plus intenses avec une ischémie de 3 heures par clampage aortique puis 2 heures de reperfusion. Cette pondération de l'intensité de l'altération du fonctionnement anabolique énergétique mitochondrial en fonction de la durée d'ischémie, à durée de reperfusion constante, pouvait être suspectée au vu des résultats l'étude de Martou(23). Celui-ci avait montré sur des biopsies musculaires humaines que l'intensité de l'agression musculaire (estimée par dosage du LDH extracellulaire) augmentait de manière proportionnelle en fonction d'une durée d'ischémie allant de 1 heure à 6 heures.

Le mécanisme physiopathologique conduisant à ce dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale se construit en deux temps :

- Durant la période d'ischémie, la diminution de l'apport vasculaire en oxygène, lorsqu'elle atteint un seuil critique, est responsable d'une altération structurelle et fonctionnelle de la chaîne respiratoire mitochondriale médiée, entre autres, par l'inflammation et le stress oxydant (4, 140). Cette atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale va faire le lit des perturbations qui vont survenir durant la phase de reperfusion.

- Lors de la reperfusion, l'augmentation de la pression en oxygène au niveau mitochondrial va induire une augmentation proportionnellement plus importante de la production d'espèces réactives de l'oxygène et en particulier d'anion superoxyde. La chaîne respiratoire mitochondriale, altérée structurellement suite au premier stress du temps ischémique, va générer une quantité importante de radicaux dérivés de l'oxygène lors de son réapprovisionnement en oxygène(141) notamment au niveau des complexes I et III. S'installe alors un cycle délétère, auto-amplifié, avec une production d'espèces réactives de l'oxygène supérieure aux capacités de défense anti-oxydante cellulaire(141).

Ces données confirment les résultats précédents concernant l'importance de l'agression tissulaire et en particulier mitochondriale constituée par une ischémie-reperfusion.

Afin de prendre efficacement en charge une telle agression, il est important de disposer de marqueurs d'agression tissulaire afin de pouvoir :

- Confirmer une atteinte ischémique à l'échelle tissulaire.
- Évaluer de manière quantitative l'importance de cette atteinte ischémique sur le métabolisme énergétique tissulaire.
- Monitorer l'efficacité d'une thérapeutique de revascularisation ou de protection sur le métabolisme tissulaire.

Un tel outil n'est actuellement pas encore décrit. Nous pensons que le dosage du lactate capillaire peut remplir ce cahier des charges. Nous allons donc étudier le résultat du dosage capillaire des lactates au niveau local et systémique dans notre modèle d'ischémie-reperfusion.

1.1.3. Lactatémies capillaires locale et systémique

1.1.3.1. Au temps ischémique

Le dosage capillaire du lactate dans le compartiment ischémique a permis de confirmer une augmentation significative de son taux deux heures après le début de l'ischémie. Son taux augmentait de 313 %, de $4,71 \pm 0,64 \text{ mmol.l}^{-1}$ à $14,73 \pm 1,50 \text{ mmol.l}^{-1}$ dans le membre ischémié.

A l'inverse, son taux systémique ne présentait pas de variation significative à la fin des 2 heures d'ischémie de membre.

Cette augmentation du taux de lactate au niveau de la loge ischémique avait déjà été retrouvée dans deux études cliniques de chirurgie vasculaire par Metzsch(142, 143) à l'aide d'une technique de microdialyse sous-cutanée. La microdialyse permet une analyse invasive de la composition en métabolites dialysables tels que le lactate au niveau d'un tissu. Dans ses publications, Metzsch a placé un cathéter de dialyse en peropératoire de chirurgie vasculaire dans un compartiment sous-cutané :

- soumis à une ischémie par clampage vasculaire (la loge du mollet) et
- non soumis à une ischémie par clampage vasculaire (la loge du pectoral).

Le lactate était dosé dans le liquide de dialysat recueilli après perfusion dans chacun des compartiments ischémique (la loge du mollet) et systémique (la loge du pectoral).

Deux situations cliniques différentes ont été étudiées :

- la chirurgie vasculaire majeure avec la cure d'anévrisme de l'aorte abdominale par voie ouverte et par voie endovasculaire(143),
- la chirurgie vasculaire périphérique pour revascularisation distale chez le patient artéritique(142).

Dans la situation de chirurgie vasculaire majeure, les résultats du dosage de lactate sous-cutané ont retrouvé une augmentation significative du taux de lactate dans la loge de la jambe dans le groupe abord direct par rapport au groupe endovasculaire (Figure 29).

Cette augmentation du taux de lactate dans la loge gastrocnémienne dans le groupe laparotomie est expliquée par le clampage aortique (72min en moyenne) absent dans le groupe endovasculaire. Le clampage aortique indispensable à la mise à plat de l'anévrisme et la suture de la prothèse aortique est responsable d'une ischémie d'aval.

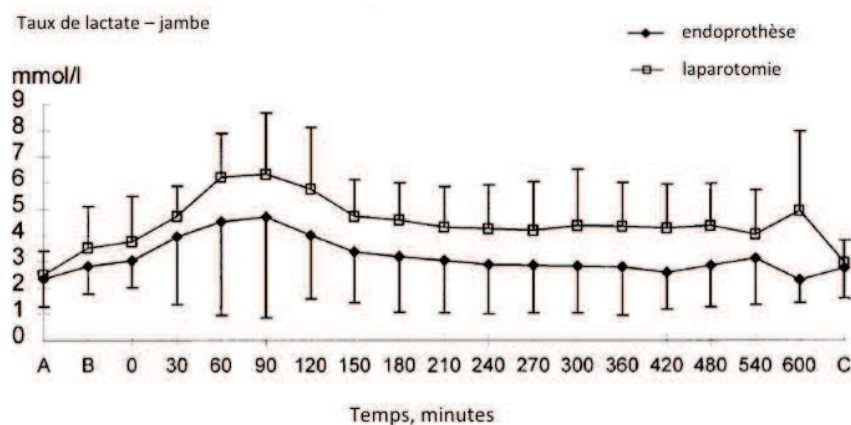


Figure 29 : Taux de lactate par microdialyse dans la loge du gastrocnémien

(A) Avant la chirurgie ; (B) au début de la chirurgie ; (C) à J1 post opératoire. Moyenne et déviation standard, $p < 0,001$ entre les groupes. [Metzsch(143)].

Nous avons retrouvé la même ascension du taux de lactate dans le compartiment ischémique à l'aide du dosage capillaire que lors du dosage par microdialyse. Le dosage capillaire du lactate représente une avancée importante puisque techniquement, à la différence du dosage par microdialyse, il rend possible une mesure :

- faiblement invasive,
- de mise en œuvre technique facile,
- reproductible,
- instantanée,
- peu onéreuse.

Il existe dès lors des possibilités d'applications cliniques pour détecter et évaluer la gravité d'une ischémie compartimentale, en particulier au niveau des membres(144).

Dans la même publication, le dosage du lactate au niveau d'un compartiment systémique (la loge pectorale) n'a pas retrouvé de variation significative au cours de la période chirurgicale (Figure 3).

Nous avons également retrouvé une stabilité du taux de lactate systémique dans notre modèle expérimental utilisant un dosage capillaire ($5,99 \pm 0,57 \text{ mmol.l}^{-1}$ après 2 heures d'ischémie).

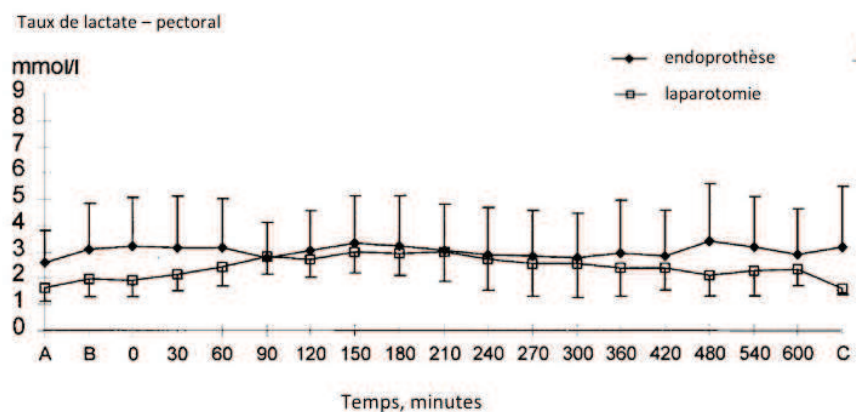


Figure 30 : Taux de lactate par microdialyse dans la loge du pectoral

(A) Avant la chirurgie ; (B) au début de la chirurgie ; (C) à J1 post opératoire. Moyenne $\pm$ déviation standard, NS entre les groupes. [Metzsch(142)].

Le dosage du lactate dans le compartiment systémique que ce soit par microdialyse ou sur sang capillaire ne retrouve pas de variation significative au décours d'une ischémie de membre.

Dans la situation clinique de chirurgie vasculaire périphérique, le dosage du lactate par microdialyse a retrouvé les mêmes résultats (Figure 31). On note une augmentation significative du taux de lactate dans le dialysat du cathéter placé en intramusculaire ainsi qu'une tendance à l'augmentation dans le dialysat des cathéters sous-cutanés. Le faible effectif (8 patients) est susceptible d'expliquer l'absence de significativité dans les dosages sous-cutanés. A l'inverse, le dosage dans le dialysat du compartiment systémique ne retrouve pas d'ascension du taux de lactate ce qui est concordant avec les résultats retrouvés en chirurgie aortique.

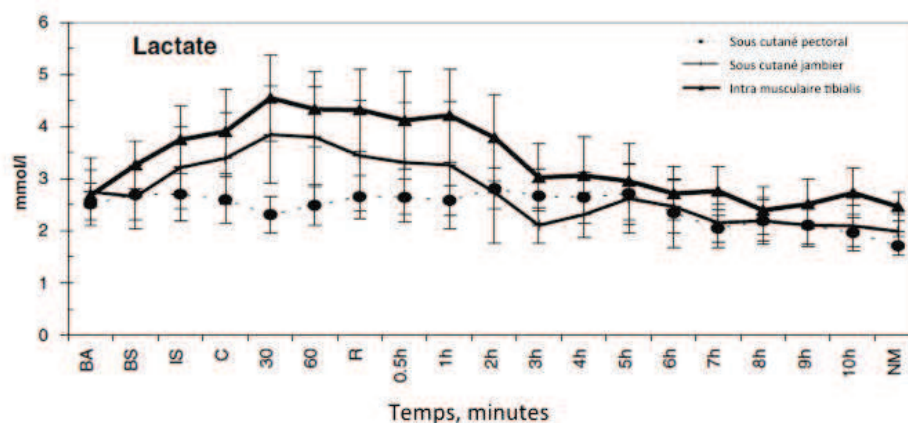


Figure 31 : Taux moyen de lactate dans le liquide de microdialyse le jour opératoire

$\pm$ erreur standard à la moyenne. BA = avant anesthésie ; BS avant chirurgie ; IS = début de la chirurgie ; C= clampage vasculaire ; R = déclampage vasculaire, NM = J1 post opératoire.

Il était prédictible que l'ischémie ne soit pas responsable d'une ascension du taux de lactate systémique durant la phase d'exclusion vasculaire. En effet, le lactate produit en excès par les tissus en métabolisme anaérobie n'est pas transporté dans le compartiment systémique du fait de l'absence de flux sanguin. Sous réserve de l'absence de retentissement hémodynamique de l'ischémie compartimentale, le taux de lactate systémique n'a donc pas de raison d'augmenter durant la période d'exclusion vasculaire.

En conclusion, le dosage capillaire du lactate permet de confirmer une ischémie de membre lorsqu'il est réalisé au niveau du compartiment ischémique alors qu'un dosage systémique ne le permet pas.

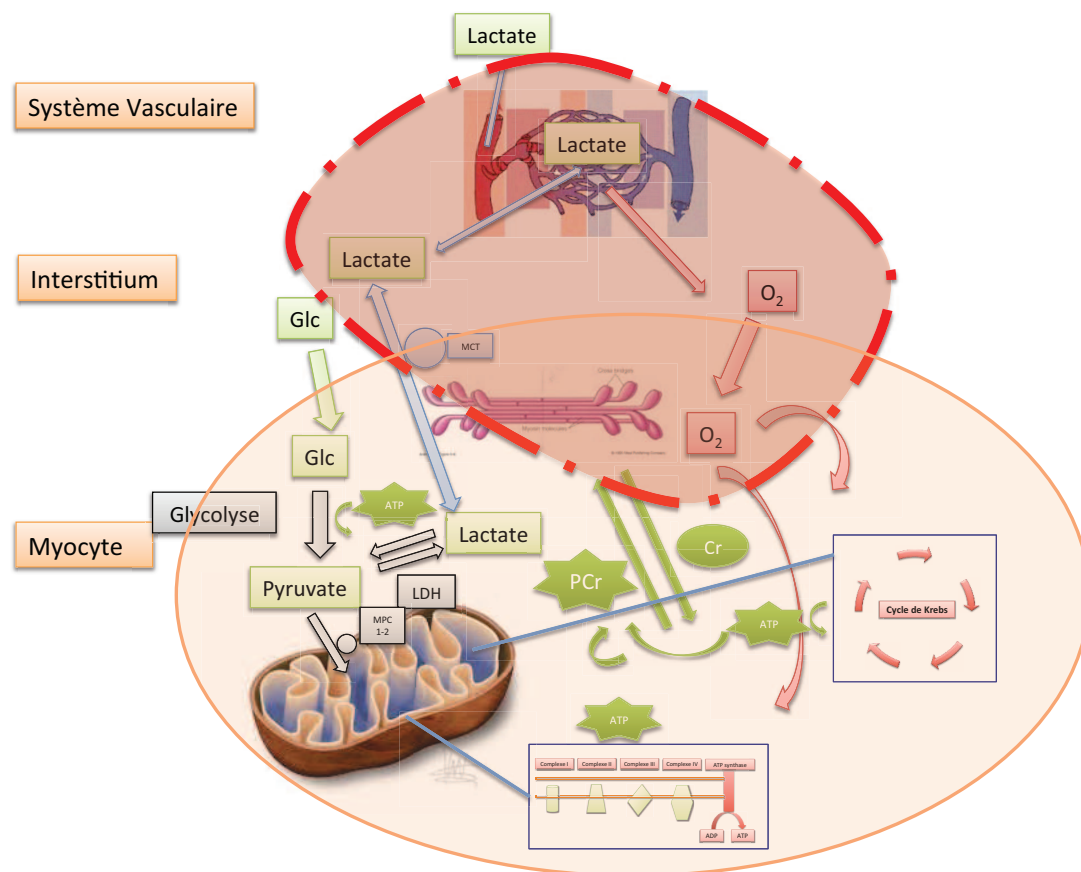


Figure 32 : Représentation schématique du métabolisme myocytaire énergétique centré sur le lactate

Trait discontinu rouge : association métabolique mise en évidence par le protocole 1.

1.1.3.2. Au temps de la reperfusion

Dans notre étude expérimentale, le dosage capillaire du lactate après 2 heures de reperfusion dans le compartiment ischémique retrouvait une baisse significative du taux de lactate capillaire ($5,94 \pm 0,95 \text{ mmol.l}^{-1}$). A l'inverse, son taux systémique ne présentait pas de variation significative après 2 heures de reperfusion.

Les travaux de Metzsch en chirurgie aortique abdominale(143) ont retrouvé la même tendance de correction de la lactatémie sous-cutanée au niveau de la jambe après déclantage aortique. Malheureusement cette cinétique de correction n'a pas fait l'objet d'une analyse statistique.

Dans son travail en chirurgie vasculaire périphérique(142), Metzsch a retrouvé une correction du taux de lactate dans le tissu sous-cutané en microdialyse avant 2 heures de revascularisation.

Encore une fois, le dosage du lactate systémique ne présente pas de variation significative que se soit par microdialyse ou par prélèvement capillaire. L'explication physiopathologique est donnée par le fort potentiel de clairance du lactate notamment au niveau hépatique(145) et cardiaque(76). Le tissu hépatique utilise le lactate comme substrat anabolique énergétique pour la néoglucogénèse hépatique et la phosphorylation oxydative mitochondriale hépatique. Ce phénomène est également décrit au niveau cardiaque. En plus de l'effet de dilution entre les volumes sanguins systémique et compartimental, la clairance métabolique hépatique et cardiaque empêche toute élévation cliniquement significative du taux de lactate systémique.

En conclusion, le dosage capillaire du lactate permet de monitorer l'efficacité d'une reperfusion d'un membre lorsqu'il est réalisé au niveau du compartiment ischémique alors qu'un dosage systémique ne le permet pas.

Les résultats du dosage capillaire du lactate permettent d'envisager un nouveau mode de monitoring de l'ischémie et de la reperfusion d'un membre. Ce biomarqueur devrait permettre d'améliorer la prise en charge des patients souffrant d'ischémie de membre. En effet, le dosage capillaire du lactate offre une évaluation des conséquences tissulaires de l'ischémie *via* la détection d'un métabolisme anaérobie.

Ce concept nécessite cependant d'être validé au moyen d'une étude clinique. Nous avons dans le cadre de ce travail de thèse mis en place une étude clinique pilote dont nous allons présenter la structure.

1.2. Étude clinique

Afin d'évaluer la transposabilité en clinique humaine du concept de monitoring de l'ischémie et de la revascularisation de membre, nous avons mis en place une étude clinique au sein des services de chirurgie vasculaire et d'anesthésie-réanimation du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg.

Cette étude est intitulée « Évaluation de la lactatémie capillaire locale dans l'ischémie critique chronique de membre inférieur, avant et après revascularisation. » (étude ELIT-1, P.R.I. n°2011-5244-Clinical Trials : NCT01634815).

Ses buts sont de :

- Confirmer l'augmentation du taux capillaire de lactate dans le membre ischémique avant revascularisation.
- Confirmer la baisse du taux capillaire de lactate dans le membre ischémique après revascularisation.

Le protocole complet de l'étude clinique est intégré dans les annexes.

Les inclusions sont actuellement en cours.

Nous venons d'étudier la validation expérimentale et d'aborder les modalités de la validation future du dosage capillaire du lactate pour monitorer l'ischémie et la reperfusion de membre.

De manière analogue à l'ischémie par dysfonction vasculaire, les états de chocs sont responsables d'une diminution de l'apport tissulaire périphérique en oxygène(146). Dans cette situation, il est important pour le réanimateur de disposer d'un paramètre fiable et facile à mettre en œuvre pour servir d'objectif à son algorithme de traitement d'un état de choc(113, 147, 148).

A la manière des résultats obtenus dans l'ischémie de membre, nous avons voulu évaluer le dosage capillaire du lactate lors d'un état de choc hémorragique en parallèle des paramètres du métabolisme énergétique musculaire squelettique.

2. Choc hémorragique et monitoring de l'hypoperfusion musculaire par la lactatémie (Etude Hémocho)

Depuis les premières descriptions physiopathologiques modernes de Wiggers(149), liées notamment à la médecine de guerre du 20^e siècle, l'état de choc hémorragique est décrit comme une insuffisance circulatoire aiguë liée à une hypovolémie causée par une hémorragie. Cette insuffisance circulatoire est responsable d'une cytopathie hypoxique bien décrite dans le choc septique(150). Dans le choc hémorragique, les données concernant la physiopathologie reliant l'insuffisance circulatoire constatée initialement à la défaillance tissulaire et d'organe secondaire sont moins nombreuses(151).

La défaillance d'apport tissulaire en oxygène conduit à une transition vers une prédominance du métabolisme énergétique d'hypoxie tel que la glycolyse anaérobie. Cette glycolyse anaérobie va générer une production de pyruvate qui ne sera pas catabolisé par le métabolisme oxydatif et donc converti en lactate par la LDH. Une augmentation du taux de lactate est décrite au décours du choc hémorragique(152–154). Si la valeur pronostique de ce taux systémique de lactate est validée au décours du choc hémorragique lié au degré d'hypoperfusion tissulaire(112), les modalités exactes de sa production tissulaire ne sont pas précisément connues, notamment en ce qui concerne :

- Les tissus impliqués dans la production de lactate et notamment le muscle squelettique.
- La participation mitochondriale à l'augmentation de la lactatémie.

Le dosage capillaire du lactate pourrait permettre au décours d'un modèle de choc hémorragique :

- d'évaluer le degré d'hypoperfusion tissulaire de manière instantanée et répétée,
- d'évaluer l'importance de la dysfonction mitochondriale associée à un choc hémorragique,
- de constituer un objectif de réanimation facilement maniable pour le clinicien.

Nous avons donc choisi d'explorer ces différentes hypothèses dans un modèle expérimental de choc hémorragique.

2.1. Choix du modèle

Les modèles expérimentaux les plus adaptés à l'étude du choc hémorragique sont basés sur l'étude du gros animal(155) (chien et porc) car ils permettent :

- Un monitoring hémodynamique invasif complet et correspondant aux standards cliniques humains.
- La réalisation sériée de prélèvements tissulaires et sanguins.
- L'initiation de thérapeutiques proches de la clinique humaine.

Le premier modèle expérimental de choc hémorragique a été décrit par Wiggers chez le chien appareillé(156–158), conscient. Par extension, tous les modèles animaux de choc hémorragique actuellement utilisés basés sur une spoliation sanguine calibrée pour atteindre une tension artérielle moyenne cible sont appelés modèles de Wiggers.

Par exemple chez le porc, Haugaa a utilisé une cible de 30 à 40mmHg de PAM maintenue pendant 90 minutes. De la même manière Bai(159) a utilisé chez le porc une PAM cible de 40 mmHg pendant 1 heure. Ces modèles ont l'avantage de permettre un maintien prolongé dans le temps de l'état de choc eu égard à la forte capacité d'autotransfusion du porc. Cette forte réserve d'autotransfusion, probablement liée à la mobilisation d'un volume sanguin contraint à partir du compartiment splénique a conduit certains auteurs à associer la splénectomie au modèle expérimental de choc hémorragique. Nous n'avons pas retenu l'utilisation de splénectomie car comme l'a démontré Bebart, cette manipulation peut être la cause de biais supplémentaires alors qu'elle n'est pas responsable d'une modification significative des paramètres physiologiques durant un choc expérimental chez le porc(160).

Ces modèles à objectif de pression artérielle(159, 161) s'opposent aux modèles fondés sur une spoliation sanguine basée sur des calculs de masse sanguine(162–165). Par exemple, Gazmuri(162) a utilisé un modèle porcin de choc hémorragique avec une spoliation sanguine calculée constituée de 65–75% du volume sanguin total (60ml.kg^{-1}). Ces modèles ont l'avantage de concerner, par définition, un volume hémorragique strictement comparable entre les animaux. Cependant, ils s'exposent à une plus forte variation des conséquences hémodynamiques observées entre les animaux.

Dans ce contexte, il est important de considérer la durée d'installation du choc comme l'a démontré Frankel(166). Pour un même volume spolié chez le porc (30ml.kg^{-1}) représentant 50% de la masse sanguine, Frankel a montré que pour une durée totale de choc de 60 minutes et un volume d'induction de choc constant entre les groupes, une variation du débit de spoliation sanguine était responsable de variations significatives dans les paramètres de sévérité du choc.

Concernant la durée de maintien du choc, la durée majoritairement retenue est de 60 minutes(159). Nous avons décidé par analogie avec nos travaux d'ischémie de membre de retenir une durée de choc correspondant à la durée d'ischémie, c'est-à-dire 2 heures.

La phase de réanimation a été construite pour être superposable à une prise en charge de pratique clinique.

Au vu de ces éléments, nous avons choisi d'utiliser un modèle (Figure 26) :

- porcin appareillé pour monitoring de la macrocirculation,
- à objectif de PAM de 40 mmHg,
- pour une durée de choc de 2 heures,
- avec une réanimation par expansion volémique mixte (colloïdes et cristalloïdes) sur un objectif de pression artérielle correspondant à 90 % de la PAM initiale,
- pour une durée de réanimation de 3 heures.

2.2. Intensité de l'atteinte mitochondriale musculaire

Le choc hémorragique n'a pas été responsable d'une altération significative du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale musculaire.

Ces résultats diffèrent des constatations de Karamercan(167) qui, sur du tissu rénal, hépatique et myocardique, a retrouvé une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale concernant :

- les complexes I, II et IV durant les périodes de choc et de réanimation pour le **tissu rénal**,
- le complexe I durant les phases de choc et de réanimation et les complexes II et IV durant la période initiale de réanimation avec une correction en fin de période de réanimation pour le **tissu hépatique**,
- le complexe IV durant les phases de choc et de réanimation, les complexes I et II durant les phases de réanimation pour le **tissu myocardique**.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences observées entre les résultats de Karamercan et les nôtres :

- Le type de choc : Karamercan a utilisé un modèle murin avec une spoliation sanguine passive induisant un choc décompensé dans sa phase initiale. Il est donc probable que la sévérité initiale du choc soit plus importante dans le modèle de Karamercan.
- Le type d'anesthésie : les rats ont été placés en état de choc sans anesthésie générale. La consommation musculaire basale en oxygène était donc plus importante que sous anesthésie générale, ce qui est probablement responsable d'une sensibilisation tissulaire à l'hypoperfusion(90). Le concept de dette d'oxygène(168) pourrait expliquer le mécanisme physiopathologique sous-jacent.

- Les tissus étudiés : les tissus rénaux, hépatiques et myocardiques. En effet, les groupes tissulaires ne sont pas impactés de manière homogène lors d'un état de choc. La dysfonction rénale, hépatique et myocardique est fonctionnellement plus importante dans un état de choc hémorragique que l'atteinte musculaire(169).

Ces hypothèses sont renforcées par les travaux de Haugaa(161) qui a étudié la protection musculaire par monoxyde de carbone et nitrite dans un modèle porcin de choc hémorragique. Pour une intensité de choc supérieure avec une pression cible entre 30 et 40mmHg durant 60 minutes, Haugaa n'a pas retrouvé de variation significative entre l'état de base et le prélèvement à 2 heures de réanimation pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale du muscle squelettique *rectus femoris* :

- en présence d'ADP (complexe I),
- en présence de succinate (complexe II).

Seul le quotient respiratoire ($V_{\text{succi}}/V_{\text{ADP}}$) présentait une diminution significative au décours du choc.

Nos résultats confirment ces données, c'est-à-dire, une préservation quantitative des capacités de phosphorylation oxydative musculaire au décours immédiat d'un choc hémorragique.

Une des explications physiopathologiques pour cette atteinte mitochondriale musculaire modérée lors d'un choc hémorragique est la forte capacité de résistance du muscle squelettique à une dette d'oxygène comparé à d'autres organes comme le système nerveux central et le myocarde. Par exemple, au décours d'une chirurgie cardiaque avec circulation extracorporelle, le système nerveux central est un des organes à haut risque de décompensation(170) en cas de bas débit alors que le muscle squelettique n'est qu'exceptionnellement impliqué.

De plus, les modèles expérimentaux de choc hémorragique n'ayant pas retrouvé d'atteinte mitochondriale majeure comprenaient une anesthésie générale dont le rôle protecteur a été évoqué plus haut.

La notion d'anesthésie générale est importante à prendre en considération car :

- Elle implique une forte diminution de l'activité musculaire squelettique, ce qui diminue la consommation en oxygène et donc la dette tissulaire en oxygène lors d'une hypoperfusion(168).
- Un certain nombre de molécules utilisées pour l'hypnose anesthésique sont responsables d'un effet reconditionnant pharmacologique. Par exemple, les halogénés ont été décrits comme limitant l'intensité du stress ischémique, en particulier sur le myocarde(171, 172).

En conclusion, notre modèle de choc hémorragique n'était pas responsable d'une altération significative du fonctionnement mitochondrial du muscle strié.

2.3. Intensité du stress oxydant

Dans notre expérimentation, la réanimation du choc hémorragique a induit une diminution du stress oxydant au niveau systémique avec une baisse de la production artérielle d'anion superoxyde et une tendance à la baisse de la production artérielle d'anion superoxyde au niveau veineux.

Au niveau sanguin systémique, la baisse du taux d'anion superoxyde mesurée par RPE peut s'expliquer par les propriétés antioxydantes des colloïdes utilisés pour la réanimation volémique.

- L'hydroxyéthylamidon 130/0,4 a déjà montré dans les travaux de Wang(173) une baisse de la peroxydation tissulaire iléale dans un modèle expérimental murin de choc hémorragique réanimé par hydroxyéthylamidon par rapport au groupe réanimé par Ringer lactate.
- L'albumine humaine possède théoriquement une activité antioxydante du fait de l'importance de ces composés thiol au sein des résidus cystéine et méthionine(174). A notre connaissance, nos résultats sont les premiers à évoquer une diminution du stress oxydant systémique dans un modèle de choc hémorragique réanimé par albumine humaine.

Au niveau musculaire, nous n'avons pas retrouvé de variation de la production d'anion superoxyde au décours du choc hémorragique ou de sa réanimation.

Ces données sont compatibles avec la préservation du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

En effet, la mitochondrie et plus particulièrement la chaîne respiratoire mitochondriale sont une source importante de production de ROS(175, 176). Les complexes I et III(177) notamment possèdent un potentiel important de production de ROS. Cependant, un stimulus pathologique est nécessaire pour observer une augmentation de leur production qui est finement régulée(178).

- Le complexe I (NADH ubiquinone oxydoréductase) par exemple, fait l'objet de réarrangements structurels en fonction de son environnement énergétique(179). En situation d'hypoxie, sa production d'anion superoxyde pourrait être augmentée(178).
- Le complexe III (ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase) voit également sa production d'anion superoxyde fortement augmentée lors de modifications conformationnelles induites expérimentalement par la rotenone(180). Ces modifications sont possiblement induites par certaines situations pathologiques secondaires à l'ischémie(178).

Ces perturbations du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale font par la suite le lit de l'augmentation très importante de la production de ROS lors du rétablissement de l'arrivée d'oxygène au niveau mitochondrial (paradoxe de l'oxygène(141)).

Dans notre modèle expérimental, au niveau musculaire strié, nous avons observé une préservation du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et une absence de variation du niveau de stress oxydant tissulaire. Ces éléments sont en faveur d'une préservation du métabolisme énergétique mitochondrial et de l'équilibre du système redox au niveau musculaire.

L'agression mitochondriale musculaire de notre modèle de choc hémorragique semble donc moins importante que dans le modèle d'ischémie de membre. Il est donc intéressant d'étudier le comportement du lactate capillaire et intramusculaire dans cette situation de préservation du métabolisme énergétique aérobie.

2.4. Lactatémies systémique et musculaire

2.4.1. Lactatémie systémique sur sang capillaire

Le dosage du taux de lactate systémique sur sang capillaire a montré **une augmentation significative du taux de lactate entre le taux de base et après 2 heures de choc** de 1,8 à 3,6mmol.l⁻¹ avec par la suite, une **diminution significative du taux capillaire de lactate après 90 minutes de réanimation** (2,2mmol.l⁻¹ et 1,5mmol.l⁻¹).

Comme notre équipe l'avait déjà montré, les dosages capillaire et artériel du taux de lactate sont superposables pendant la phase non réanimée d'un choc hémorragique(181) (Figure 33) avec un biais de 0,115mmol.l⁻¹ et une limite d'agrément de -0,994 et 0,764mmol.l⁻¹.

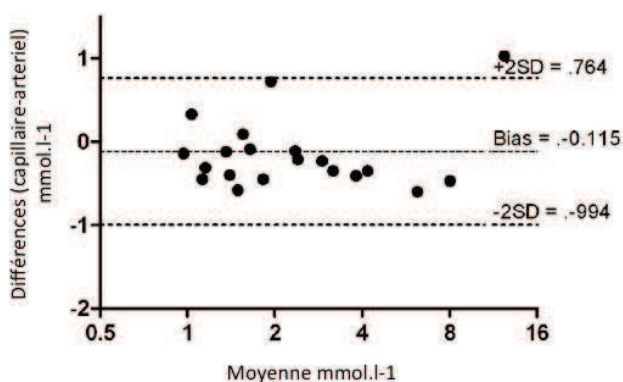


Figure 33 : Représentation de Bland et Altman comparant le dosage capillaire et artériel du lactate durant un modèle expérimental de choc hémorragique non réanimé(181).

En ce qui concerne la phase de réanimation, la validité du dosage capillaire de lactate comme estimation du taux artériel n'était pas encore expérimentée. En effet, au-delà de la phase d'altération initiale du débit cardiaque par hypovolémie, une dysfonction de la perfusion capillaire a été décrite(93) dans le choc hémorragique et peut être responsable d'un gradient entre la valeur artérielle et tissulaire du lactate. La variation des conditions de perfusion capillaire peut induire une altération de diffusion de l'oxygène du réseau artériel vers le tissu cible et donc induire une glycolyse anaérobie locale. De plus, la diffusibilité du lactate entre les compartiments capillaires et le réseau artériel pourrait être altérée par la dysfonction microcirculatoire.

Nos résultats comparant le dosage du lactate capillaire et artériel dans un modèle de choc hémorragique réanimé (Figure 34) retrouve un biais de 0,144 et une limite d'agrément (-1,176 et 0,889mmol.l⁻¹) comparables aux résultats précédents. Il apparaît donc que le dosage capillaire peut représenter le dosage artériel dans la période de réanimation volémique d'un choc hémorragique.

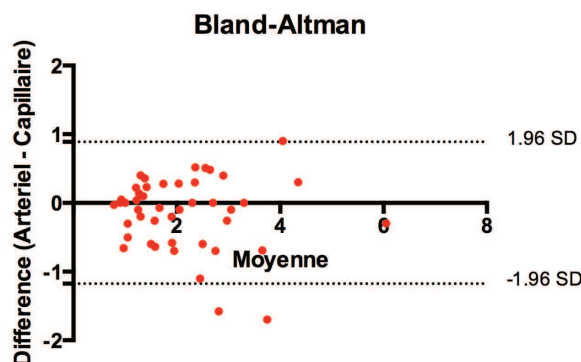


Figure 34 : Représentation de Bland et Altman comparant le dosage capillaire et artériel du lactate dans un modèle expérimental de choc hémorragique réanimé (données EA 3072, non publiées).

Ces constatations ouvrent des perspectives intéressantes pour une utilisation clinique du dosage capillaire des lactates chez les patients souffrant d'une hémorragie grave(182).

Le taux capillaire de lactate pourrait être réévalué facilement et apporter la même information qu'un dosage systémique : une diminution témoignerait d'une diminution de la dette d'oxygène globale de l'organisme et à l'inverse, une augmentation un accroissement de cette dette d'oxygène(90).

La lactatémie systémique a déjà montré son intérêt dans la réanimation du choc septique(113). Jones(113) a montré dans un essai randomisé contrôlé portant sur 300 patients que l'utilisation de la clairance du lactate systémique :

$$\text{Clairance du lactate} = ([\text{Lactate}]_{\text{initiale}} - [\text{Lactate}]_{\text{ultérieure}}) / [\text{Lactate}]_{\text{initiale}}$$

était aussi performante que la ScVO₂ au sein d'un algorithme de réanimation du choc septique basé sur la PVC et la PAM entre autres.

La clairance du lactate telle que définie précédemment devait être supérieure à 10% sur un intervalle de temps minimum de 2 heures. En cas de clairance inférieure à 10%, les thérapeutiques comprenaient une transfusion en cas d'hématocrite < 30% ou la mise sous dobutamine en cas d'hématocrite > 30%. La non correction du taux de lactate était considérée par les auteurs comme une non correction de la dette tissulaire en oxygène(183).

Si le dosage conventionnel du lactate systémique (artériel ou veineux) présente un intérêt par rapport à la ScVO₂ du fait de son coût moindre et de sa plus faible invasivité, il présente néanmoins des inconvénients d'utilisation :

- le délai d'attente entre son prélèvement et le résultat,
- la nécessité d'un prélèvement artériel ou veineux,
- le volume de sang prélevé.

Le dosage sur sang capillaire répond à chacune des difficultés précédentes puisque le résultat est :

- immédiat,
- au lit du malade,
- sur goutte de sang capillaire.

Ceci permet donc une réaction immédiate du clinicien pour adapter la thérapeutique appliquée au patient.

Néanmoins, il convient pour utiliser ce biomarqueur dans des algorithmes thérapeutiques, de connaître sa cartographie, et sa cinétique de production ainsi que sa clairance d'élimination chez le sujet sain.

Comme nous l'avons vu précédemment, le taux de lactate systémique est considéré par un grand nombre d'auteurs comme un reflet direct et proportionnel de l'hypoxie tissulaire et notamment musculaire. Cette conception historique commence à être remise en question(184) à la lumière des progrès des techniques de monitoring de la composition tissulaire en métabolites telle que la microdialyse(101). La production musculaire du taux de lactate ne semble pas systématiquement corrélée à une hypoxie(184). Une augmentation de la lactatémie peut également être induite par l'action de catécholamines endogènes ou exogènes telles que l'adrénaline sur la pompe membranaire myocytaire Na/K ATPase(100, 101). L'adrénaline va, en augmentant l'activité de la pompe Na/K ATPase, activer les phases initiales de la glycolyse dite anaérobie alors que le tissu n'est pas en condition réelle d'hypoxie(184). Cette activation de la glycolyse va alors produire une augmentation de la quantité de pyruvate qui ne pourra pas être catabolisé par le cycle de Krebs et, par l'effet de la LDH, oxydé en lactate(76).

Par ailleurs, le lactate peut avoir un rôle de substrat énergétique en situation de stress pour des tissus à haut potentiel glycolytique tels que le myocarde(76). En effet, le lactate capté à partir du compartiment systémique pourra au niveau du cytosol être réduit en pyruvate et alimenter l'oxydation phosphorylante à partir du cycle de Krebs. Au niveau hépatique, le lactate peut constituer un substrat pour la néoglucogenèse. La glycolyse au niveau musculaire, produisant du lactate en parallèle, le lactate peut être considéré comme un des maillons d'une chaîne de transport énergétique entre le foie et le muscle squelettique appelé cycle de Cori(185, 186).

Ces éléments complexifient la physiologie du lactate telle qu'elle était considérée dans les décennies précédentes et peut modifier l'interprétation que l'on doit faire d'une variation locale ou systémique de son taux.

Dans ce contexte, nous avons voulu durant cette expérimentation concernant le choc hémorragique, évaluer en parallèle du taux de lactate systémique le taux de lactate intramusculaire.

2.4.2. Lactatémie musculaire

Dans notre étude, la composition musculaire en lactate évaluée par spectroscopie RMN, n'a pas montré de variation significative au décours de la phase de choc ou de réanimation.

Ces résultats peuvent paraître surprenants car, dans l'hypothèse d'une production musculaire de lactate causée uniquement par hypoxie tissulaire, on pourrait anticiper une similitude entre l'évolution de la composition musculaire en lactate et le taux systémique.

Une non proportionnalité entre l'évolution du taux de lactate interstitiel d'un membre et le taux de lactate systémique avait été retrouvée dans les travaux de Audonnet-Blaise(187). Chez le lapin sous anesthésie générale, Audonnet-Blaise a étudié la composition interstitielle musculaire quadricipitale :

- en oxygène par microélectrode de Clark,
- en lactate par micro-dialyse.

Les animaux étaient placés pendant 20 minutes en état de choc par spoliation sanguine calibrée d'une durée de 40min (50% de la masse sanguine) puis réanimés par réexpansion volémique pendant une durée de 4 heures. La lactatémie systémique était mesurée en parallèle par prélèvement artériel. Le but de ce travail était de comparer les effets de deux solutés d'expansion volémique (plasma frais congelé et gélatine fluide modifiée).

Dans ce modèle, les auteurs ont retrouvé une augmentation d'un facteur 4 du taux de lactate systémique ($3,2 \pm 2,2$ à $11,1 \pm 4,5 \text{ mmol.l}^{-1}$) à l'issue de la période d'hypovolémie alors que le taux interstitiel musculaire n'évoluait que d'un facteur 2 durant la même période. Le taux systémique du ratio

lactate/pyruvate augmentait également de manière significative à la fin de la période de choc hémorragique avec une baisse secondaire durant la période de réanimation. Les résultats du ratio lactate/pyruvate n'ont pas été publiés par Audonnet-Blaise. Il est probable, comme nous l'avons constaté dans nos analyses par spectroscopie RMN que le dosage du pyruvate tissulaire soit l'objet d'une importante dispersion des résultats du fait de son faible taux tissulaire. La forte affinité du système oxydatif pour le pyruvate(76) pourrait contribuer à ces constatations.

Dans le même modèle expérimental, Boura(188) a évalué différents solutés d'expansion volémique (hydroxyéthylamidon, albumine humaine, chlorure de sodium et substitut d'hémoglobine) en étudiant les mêmes techniques et paramètres que précédemment.

A l'issue de la période de choc hémorragique, il n'avait pas été retrouvé d'augmentation du taux de lactate interstitiel. Il n'a été retrouvé d'augmentation du taux de lactate interstitiel qu'à partir de 2 heures de réanimation (Figure 35).

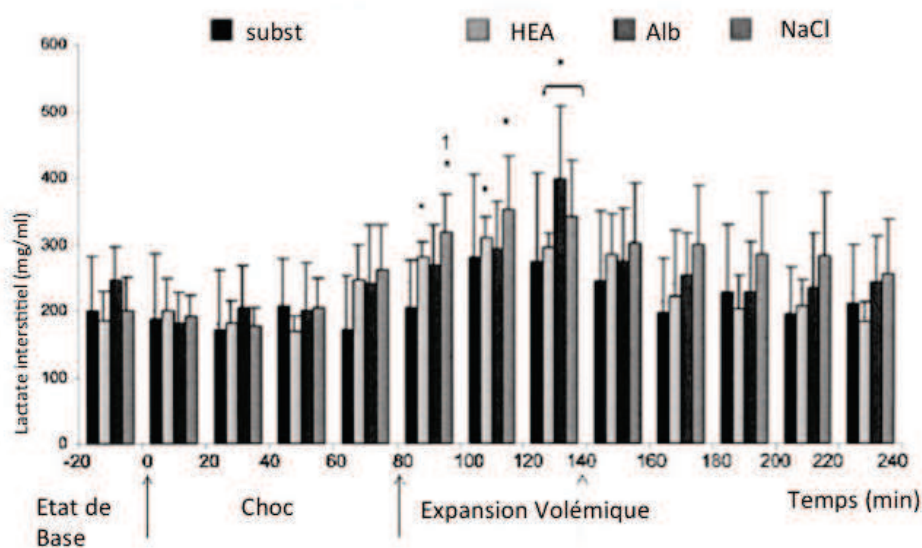


Figure 35 : Taux de lactate interstitiel quadricipital par microdialyse

dans les groupes : substitut d'hémoglobine (subst), hydroxyéthylamidon (HEA), albumine (Alb) et serum physiologique. * $p < 0,05$ vs état de base. [Boura(188)].

Ces données issues de recueils de liquides de microdialyse décrivent l'évolution de la composition en lactate du secteur interstitiel d'une loge musculaire. En effet, pour des raisons techniques liées à la méthode de microdialyse, le dosage a lieu sur un liquide de dialysat qui avait échangé avec le milieu au contact d'une loge musculaire où était inséré le cathéter de microdialyse. Ces valeurs ne reflétaient donc pas strictement la composition du milieu intracellulaire myocytaire mais plutôt le secteur interstitiel.

Nos analyses par spectrométrie RMN permettaient d'évaluer la composition intramyocytaire en métabolites, en respectant l'architecture tissulaire. L'absence d'augmentation intramyocytaire du lactate durant la période de choc correspond à la stabilité du lactate interstitiel musculaire durant la période de choc retrouvée dans les travaux de Boura(188).

Ces différentes constatations tendent vers la même conclusion : le taux de lactate intramusculaire durant un état de choc hémorragique et sa réanimation n'est pas proportionnel au taux de lactate systémique.

L'intensité de l'altération du métabolisme énergétique musculaire et en particulier mitochondrial ne peut donc pas être directement évalué par l'évolution du taux de lactate systémique. La dette d'oxygène globale de l'organisme n'est donc probablement pas homogène entre les différents groupes tissulaires (musculaire, cérébraux, hépatiques par exemple).

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette dissociation entre l'évolution tissulaire musculaire et systémique du taux de lactate durant un état de choc hémorragique :

- Le taux de lactate intratissulaire pourrait rester stable malgré une production augmentée si la capacité de production du lactate issu de l'oxydoréduction du pyruvate par l'enzyme cytosolique LDH ne dépasse pas les capacités d'extrusion cellulaire(76). Le lactate est transporté activement en dehors du cytosol par des transporteurs monocarboxylates (MCT) couplés à un proton (famille moléculaire des MCT) ou couplés au sodium (famille moléculaire des SMCT)(76). Si la quantité de lactate produit au niveau cytosolique ne dépasse pas les capacités maximales de transport du lactate vers le milieu extracellulaire, il est possible qu'il ne soit pas observé d'accumulation intracellulaire de lactate et donc d'augmentation de sa concentration.
- Le muscle squelettique n'est pas la source d'une augmentation du taux de lactate dans ce modèle de choc hémorragique. L'absence de diminution du taux de glucose intramusculaire durant les phases d'ischémie et de réanimation va dans le sens de cette hypothèse. Cependant, le choc hémorragique ne constituant pas une interruption complète de la vascularisation sanguine, un apport *a minima* de glucose pourrait demeurer. De la même manière, les réserves musculaires en glycogène sont une source de glucose rapidement mobilisable, empêchant toute interprétation simple de l'évolution de la teneur musculaire en glucose dans ce modèle.

En ce qui concerne l'absence d'association entre une augmentation du taux de lactate systémique et la dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale musculaire dans un modèle de choc hémorragique, les hypothèses sont :

- La participation d'autres mécanismes que l'hypoxie à l'augmentation de la production tissulaire de lactate. Dans les états de choc, l'augmentation des taux circulants d'adrénaline (endogène ou exogène) est responsable d'une augmentation de l'activité de la pompe Na/K ATPase(189). Cette activation de la pompe membranaire Na/K ATPase est responsable d'une augmentation de la glycolyse et donc de la production de pyruvate ce qui va par la loi d'action de masse au niveau de l'enzyme LDH augmenter la production de lactate. Il est donc possible de voir augmenter la production tissulaire de lactate sans que ce tissu soit obligatoirement soumis à un stress ischémique.
- Le muscle squelettique présente une relative résistance à la diminution d'apport vasculaire en oxygène par rapport à d'autres types tissulaires du fait de sa contenance en myoglobine(190). La myoglobine possède un rôle de transport et de stockage de l'oxygène au niveau musculaire(191, 192), ce qui peut réduire les effets initiaux d'une anoxie et peut limiter les effets d'une hypoxie comparativement à d'autres groupes tissulaires (cutané, hépatique, intestinal par exemple).

L'absence de dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale n'est pas suffisante pour exclure toute perturbation du métabolisme énergétique musculaire. Afin d'évaluer le transport des composés phosphorylés à haute valeur énergétique tels que l'ATP nous avons étudié la composition intramusculaire en créatine (Cr) et phosphorylcréatine (PCr). Les deux composés représentent le système de transport intramyocytaire des composés phosphorylés à haute valeur énergétique produits par la respiration mitochondriale.

2.4.3. Créatininémie et phosphocréatininémie musculaires

L'évaluation spectrométrique de la composition musculaire en Cr et PCr dans notre modèle expérimental retrouvait :

- une stabilité du taux de PCr durant les phases de choc et de réanimation,
- une baisse significative du taux de Cr dès 90 minutes de réanimation.

Une baisse du taux de Cr a été retrouvée par Bravo(193) dans un modèle de préconditionnement ischémique myocardique chez le porc. Bravo retrouvait une baisse du taux de Cr et une hausse du taux de PCr dans le myocarde protégé par la technique de sténose coronaire répétée. Parmi les hypothèses mécanistiques apportées par Bravo, la notion d'hibernation métabolique (augmentation du métabolisme anaérobie, de l'internalisation du glucose, de l'optimisation énergétique par exemple) est proposée(194).

Dans un modèle porcin de choc hémorragique réanimé en normothermie ou avec une période de 8 heures d'hypothermie, Luszczek(195) a retrouvé une diminution du taux de créatinine plasmatique dans le groupe d'animaux hypothermiques par rapport aux animaux normothermiques. Les animaux hypothermiques présentaient également un taux de survie supérieur au groupe normothermique. Il n'a pas été apporté de preuve mécanistique concernant cette association entre amélioration de la survie et modification du taux de créatine plasmatique mais une conversion métabolique protectrice est mise en avant par les auteurs.

En conclusion, le dosage des taux de Cr et PCr musculaires par spectrométrie RMN retrouve une diminution du taux de Cr témoignant d'une modification du métabolisme énergétique musculaire en dépit du fonctionnement préservé de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 36).

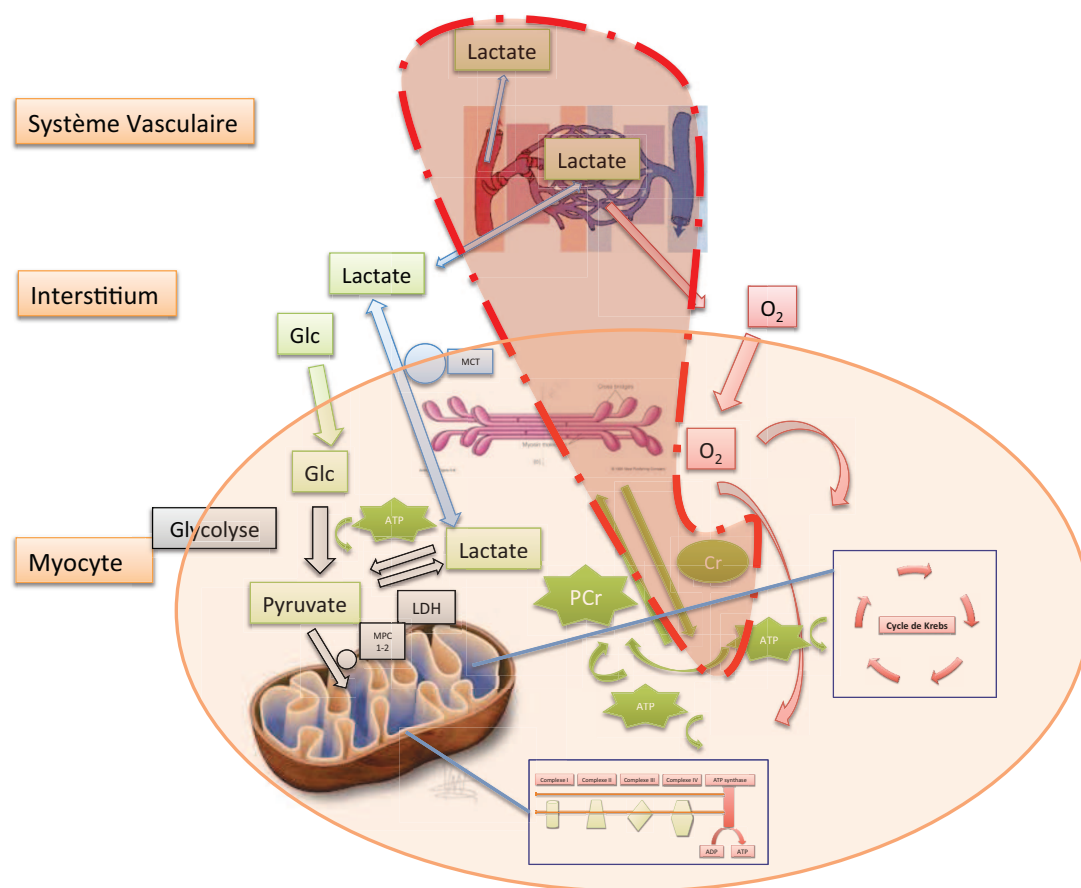


Figure 36 : Représentation schématique du métabolisme myocytaire énergétique centré sur le lactate

Trait discontinu rouge : association métabolique mise en évidence par le protocole 2.

Cette diminution peut répondre à plusieurs hypothèses mécanistiques :

- Une diminution de la production de Cr qui a lieu au niveau rénal et hépatique(14). Cette hypothèse est peu probable eu égard à la cinétique rapide du modèle utilisé.
- Une diminution du transport transmembranaire myocytaire de la Cr à partir du secteur interstitiel.
- Une augmentation de l'élimination de la Cr par catabolisme qui a lieu de manière non enzymatique par cyclisation et produit de la créatinine (Crn).

Ainsi, le mécanisme exact de la diminution du taux de Cr musculaire en situation d'agression reste à établir. Cependant, une baisse du taux de Cr est responsable d'une modification du métabolisme musculaire retrouvée dans de nombreuses myopathies : dystrophie musculaire de Duchenne, dystrophie myotonique et myasthénie par exemple.

Comme nous l'avons vu précédemment, pour certains auteurs, cette modification pourrait être le reflet d'une mise en place d'une protection métabolique de type hibernation musculaire(193).

Cette constatation ouvre des perspectives pour d'autres expérimentations :

- L'étude du couple Cr/PCr peut servir de marqueur d'altération du mécanisme énergétique musculaire pour des agressions moins importantes que celles responsables d'une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale ou pour mettre en évidence une atteinte à un stade plus précoce.
- La supplémentation en Cr ou PCr pourrait constituer une voie thérapeutique, préventive et/ou curative de la neuromyopathie de réanimation(196).

Au total, dans notre modèle de choc hémorragique, le dosage capillaire du lactate ne s'est pas avéré être un témoin fiable de la perfusion musculaire squelettique comme cela avait été le cas dans notre modèle d'ischémie de membre. En effet, au cours du choc hémorragique, l'hyperlactatémie capillaire n'est pas associée à des signes d'hypoperfusion tissulaire majeure (altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, augmentation du taux de lactate musculaire).

Après avoir étudié le potentiel du dosage capillaire de lactate pour l'évaluation de la perfusion musculaire dans le choc hémorragique, nous allons envisager son utilisation dans un modèle expérimental d'ischémie digestive comme biomarqueur de la perfusion de la muqueuse intestinale.

3. Ischémie-reperfusion intestinale et monitoring de la perfusion muqueuse par lactatémie capillaire

L'évaluation de la perfusion intestinale est d'une importance majeure pour le clinicien, elle permet notamment :

- d'évaluer la viabilité d'un segment intestinal soumis à une ischémie puis une manœuvre de revascularisation,
- d'optimiser les résections et anastomoses(197) en permettant un geste le plus économique possible tout en s'assurant de l'adéquation de la suppléance vasculaire des berges.

En pratique clinique de routine, cette évaluation se fait par inspection visuelle avec une faible performance(198). Au vu des résultats de nos travaux sur l'ischémie de membre(199), le dosage capillaire du lactate pourrait constituer une aide dans l'appréciation de la perfusion vasculaire intestinale.

Notre hypothèse était la possibilité d'utiliser le lactate capillaire pour améliorer la prise en charge per opératoire des patients opérés en chirurgie digestive, en évaluant localement la proportion de métabolisme tissulaire intestinal anaérobie.

Dans cette logique, nous avons évalué la lactatémie capillaire au niveau intestinal et systémique dans un modèle porcin d'ischémie intestinale. En parallèle, afin d'évaluer l'intensité de l'atteinte ischémique intestinale sur le métabolisme tissulaire, nous avons évalué la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale et la production tissulaire d'anion superoxyde au niveau intestinal, sur le même modèle.

3.1. Choix du modèle

Afin de pouvoir réaliser une ischémie intestinale segmentaire, nous avons choisi d'utiliser un modèle porcin de coelochirurgie préclinique(200) familière à notre équipe et décrite plus haut. Le volume du système digestif dans ce modèle permet en plus d'une dissection mésentérique proche de la clinique humaine, la réalisation de biopsies muqueuses intestinales multiples, ce qui n'est pas réalisable dans les modèles murins.

L'ischémie intestinale était induite par dissection et ligature de 4 vaisseaux artériolaires mésentériques à destination d'une même anse grêlique. A la fin d'une période de 60 minutes d'ischémie, des dosages de lactate sur sang capillaire issu

- de la muqueuse digestive, aux niveaux du centre de l'anse ischémique, des berges de résection potentielles (limites distales de la zone ischémique) et de zones saines,
- du secteur systémique par ponction au niveau du groin.

Sur ces mêmes zones d'intérêt intestinales étaient réalisées des biopsies tissulaires pour :

- évaluation de la respiration mitochondriale par oxygraphie,
- évaluation de la production tissulaire d'anion superoxyde par résonance paramagnétique électronique.

Au vu de la description des modalités techniques de ce protocole, il apparaît clairement que le modèle préclinique porcin est le seul envisageable afin de pouvoir réaliser l'instrumentation et de disposer de suffisamment de matériel tissulaire. Ceci nous a conduit à retenir cette solution malgré le coût et la difficulté de mise en œuvre technique.

3.2. Dosage capillaire du taux de lactate aux niveaux intestinal et systémique

Le taux de lactate systémique n'a pas présenté de valeur pathologique ($>2 \text{ mmol.l}^{-1}$) au décours de l'ischémie créée dans notre modèle.

Parmi les travaux de notre équipe, Collange(201) avait auparavant mis en évidence une augmentation du taux de lactate systémique ($4,0 \pm 1,0 \text{ mmol.l}^{-1}$) et dans la veine mésentérique supérieure ($3,7 \pm 1,8 \text{ mmol.l}^{-1}$) au décours de 60 minutes d'ischémie par clampage de l'artère mésentérique supérieure et 60 minutes de reperfusion. Cette différence peut s'expliquer par l'importance du territoire intestinal ischémié dans le modèle de Collange par rapport au modèle porcin.

Le taux de lactate capillaire au niveau de la séreuse pariétale intestinale est augmenté de façon significative dans le segment ischémié ($3,98 \pm 1,91 \text{ mmol.l}^{-1}$) par rapport aux berges de résection ($1,05 \pm 0,46 \text{ mmol.l}^{-1}$) et au territoire sain ($0,74 \pm 0,34 \text{ mmol.l}^{-1}$).

Ces résultats confirment notre hypothèse de départ, à savoir l'augmentation du taux capillaire de lactate intestinal pendant une période d'ischémie artérielle.

Le dosage capillaire du lactate pourrait donc constituer un outil d'évaluation de l'ischémie intestinale utilisable en clinique pour :

- évaluer la perfusion vasculaire d'un segment intestinal au décours d'une suspicion d'ischémie mésentérique,
- optimiser la largeur de la résection et le choix du site d'anastomose(202).

Il n'existe pas à notre connaissance d'autres évaluations du dosage capillaire du lactate comme outil de monitoring de l'ischémie intestinale. Par analogie avec la situation d'ischémie de membre, l'augmentation du taux de lactate au niveau intestinal est probablement la résultante d'une diminution de la pression tissulaire en oxygène responsable d'une augmentation de la proportion de la glycolyse dans la production énergétique. Le pyruvate résultant de cette glycolyse va par oxydoréduction liée à l'enzyme LDH générer du lactate(76). Ce lactate sera ensuite transporté au niveau du secteur interstitiel et capillaire par les transporteurs MCT et SMCT.

Si la production intracellulaire de lactate dépasse les capacités de transport des MCT et SMCT, une accumulation de lactate devrait se retrouver au niveau tissulaire.

Afin de répondre à cette question, nous avons évalué la quantité de lactate dans les biopsies intestinales par spectrométrie RMN.

3.3. Taux de lactate intestinal par spectrométrie RMN

Le taux de lactate tissulaire intestinal était significativement augmenté dans la zone ischémique par rapport aux zones de résection et aux zones saines.

Là encore, il s'agit à notre connaissance de la première évaluation de la teneur intestinale en lactate lors d'une ischémie mésentérique dans un modèle préclinique.

Cette accumulation du taux de lactate tissulaire s'accompagnait d'une diminution significative de la teneur tissulaire en glucose dans les zones intestinales soumises à l'ischémie par rapport aux régions contrôles.

Dans ce modèle, l'étude du taux de glucose intratissulaire est pertinente pour confirmer l'augmentation de la glycolyse anaérobie du fait de l'absence totale de perfusion vasculaire et de stock de glycogène inexistant au niveau intestinal.

Au total, notre modèle préclinique d'ischémie intestinale nous a permis de montrer :

- une augmentation du taux de lactate capillaire intestinal après une période d'ischémie de 60 minutes,

- que cette augmentation correspondait à une augmentation globale de la composition intestinale en lactate et à l'inverse une diminution du taux de glucose témoignant d'une participation de la glycolyse anaérobie à cette production de lactate,
- Et parallèlement, une altération concomitante de la fonction respiratoire mitochondriale intestinale était retrouvée.

3.4. Intensité de l'atteinte mitochondriale intestinale

Nous avons retrouvé une diminution significative de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les zones ischémiques par rapport aux zones de transition et saines pour les substrats dépendants du complexe I (V_{max}) et du complexe II ($V_{succinate}$).

A notre connaissance, il s'agit de la première évaluation sur un modèle préclinique de la fonction mitochondriale intestinale après un stress ischémique(203).

Chan(204) a retrouvé sur une analyse histologique des signes de souffrance tissulaire (oedème interstitiel, destructions épithéliales) à partir de 90 minutes d'ischémie jéjunale.

L'étude de la vascularisation muqueuse intestinale, de type terminale(205) (Figure 37) permet d'expliquer l'analogie de ces résultats avec le modèle d'ischémie de membre(206).

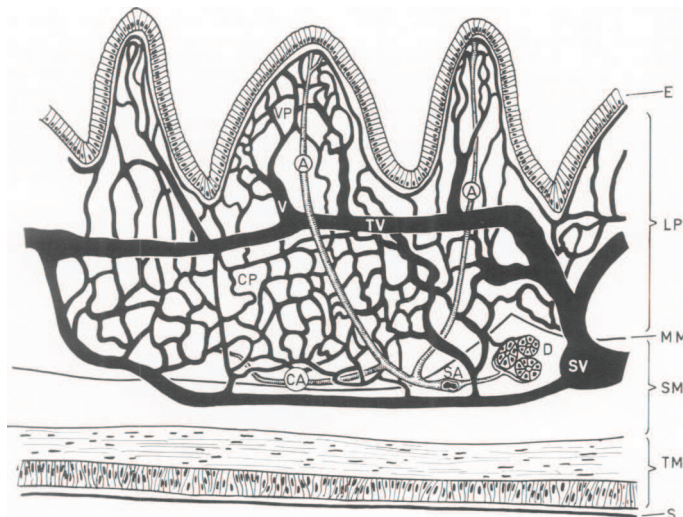


Figure 37 : Schématisation de la vascularisation muqueuse intestinale chez le porc

SA : artère sous muqueuse ; SV : veine sous muqueuse ; A : artériole centro villositaire ; VP : plexus capillaire villositaire ; TV : veinule transverse ; CP : plexus capillaire péri cryptale ; CA : artère suppléante péri cryptale ; D : glandes duodénales ; E : épithélium ; LP : *lamina propria* ; MM : musculaire muqueuse ; SM : sous muqueuse ; TM : tunique musculaire ; S : séreuse. [Bellamy(205)].

Le clampage des vaisseaux mésentériques est responsable d'une abolition complète de l'apport artériel en oxygène et donc :

- d'une augmentation de la proportion de la glycolyse anaérobie dans le métabolisme énergétique,
- d'une souffrance tissulaire et en particulier mitochondriale par diminution de la production énergétique(207), stress oxydatif et inflammation notamment.

Une hypothèse mécanistique peut être celle de l'atteinte mitochondriale digestive durant la phase ischémique avec notamment une modification structurelle et fonctionnelle des complexes de la chaîne respiratoire du fait d'une modification de l'environnement énergétique. Dans ce contexte, De Jong(179) a décrit certaines modifications structurelles du complexe I, ce qui est compatible avec la forte altération de la V_{max} retrouvée dans nos résultats.

Notre modèle évaluait uniquement l'atteinte mitochondriale liée à l'ischémie, sans revascularisation. Comme nous l'avons vu précédemment, une hypothèse à vérifier serait que l'altération de la chaîne respiratoire mitochondriale soit plus importante encore après une période de reperfusion(33) qui amplifierait notamment l'intensité de l'atteinte oxydative(178) du fait de l'augmentation de la production de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale(4) des cellules intestinales.

Le protocole d'étude 4 avait pour but d'évaluer l'effet de la durée d'ischémie intestinale sur le taux de lactate capillaire local. Les résultats ont confirmé l'intérêt du dosage capillaire local du lactate pour aider à identifier les zones intestinales ischémiques pour des durées d'ischémie allant de 1 heure à 6 heures. Cependant, il ne semble pas y avoir de proportionnalité entre la durée d'ischémie mésentérique et la valeur absolue du taux de lactate capillaire local au niveau intestinal dans ce modèle expérimental.

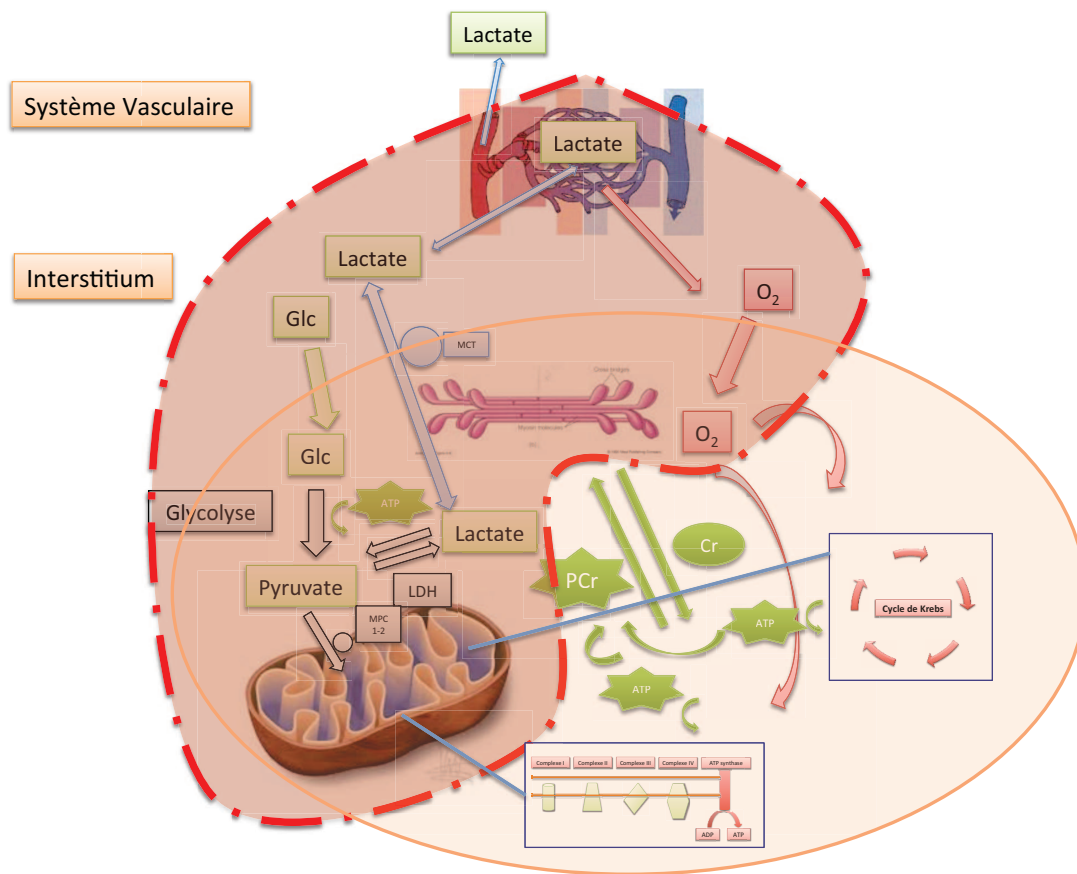


Figure 38 : Représentation schématique du métabolisme cellulaire énergétique centré sur le lactate

Trait discontinu rouge : association métabolique mise en évidence par le protocole 3.

Le dosage capillaire du lactate au niveau intestinal pourrait donc constituer un outil performant pour :

- confirmer une atteinte ischémique intestinale,
- suspecter une atteinte de la fonction mitochondriale associée à cette ischémie.

Les perspectives ouvertes par l'évaluation de la lactatémie capillaire intestinale dans l'IR mésentérique pourraient porter sur :

- l'évaluation de la lactatémie capillaire intestinale au moment de la revascularisation,
- l'évaluation de l'efficacité de différentes stratégies de reperfusion.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les études que nous avons menées en évaluant le dosage capillaire et tissulaire du lactate sur des modèles expérimentaux d'ischémie-reperfusion tissulaires ont permis de mettre en évidence :

- une augmentation du taux de lactate capillaire et/ou tissulaire dans les compartiments atteints par une ischémie de membre ou intestinale,
- une diminution du taux de lactate capillaire dans le compartiment ischémié durant la reperfusion de membre,
- l'absence de variation du taux de lactate dans le compartiment musculaire dans le modèle de choc hémorragique,

Ainsi :

- Dans les situations d'ischémie par interruption du flux sanguin artériel localisé à un compartiment, le lactate tissulaire ou capillaire au niveau du compartiment ischémié pourrait constituer un biomarqueur d'ischémie et de reperfusion vasculaire.
- En revanche, dans le choc hémorragique, le lactate capillaire ne reflète pas l'évolution du métabolisme tissulaire musculaire squelettique. Cependant, du fait de la corrélation des taux artériel et capillaire de lactate, le lactate capillaire constitue une cible d'intérêt pronostique et d'évaluation globale des stratégies de réanimation.

Contrairement aux considérations historiques qui décrivaient le lactate uniquement comme le produit d'une impasse métabolique en situation d'anaérobiose tissulaire, il semble que la physiologie du lactate dépasse une « modélisation » linéaire dans les situations d'hypoperfusion globale comme le choc hémorragique.

L'ensemble de nos résultats ouvre d'autres perspectives de recherche.

- L'utilisation de la lactatémie capillaire comme outil de monitoring de l'IR de membre et intestinale semble prometteuse pour des applications en chirurgie vasculaire et digestive notamment. Cet outil pourrait permettre par exemple de détecter précocement une récurrence ischémique après revascularisation et d'optimiser les sites de résection intestinaux.
- Le dosage capillaire du lactate pourrait également permettre d'aider à identifier des situations à risque de lésions tissulaires ischémiques, telles que la dysfonction mitochondriale, qui font l'objet de recherches pour des thérapeutiques ciblées : le conditionnement ischémique ou pharmacologique par exemple.
- L'apport du dosage capillaire de la lactatémie systémique en réanimation pour guider la thérapeutique dans les situations de choc hémorragique semble également prometteur. Son utilisation possède des avantages en terme de maniabilité et sécurité d'utilisation par rapport aux paramètres cibles actuellement utilisés tels que le lactate artériel ou la ScVO₂.

Ces différentes ouvertures restent à évaluer au cours d'autres protocoles expérimentaux et cliniques. Le premier de ces essais est en cours, en chirurgie de revascularisation du membre inférieur.

BIBLIOGRAPHIE

1. Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S: Surgical implications of ischemic preconditioning. *Arch Surg Chic Ill 1960* 2005; 140:405–409; discussion 410
2. Estebe J-P, Davies JM, Richebe P: The pneumatic tourniquet: mechanical, ischaemia-reperfusion and systemic effects. *Eur J Anaesthesiol* 2011; 28:404–411
3. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, et al.: Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998; 179:169–187
4. Lejay A, Meyer A, Schlagowski A-I, et al.: Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 50:101–105
5. Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ: Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol* 2014; 2:702–714
6. Leverve XM, Mustafa I: Lactate: A key metabolite in the intercellular metabolic interplay. *Crit Care Lond Engl* 2002; 6:284–285
7. Julien Pottecher: Muscle squelettique et ichémie-repeefusion expérimentale des membres : mécanismes impliqués dans la protection ou les effets délétères de la cyclosporine et facteurs limitant les conditionnements pharmacologique et ischémique. 2012;
8. Goll DE, Neti G, Mares SW, et al.: Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci* 2008; 86:E19–35
9. Brooke MH, Kaiser KK: Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 1970; 23:369–379
10. Nemeth P, Pette D: Succinate dehydrogenase activity in fibres classified by myosin ATPase in three hind limb muscles of rat. *J Physiol* 1981; 320:73–80
11. Hur SJ, Jeong TC, Kim GD, et al.: Comparison of live performance and meat quality parameter of cross bred (korean native black pig and landrace) pigs with different coat colors. *Asian-Australas J Anim Sci* 2013; 26:1047–1053
12. Wiesner RJ, Kurowski TT, Zak R: Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol Endocrinol Baltim Md* 1992; 6:1458–1467
13. Raghavan A, Sheiko T, Graham BH, et al.: Voltage-dependant anion channels: novel insights into isoform function through genetic models. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1818:1477–1485
14. Wyss M, Kaddurah-Daouk R: Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 2000; 80:1107–1213
15. Duchen MR: Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 2004; 25:365–451
16. Kirby DM, McFarland R, Ohtake A, et al.: Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS. *J Med Genet* 2004; 41:784–789
17. Stock D, Leslie AG, Walker JE: Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 1999; 286:1700–1705
18. Chance B: Reaction of oxygen with the respiratory chain in cells and tissues. *J Gen Physiol* 1965; 49:Suppl:163–195
19. Tager JM, Groen AK, Wanders RJ, et al.: Control of mitochondrial respiration. *Biochem Soc Trans* 1983; 11:40–43
20. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T: Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120:483–495
21. Boveris A, Chance B: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134:707–716
22. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, et al.: The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977; 56:786–794
23. Martou G, O'Blencs CA, Huang N, et al.: Development of an in vitro model for study of the efficacy of ischemic preconditioning in human skeletal muscle against ischemia-reperfusion injury. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* 2006; 101:1335–1342
24. Norwood MGA, Bown MJ, Sayers RD: Ischaemia-reperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 2004; 28:234–245
25. Cour M, Gomez L, Mewton N, et al.: Postconditioning: from the bench to bedside. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2011; 16:117–130
26. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC: Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117:1024–1033
27. Formigli L, Lombardo LD, Adembri C, et al.: Neutrophils as mediators of human skeletal muscle ischemia-reperfusion syndrome. *Hum Pathol* 1992; 23:627–634

28. Brandão ML, Roselino JES, Piccinato CE, et al.: Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J Surg Res* 2003; 110:235–240
29. Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, et al.: Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 2007; 46:541–547; discussion 547
30. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, et al.: Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 2010; 87:406–423
31. Cerra FB, Lajos TZ, Montes M, et al.: Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery* 1975; 78:95–104
32. Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C: The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004; 61:365–371
33. Charles A-L, Guilbert A-S, Bouitbir J, et al.: Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg* 2011; 98:511–516
34. Grisotto PC, dos Santos AC, Coutinho-Netto J, et al.: Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 2000; 92:1–6
35. Noll E, Bouitbir J, Collange O, et al.: Local but not systemic capillary lactate is a reperfusion biomarker in experimental acute limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 2012; 43:339–340
36. Mohler ER, Treat-Jacobson D, Reilly MP, et al.: Utility and barriers to performance of the ankle-brachial index in primary care practice. *Vasc Med Lond Engl* 2004; 9:253–260
37. Iglesias J, Peña C: Computed tomography angiography and magnetic resonance angiography imaging in critical limb ischemia: an overview. *Tech Vasc Interv Radiol* 2014; 17:147–154
38. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115–126
39. Shankar A, Li J, Nieto FJ, et al.: Association between C-reactive protein level and peripheral arterial disease among US adults without cardiovascular disease, diabetes, or hypertension. *Am Heart J* 2007; 154:495–501
40. Wildman RP, Muntner P, Chen J, et al.: Relation of inflammation to peripheral arterial disease in the national health and nutrition examination survey, 1999–2002. *Am J Cardiol* 2005; 96:1579–1583
41. Tisi PV, Shearman CP: The evidence for exercise-induced inflammation in intermittent claudication: should we encourage patients to stop walking? *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 1998; 15:7–17
42. Haslacher H, Perkmann T, Gruenewald J, et al.: Plasma myeloperoxidase level and peripheral arterial disease. *Eur J Clin Invest* 2012; 42:463–469
43. Schindhelm RK, van der Zwan LP, Teerlink T, et al.: Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clin Chem* 2009; 55:1462–1470
44. Gardner AW, Parker DE, Montgomery PS, et al.: Impaired vascular endothelial growth factor A and inflammation in patients with peripheral artery disease. *Angiology* 2014; 65:683–690
45. Jones WS, Duscha BD, Robbins JL, et al.: Alteration in angiogenic and anti-angiogenic forms of vascular endothelial growth factor-A in skeletal muscle of patients with intermittent claudication following exercise training. *Vasc Med Lond Engl* 2012; 17:94–100
46. Kikuchi R, Nakamura K, MacLauchlan S, et al.: An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat Med* 2014; 20:1464–1471
47. Vernon C, Letourneau JL: Lactic acidosis: recognition, kinetics, and associated prognosis. *Crit Care Clin* 2010; 26:255–283, table of contents
48. Huckabee WE: Relationships of pyruvate and lactate during anaerobic metabolism. III. Effect of breathing low-oxygen gases. *J Clin Invest* 1958; 37:264–271
49. Huckabee WE: Relationships of pyruvate and lactate during anaerobic metabolism. II. Exercise and formation of O-debt. *J Clin Invest* 1958; 37:255–263
50. Huckabee WE: Relationship of pyruvate and lactate during anaerobic metabolism. IV. Local tissue components of total body O₂-debt. *Am J Physiol* 1959; 196:253–260
51. Huckabee WE: METABOLIC CONSEQUENCES OF CHRONIC HYPOXIA. *Ann N Y Acad Sci* 1965; 121:723–730
52. Huckabee WE: Relationships of pyruvate and lactate during anaerobic metabolism. I. Effects of infusion of pyruvate or glucose and of hyperventilation. *J Clin Invest* 1958; 37:244–254
53. Connor H, Woods HF, Ledingham JG: Comparison of the kinetics and utilisation of D(-)-and L(+)-sodium lactate in normal man. *Ann Nutr Metab* 1983; 27:481–487

54. Talasniemi JP, Pennanen S, Savolainen H, et al.: Analytical investigation: assay of D-lactate in diabetic plasma and urine. *Clin Biochem* 2008; 41:1099–1103
55. Perriello G, Jorde R, Nurjhan N, et al.: Estimation of glucose-alanine-lactate-glutamine cycles in postabsorptive humans: role of skeletal muscle. *Am J Physiol* 1995; 269:E443–450
56. Glinghammar B, Rafter I, Lindström A-K, et al.: Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *Int J Mol Med* 2009; 23:621–631
57. Madias NE: Lactic acidosis. *Kidney Int* 1986; 29:752–774
58. Alberti KG: The biochemical consequences of hypoxia. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1977; 11:14–20
59. Kraut JA, Madias NE: Lactic acidosis. *N Engl J Med* 2014; 371:2309–2319
60. Jitrapakdee S, St Maurice M, Rayment I, et al.: Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* 2008; 413:369–387
61. Gerlinger M, Santos CR, Spencer-Dene B, et al.: Genome-wide RNA interference analysis of renal carcinoma survival regulators identifies MCT4 as a Warburg effect metabolic target. *J Pathol* 2012; 227:146–156
62. Juel C: Current aspects of lactate exchange: lactate/H⁺ transport in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2001; 86:12–16
63. McCullagh KJ, Bonen A: Reduced lactate transport in denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1995; 268:R884–888
64. Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP: The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006; 281:9030–9037
65. Borthakur A, Gill RK, Hodges K, et al.: Enteropathogenic Escherichia coli inhibits butyrate uptake in Caco-2 cells by altering the apical membrane MCT1 level. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290:G30–35
66. Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, et al.: CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:16663–16668
67. Li H, Myeroff L, Smiraglia D, et al.: SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:8412–8417
68. Ahlborg G, Felig P: Lactate and glucose exchange across the forearm, legs, and splanchnic bed during and after prolonged leg exercise. *J Clin Invest* 1982; 69:45–54
69. Müller M, Holmäng A, Andersson OK, et al.: Measurement of interstitial muscle glucose and lactate concentrations during an oral glucose tolerance test. *Am J Physiol* 1996; 271:E1003–1007
70. Juel C, Bangsbo J, Graham T, et al.: Lactate and potassium fluxes from human skeletal muscle during and after intense, dynamic, knee extensor exercise. *Acta Physiol Scand* 1990; 140:147–159
71. Gertz EW, Wisneski JA, Stanley WC, et al.: Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest* 1988; 82:2017–2025
72. Overgaard M, Rasmussen P, Böhm AM, et al.: Hypoxia and exercise provoke both lactate release and lactate oxidation by the human brain. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2012; 26:3012–3020
73. Stanley WC, Gertz EW, Wisneski JA, et al.: Lactate extraction during net lactate release in legs of humans during exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 1986; 60:1116–1120
74. Vary TC, Siegel JH, Nakatani T, et al.: Effect of sepsis on activity of pyruvate dehydrogenase complex in skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* 1986; 250:E634–640
75. Vary TC: Increased pyruvate dehydrogenase kinase activity in response to sepsis. *Am J Physiol* 1991; 260:E669–674
76. Adeva-Andany M, López-Ojén M, Funcasta-Calderón R, et al.: Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion* 2014; 17:76–100
77. Bergman BC, Tsvetkova T, Lowes B, et al.: Myocardial glucose and lactate metabolism during rest and atrial pacing in humans. *J Physiol* 2009; 587:2087–2099
78. Cohen RD, Simpson R: Lactate metabolism. *Anesthesiology* 1975; 43:661–673
79. Meyer C, Stumvoll M, Welle S, et al.: Relative importance of liver, kidney, and substrates in epinephrine-induced increased gluconeogenesis in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E819–826
80. Lloyd MH, Iles RA, Simpson BR, et al.: The relation between intracellular pH and lactate metabolism in the isolated perfused rat liver in simulated metabolic acidosis. *Clin Sci* 1973; 44:27P
81. Record CO, Chase RA, Williams R, et al.: Disturbances of lactate metabolism in patients with liver damage due to paracetamol overdose. *Metabolism* 1981; 30:638–643

82. Woll PJ, Record CO: Lactate elimination in man: effects of lactate concentration and hepatic dysfunction. *Eur J Clin Invest* 1979; 9:397–404
83. Larsen TS, Rasmussen P, Overgaard M, et al.: Non-selective beta-adrenergic blockade prevents reduction of the cerebral metabolic ratio during exhaustive exercise in humans. *J Physiol* 2008; 586:2807–2815
84. Ide K, Schmalbruch IK, Quistorff B, et al.: Lactate, glucose and O₂ uptake in human brain during recovery from maximal exercise. *J Physiol* 2000; 522 Pt 1:159–164
85. Boumezbeur F, Petersen KF, Cline GW, et al.: The contribution of blood lactate to brain energy metabolism in humans measured by dynamic ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2010; 30:13983–13991
86. Piquard F, Schaefer A, Dellenbach P, et al.: Lactate movements in the term human placenta in situ. *Biol Neonate* 1990; 58:61–68
87. De Backer D: Lactic acidosis. *Minerva Anesthesiol* 2003; 69:281–284
88. Shoemaker WC, Appel PL, Kram HB: Tissue oxygen debt as a determinant of lethal and nonlethal postoperative organ failure. *Crit Care Med* 1988; 16:1117–1120
89. Shoemaker WC, Czer LS: Evaluation of the biologic importance of various hemodynamic and oxygen transport variables: which variables should be monitored in postoperative shock? *Crit Care Med* 1979; 7:424–431
90. Barbee RW, Reynolds PS, Ward KR: Assessing shock resuscitation strategies by oxygen debt repayment. *Shock Augusta Ga* 2010; 33:113–122
91. Rixen D, Siegel JH: Bench-to-bedside review: oxygen debt and its metabolic correlates as quantifiers of the severity of hemorrhagic and post-traumatic shock. *Crit Care Lond Engl* 2005; 9:441–453
92. Ince C, Sinaasappel M: Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med* 1999; 27:1369–1377
93. Tachon G, Harrois A, Tanaka S, et al.: Microcirculatory Alterations in Traumatic Hemorrhagic Shock. *Crit Care Med* 2014;
94. Sinaasappel M, van Iterson M, Ince C: Microvascular oxygen pressure in the pig intestine during haemorrhagic shock and resuscitation. *J Physiol* 1999; 514 (Pt 1):245–253
95. Boekstegers P, Weidenhöfer S, Kapsner T, et al.: Skeletal muscle partial pressure of oxygen in patients with sepsis. *Crit Care Med* 1994; 22:640–650
96. Levy B, Desebbe O, Montemont C, et al.: Increased aerobic glycolysis through beta2 stimulation is a common mechanism involved in lactate formation during shock states. *Shock Augusta Ga* 2008; 30:417–421
97. Gore DC, Jahoor F, Hibbert JM, et al.: Lactic acidosis during sepsis is related to increased pyruvate production, not deficits in tissue oxygen availability. *Ann Surg* 1996; 224:97–102
98. Zeller WP, The SM, Sweet M, et al.: Altered glucose transporter mRNA abundance in a rat model of endotoxic shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176:535–540
99. Zeller WP, Goto M, Parker J, et al.: Glucose transporters (GLUT1, 2, & 4) in fat, muscle and liver in a rat model of endotoxic shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198:923–927
100. Levy B: Lactate and shock state: the metabolic view. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12:315–321
101. Levy B, Gibot S, Franck P, et al.: Relation between muscle Na⁺K⁺ ATPase activity and raised lactate concentrations in septic shock: a prospective study. *Lancet* 2005; 365:871–875
102. Bakker J, Gris P, Coffernils M, et al.: Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. *Am J Surg* 1996; 171:221–226
103. Claridge JA, Crabtree TD, Pelletier SJ, et al.: Persistent occult hypoperfusion is associated with a significant increase in infection rate and mortality in major trauma patients. *J Trauma* 2000; 48:8–14; discussion 14–15
104. Dunne JR, Tracy JK, Scalea TM, et al.: Lactate and base deficit in trauma: does alcohol or drug use impair their predictive accuracy? *J Trauma* 2005; 58:959–966
105. Abramson D, Scalea TM, Hitchcock R, et al.: Lactate clearance and survival following injury. *J Trauma* 1993; 35:584–588; discussion 588–589
106. Régnier M-A, Raux M, Le Manach Y, et al.: Prognostic significance of blood lactate and lactate clearance in trauma patients. *Anesthesiology* 2012; 117:1276–1288
107. Trzeciak S, Dellinger RP, Chansky ME, et al.: Serum lactate as a predictor of mortality in patients with infection. *Intensive Care Med* 2007; 33:970–977
108. Kliegel A, Losert H, Sterz F, et al.: Serial lactate determinations for prediction of outcome after cardiac arrest. *Medicine (Baltimore)* 2004; 83:274–279

109. Maillet J-M, Le Besnerais P, Cantoni M, et al.: Frequency, risk factors, and outcome of hyperlactatemia after cardiac surgery. *Chest* 2003; 123:1361–1366
110. Watanabe I, Mayumi T, Arishima T, et al.: Hyperlactatemia can predict the prognosis of liver resection. *Shock Augusta Ga* 2007; 28:35–38
111. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al.: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 2013; 39:165–228
112. SFAR: RFE-Recommandations sur la réanimation du choc hémorragique. 2014;
113. Jones AE, Shapiro NI, Trzeciak S, et al.: Lactate clearance vs central venous oxygen saturation as goals of early sepsis therapy: a randomized clinical trial. *JAMA J Am Med Assoc* 2010; 303:739–746
114. Bonaventura JM, Sharpe K, Knight E, et al.: Reliability and accuracy of six hand-held blood lactate analysers. *J Sports Sci Med* 2015; 14:203–214
115. Tanner RK, Fuller KL, Ross MLR: Evaluation of three portable blood lactate analysers: Lactate Pro, Lactate Scout and Lactate Plus. *Eur J Appl Physiol* 2010; 109:551–559
116. Nordström L, Ingemarsson I, Kublickas M, et al.: Scalp blood lactate: a new test strip method for monitoring fetal wellbeing in labour. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102:894–899
117. Bentley DJ, Newell J, Bishop D: Incremental exercise test design and analysis: implications for performance diagnostics in endurance athletes. *Sports Med Auckl NZ* 2007; 37:575–586
118. Faude O, Kindermann W, Meyer T: Lactate threshold concepts: how valid are they? *Sports Med Auckl NZ* 2009; 39:469–490
119. Beneke R, Leithäuser RM, Ochentel O: Blood lactate diagnostics in exercise testing and training. *Int J Sports Physiol Perform* 2011; 6:8–24
120. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, et al.: Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2010; 8:e1000412
121. Dikalov SI, Kirilyuk IA, Voinov M, et al.: EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines. *Free Radic Res* 2011; 45:417–430
122. Meiboom S, Gill D: Modified spin echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev Sci Instrum* 1958; 29:688–691
123. Fowkes FGR, Rudan D, Rudan I, et al.: Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* 2013; 382:1329–1340
124. Society for Vascular Surgery Lower Extremity Guidelines Writing Group, Conte MS, Pomposelli FB, et al.: Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: management of asymptomatic disease and claudication. *J Vasc Surg* 2015; 61:2S–41S
125. Becker F, Robert-Ebadi H, Ricco J-B, et al.: Chapter I: Definitions, epidemiology, clinical presentation and prognosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 2011; 42 Suppl 2:S4–12
126. Biancari F: Meta-analysis of the prevalence, incidence and natural history of critical limb ischemia. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2013; 54:663–669
127. Cao P, Eckstein HH, De Rango P, et al.: Chapter II: Diagnostic methods. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 2011; 42 Suppl 2:S13–32
128. Setacci C, de Donato G, Teraa M, et al.: Chapter IV: Treatment of critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 2011; 42 Suppl 2:S43–59
129. Singh KP, Sharma AM: Critical limb ischemia: current approach and future directions. *J Cardiovasc Transl Res* 2014; 7:437–445
130. Diehm N, Schmidli J, Setacci C, et al.: Chapter III: Management of cardiovascular risk factors and medical therapy. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 2011; 42 Suppl 2:S33–42
131. Crimi E, Hill CC: Postoperative ICU management of vascular surgery patients. *Anesthesiol Clin* 2014; 32:735–757
132. Anton JM, McHenry ML: Perioperative management of lower extremity revascularization. *Anesthesiol Clin* 2014; 32:661–676
133. Harris DG, Koo G, McCrone MP, et al.: Acute Kidney Injury in Critically Ill Vascular Surgery Patients is Common and Associated with Increased Mortality. *Front Surg* 2015; 2:8
134. Yang Y, Zhao X, Tang X, et al.: Comparison of Serum Cystatin C and Creatinine Level Changes for Prognosis of Patients After Peripheral Arterial Angiography. *Angiology* 2014;
135. Thaveau F, Zoll J, Bouithir J, et al.: Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2009; 155:65–69
136. Patil S, Allan DB, Quin R: Effect of total knee arthroplasty on blood flow to the lower limb: a prospective clinical study and review of literature. *J Arthroplasty* 2002; 17:882–886

137. Guillot M, Charles A-L, Chamaraux-Tran TN, et al.: Oxidative stress precedes skeletal muscle mitochondrial dysfunction during experimental aortic cross-clamping but is not associated with early lung, heart, brain, liver, or kidney mitochondrial impairment. *J Vasc Surg* 2014; 60:1043–1051.e5
138. Mansour Z, Charles AL, Bouitbir J, et al.: Remote and local ischemic postconditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia-reperfusion. *J Vasc Surg* 2012; 56:774–782.e1
139. Pottecher J, Guillot M, Belaidi E, et al.: Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg* 2013; 57:1100–1108.e2
140. Pipinos II, Judge AR, Zhu Z, et al.: Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease. *Free Radic Biol Med* 2006; 41:262–269
141. Silachev DN, Plotnikov EY, Pevzner IB, et al.: The mitochondrion as a key regulator of ischaemic tolerance and injury. *Heart Lung Circ* 2014; 23:897–904
142. Metzsch C, Lundberg CJF, Danielsson P, et al.: Microdialysate metabolites before, during and after vascular surgery for chronic leg ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 2003; 25:438–442
143. Metzsch C, Lundberg J, Norgren L: Regional tissue metabolism during open or endovascular abdominal aortic aneurysm surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 2001; 21:320–325
144. Noll E, Collange O, Diemunsch P: Measurement of capillary lactate levels in intensive care: progress and prospects. 2011; 20:124–128
145. Consoli A, Nurjhan N, Reilly JJ, et al.: Contribution of liver and skeletal muscle to alanine and lactate metabolism in humans. *Am J Physiol* 1990; 259:E677–684
146. Leone M, Blidi S, Antonini F, et al.: Oxygen tissue saturation is lower in nonsurvivors than in survivors after early resuscitation of septic shock. *Anesthesiology* 2009; 111:366–371
147. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al.: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345:1368–1377
148. ARISE Investigators, ANZICS Clinical Trials Group, Peake SL, et al.: Goal-directed resuscitation for patients with early septic shock. *N Engl J Med* 2014; 371:1496–1506
149. Wiggers HC, Ingraham RC: HEMORRHAGIC SHOCK: DEFINITION AND CRITERIA FOR ITS DIAGNOSIS. *J Clin Invest* 1946; 25:30–36
150. Fink MP: Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin* 2001; 17:219–237
151. Rushing GD, Britt LD: Reperfusion injury after hemorrhage: a collective review. *Ann Surg* 2008; 247:929–937
152. Arnold RC, Shapiro NI, Jones AE, et al.: Multicenter study of early lactate clearance as a determinant of survival in patients with presumed sepsis. *Shock Augusta Ga* 2009; 32:35–39
153. Sammour T, Kahokehr A, Caldwell S, et al.: Venous glucose and arterial lactate as biochemical predictors of mortality in clinically severely injured trauma patients--a comparison with ISS and TRISS. *Injury* 2009; 40:104–108
154. Manikis P, Jankowski S, Zhang H, et al.: Correlation of serial blood lactate levels to organ failure and mortality after trauma. *Am J Emerg Med* 1995; 13:619–622
155. Valparaíso AP, Vicente DA, Bograd BA, et al.: Modeling acute traumatic injury. *J Surg Res* 2015; 194:220–232
156. Brezina A, Drabek T, Riha H, et al.: The effect of medetomidine-ketamine anesthesia on hemodynamic parameters during hemorrhagic shock in minipigs. *Physiol Res Acad Sci Bohemoslov* 2010; 59:703–710
157. Wiggers HC, Ingraham RC, Dille, J: Hemorrhagic-hypotension shock in locally anesthetized dogs. *Am J Physiol* 1945; 126–133
158. Pottecher J, Chemla D, Xavier L, et al.: The pulse pressure/heart rate ratio as a marker of stroke volume changes during hemorrhagic shock and resuscitation in anesthetized swine. *J Trauma Acute Care Surg* 2013; 74:1438–1445
159. Bai X, Yu W, Ji W, et al.: Resuscitation strategies with different arterial pressure targets after surgical management of traumatic shock. *Crit Care Lond Engl* 2015; 19:170
160. Bebartá VS, Daheshia M, Ross JD: The significance of splenectomy in experimental swine models of controlled hemorrhagic shock. *J Trauma Acute Care Surg* 2013; 75:920
161. Haugaa H, Gómez H, Maberry DR, et al.: Effects of inhalation of low-dose nitrite or carbon monoxide on post-reperfusion mitochondrial function and tissue injury in hemorrhagic shock swine. *Crit Care Lond Engl* 2015; 19:184

162. Gazmuri RJ, Whitehouse K, Whittinghill K, et al.: Vasopressin Infusion with Small-Volume Fluid Resuscitation during Hemorrhagic Shock Promotes Hemodynamic Stability and Survival in Swine. *PloS One* 2015; 10:e0130134
163. Fries D, Krismer A, Klingler A, et al.: Effect of fibrinogen on reversal of dilutional coagulopathy: a porcine model. *Br J Anaesth* 2005; 95:172–177
164. Fries D: The early use of fibrinogen, prothrombin complex concentrate, and recombinant-activated factor VIIa in massive bleeding. *Transfusion (Paris)* 2013; 53 Suppl 1:91S–95S
165. Martini J, Maisch S, Pilshofer L, et al.: Fibrinogen concentrate in dilutional coagulopathy: a dose study in pigs. *Transfusion (Paris)* 2013;
166. Frankel DAZ, Acosta JA, Anjaria DJ, et al.: Physiologic response to hemorrhagic shock depends on rate and means of hemorrhage. *J Surg Res* 2007; 143:276–280
167. Karamercan MA, Weiss SL, Villarroel JPP, et al.: Can peripheral blood mononuclear cells be used as a proxy for mitochondrial dysfunction in vital organs during hemorrhagic shock and resuscitation? *Shock Augusta Ga* 2013; 40:476–484
168. Dunham CM, Siegel JH, Weireter L, et al.: Oxygen debt and metabolic acidemia as quantitative predictors of mortality and the severity of the ischemic insult in hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 1991; 19:231–243
169. Dewar D, Moore FA, Moore EE, et al.: Postinjury multiple organ failure. *Injury* 2009; 40:912–918
170. Barber PA, Hach S, Tippet LJ, et al.: Cerebral ischemic lesions on diffusion-weighted imaging are associated with neurocognitive decline after cardiac surgery. *Stroke J Cereb Circ* 2008; 39:1427–1433
171. Symons JA, Myles PS: Myocardial protection with volatile anaesthetic agents during coronary artery bypass surgery: a meta-analysis. *Br J Anaesth* 2006; 97:127–136
172. Julier K, da Silva R, Garcia C, et al.: Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology* 2003; 98:1315–1327
173. Wang P, Li Y, Li J: Protective roles of hydroxyethyl starch 130/0.4 in intestinal inflammatory response and oxidative stress after hemorrhagic shock and resuscitation in rats. *Inflammation* 2009; 32:71–82
174. Oettl K, Stauber RE: Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 2007; 151:580–590
175. Adam-Vizi V, Chinopoulos C: Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27:639–645
176. Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, et al.: Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 2003; 10:2495–2505
177. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA: Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochem Biokhimiia* 2005; 70:200–214
178. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ: Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 2014; 94:909–950
179. De Jong AM, Kotlyar AB, Albracht SP: Energy-induced structural changes in NADH:Q oxidoreductase of the mitochondrial respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1186:163–171
180. Huang L-S, Cobessi D, Tung EY, et al.: Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc1 complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *J Mol Biol* 2005; 351:573–597
181. Collange O, Charton A, Greib N, et al.: Correlation between arterial and capillary lactate measurements in a porcine hemorrhagic shock model. *J Trauma* 2010; 68:32–34
182. Noll E, Collange O, Diemunsch P: Measurement of capillary lactate levels in intensive care: progress and prospects. 2011; 20:124–128
183. Ronco JJ, Fenwick JC, Tweeddale MG, et al.: Identification of the critical oxygen delivery for anaerobic metabolism in critically ill septic and nonseptic humans. *JAMA J Am Med Assoc* 1993; 270:1724–1730
184. James JH, Luchette FA, McCarter FD, et al.: Lactate is an unreliable indicator of tissue hypoxia in injury or sepsis. *Lancet* 1999; 354:505–508
185. Garcia CK, Goldstein JL, Pathak RK, et al.: Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* 1994; 76:865–873
186. Brooks GA: Lactate: link between glycolytic and oxidative metabolism. *Sports Med Auckl NZ* 2007; 37:341–343

187. Audonnet-Blaise S, Krafft M-P, Smani Y, et al.: Resuscitation of severe but brief haemorrhagic shock with PFC in rabbits restores skeletal muscle oxygen delivery and does not alter skeletal muscle metabolism. *Resuscitation* 2006; 70:124–132
188. Boura C, Caron A, Longrois D, et al.: Volume expansion with modified hemoglobin solution, colloids, or crystalloid after hemorrhagic shock in rabbits: effects in skeletal muscle oxygen pressure and use versus arterial blood velocity and resistance. *Shock Augusta Ga* 2003; 19:176–182
189. Murphy KT, Bundgaard H, Clausen T: Beta3-adrenoceptor agonist stimulation of the Na⁺, K⁺ - pump in rat skeletal muscle is mediated by beta2- rather than beta3-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 2006; 149:635–646
190. Ordway GA, Garry DJ: Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol* 2004; 207:3441–3446
191. Merx MW, Flögel U, Stumpe T, et al.: Myoglobin facilitates oxygen diffusion. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2001; 15:1077–1079
192. Merx MW, Gödecke A, Flögel U, et al.: Oxygen supply and nitric oxide scavenging by myoglobin contribute to exercise endurance and cardiac function. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2005; 19:1015–1017
193. Bravo C, Kudej RK, Yuan C, et al.: Metabolomic Analysis of Two Different Models of Delayed Preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 55:19–26
194. Kim S-J, Peppas A, Hong S-K, et al.: Persistent stunning induces myocardial hibernation and protection: flow/function and metabolic mechanisms. *Circ Res* 2003; 92:1233–1239
195. Luszczek ER, Lexcen DR, Witowski NE, et al.: Prolonged induced hypothermia in hemorrhagic shock is associated with decreased muscle metabolism: a nuclear magnetic resonance-based metabolomics study. *Shock Augusta Ga* 2014; 41:79–84
196. Kress JP, Hall JB: ICU-acquired weakness and recovery from critical illness. *N Engl J Med* 2014; 371:287–288
197. Urbanavičius L, Pattyn P, de Putte DV, et al.: How to assess intestinal viability during surgery: A review of techniques. *World J Gastrointest Surg* 2011; 3:59–69
198. Karliczek A, Harlaar NJ, Zeebregts CJ, et al.: Surgeons lack predictive accuracy for anastomotic leakage in gastrointestinal surgery. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24:569–576
199. Noll E, Bouithir J, Collange O, et al.: Local but not systemic capillary lactate is a reperfusion biomarker in acute limb ischemia. An experimental study. *Soumission En Cours*
200. Noll E, Schaeffer R, Joshi G, et al.: Heat loss during carbon dioxide insufflation: comparison of a nebulization based humidification device with a humidification and heating system. *Surg Endosc* 2012; 26:3622–3625
201. Collange O, Charles A-L, Lavaux T, et al.: Compartmentalization of Inflammatory Response Following Gut Ischemia Reperfusion. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 2014;
202. Karliczek A, Benaron DA, Baas PC, et al.: Intraoperative assessment of microperfusion with visible light spectroscopy for prediction of anastomotic leakage in colorectal anastomoses. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel* 2010; 12:1018–1025
203. Gonzalez LM, Moeser AJ, Blikslager AT: Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: progress and promise for translational research. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 308:G63–75
204. Chan KL, Chan KW, Tam PK: Segmental small bowel allograft--ischemic injury and regeneration. *J Pediatr Surg* 1998; 33:1703–1706
205. Bellamy JE, Latshaw WK, Nielsen NO: The vascular architecture of the porcine small intestine. *Can J Comp Med Rev Can Médecine Comparée* 1973; 37:56–62
206. Vollmar B, Menger MD: Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg Dtsch Ges Für Chir* 2011; 396:13–29
207. Gonzalez LM, Williamson I, Piedrahita JA, et al.: Cell lineage identification and stem cell culture in a porcine model for the study of intestinal epithelial regeneration. *PloS One* 2013; 8:e66465

ANNEXES



Short Report

Local but not Systemic Capillary Lactate is a Reperfusion Biomarker in Experimental Acute Limb Ischaemia[☆]

E. Noll^{a,b,e}, J. Bouitbir^{b,c,e}, O. Collange^{a,b}, J. Zoll^{b,c}, A.L. Charles^{b,c}, F. Thaveau^{b,d},
P. Diemunsch^{a,b}, B. Geny^{b,c,*}

^a Pôle Anesthésie Réanimation Chirurgicale, SAMU, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, 1 avenue Molière 67098, France

^b Equipe d'Accueil 3072, Institut de Physiologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 67000 Cedex, France

^c Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Pôle de Pathologie, Thoracique, Hôpitaux Universitaires, CHRU Strasbourg, 67000 Cedex, France

^d Service de Chirurgie Vasculaire, Pôle Cardiologie, Hôpitaux Universitaires, CHRU Strasbourg, 67000 Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2011

Accepted 15 December 2011

Available online 9 January 2012

Keywords:

Ischaemia–reperfusion

Lactate

Muscle

Mitochondria

Biomarker

Surgery

ABSTRACT

Introduction: Systemic capillary lactate, an end product of cellular anaerobic metabolism, has not established credibility in monitoring limb reperfusion. We assessed, in mice, whether local capillary lactate, arising from the reperfused limb, might be a relevant biomarker of reperfusion.

Report: Systemic and local capillary lactate were sampled in the non-ischaemic and in the ischaemic limb. Only local lactate concentrations significantly increased after 2 h of ischaemia and decreased after reperfusion.

Discussion: Local, but not systemic, capillary lactate appeared as a potential reperfusion biomarker in this experimental acute limb ischaemia model.

© 2011 European Society for Vascular Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Acute limb ischaemia is a common and critical vascular disease with a mortality rate of 15–20%. Post-revascularisation care requires careful limb vascular monitoring for early critical ischaemia recurrence. However, in emergencies, such clinical follow-up might be difficult. Peripheral pulse status is not strongly correlated with tissue perfusion and to clearly determine whether the revascularisation is successful remains a challenge.

Lactate, the end product of cellular anaerobic energetic metabolism, which is a key biomarker of tissue hypoxia, is of interest as an ischaemia biomarker. Systemic lactate has not convincingly been useful in monitoring limb reperfusion.¹ However, microdialysis demonstrated a short time course of lactate normalisation in muscular tissue after revascularisation.²

We tested the hypothesis that local capillary lactate arising from the ischaemic limb might be a better biomarker for early reperfusion than systemic lactate, and determined simultaneously systemic and

local lactate kinetics in a one-limb ischaemia–reperfusion (IR) mouse model. Skeletal muscle mitochondrial function, impaired following IR, was also analysed.^{3,4}

Report

Experimental design, blood and muscle sampling and analysis

Mice were separated into two groups: the sham group (SHAM, $n = 13$), which did not undergo, IR, and the ischaemic group (IR, $n = 12$), which had left limb ischaemia induced by a tourniquet applied for 2 h followed by a 2-h reperfusion. Then, gastrocnemius muscles were excised for mitochondrial respiration analysis. The left leg was considered as ischaemic (IR-ISCH) and the right contralateral leg was considered as non-ischaemic (IR-CTL).³

Local and systemic capillary lactates were measured simultaneously before ischaemia, 2 h after ischaemia (I) and 2 h after IR, using the Lactate Pro[®] device (LT170, Arkay, KGK, Japan).⁵

Mitochondrial maximal oxidative capacities were investigated using glutamate–malate in saponin-skinned gastrocnemius fibres.³

The investigation was carried out in accordance with Helsinki Accords for Humane treatment of Animals during Experimentation (institutional approval no. AL/02/21/12/09).

[☆] The study was supported by a grant of the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg to EN (2010).

* Corresponding author. Bernard Geny, Service de Physiologie et d'Explorations, Fonctionnelles et Equipe d'Accueil, 3072, Université et Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Cedex, France. Tel.: +33 3 69 55 08 79; fax: +33 3 69 55 18 26.

E-mail address: bernard.geny@chru-strasbourg.fr (B. Geny).

^e Participated equally to the paper.

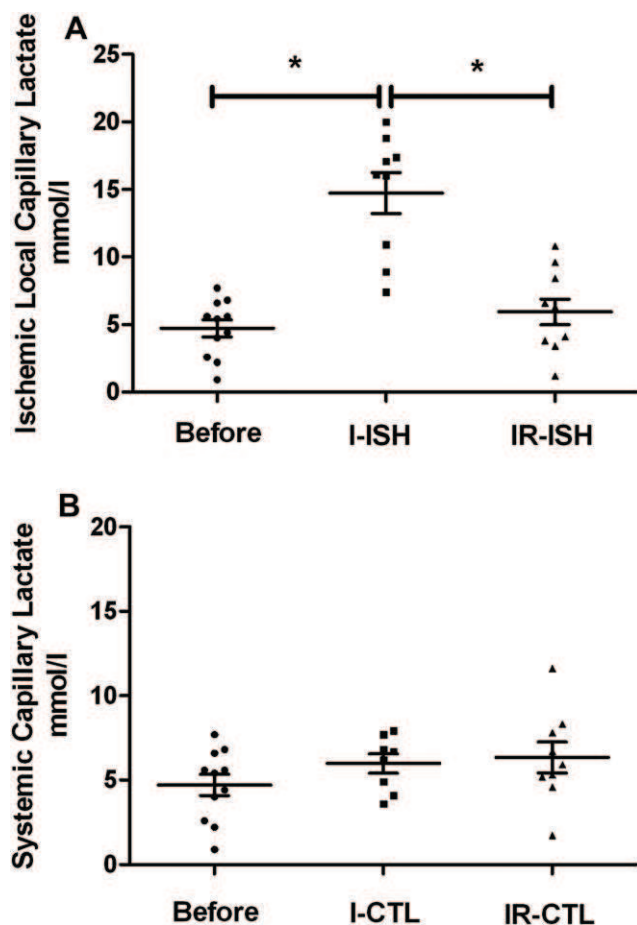


Figure 1. Capillary lactate values (A): local capillary lactate sampled at the ischaemic leg level (B): systemic capillary lactate sampled at the contralateral non-ischaemic leg level. Data are presented in three experimental conditions: before ischaemia, after ischaemia and after ischaemia–reperfusion in the ischaemic leg (IR-ISH) and in the non-ischaemic leg (IR-CTL). Horizontal line at the mean and vertical bar for the SEM. ($n = 11$) * $p < 0.05$ (before vs. I-ISH: $p = 0.00013$, I-ISH vs. IR-ISH: $p = 0.00017$).

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard error of mean (SEM). A one-way analysis of variance (ANOVA) was used, with the Newman–Keuls post-test analysis and t -test for requiring analysis. $p < 0.05$ was accepted as significant.

Results

Mitochondrial respiratory chain oxidative capacity ($V_{\max}$) was similar in sham animals and in the non-ischaemic contralateral leg of the IR animals (8.58 ± 0.85 vs. $9.39 \pm 1.33 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ dry weight, $p = 0.59$, in SHAM and IR-CTL, respectively).

$V_{\max}$ was significantly decreased in ischaemic muscle as compared with SHAM and IR-CTL (5.40 ± 0.95 vs. 8.58 ± 0.85 and

$9.39 \pm 1.33 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ dry weight, $p = 0.04$, $-30\% \pm 14\%$ and $p = 0.03$, $-32\% \pm 12\%$, respectively).

Ischaemia significantly increased local capillary lactate levels in the ischaemic leg, compared to baseline value (14.73 ± 1.50 vs. $4.71 \pm 0.64 \text{ mmol l}^{-1}$, in I-ISH, $p = 0.00013$, Fig. 1).

The small increase in lactate value in the systemic leg failed to reach statistical significance ($5.99 \pm 0.57 \text{ mmol l}^{-1}$ in I-CTL, $p = 0.62$).

Thus, lactate increase was significantly greater in the ischaemic than in the non-ischaemic leg ($+419\% \pm 173$, vs. $+108\% \pm 93$, for I-ISH and I-CTL; $p = 0.031$).

After 2 h of reperfusion, local capillary lactate levels significantly decreased ($5.94 \pm 0.95 \text{ mmol l}^{-1}$, $p = 0.00017$). Systemic lactate value failed to change significantly ($6.34 \pm 0.91 \text{ mmol l}^{-1}$).

Thus, lactate variation was significantly greater in the ischaemic than in the non-ischaemic leg ($-59\% \pm 8$, vs. $+13\% \pm 22$, for IR-ISH and IR-CTL respectively, $p = 0.015$).

Discussion

In accordance with data reported after IR in rodents, we observed a decreased muscle mitochondrial maximal oxidative capacity after this 2-h ischaemia–2-h reperfusion protocol in mice. Such results further support that mitochondria are early target of IR injury.³

Although systemic lactate is of prognostic interest, its slow and progressive changes preclude use in the early diagnosis of re-thrombosis.¹

Local capillary lactate, sampled directly at the ischaemic leg level, demonstrated both a rapid increase during ischaemia and a rapid decrease during reperfusion. Such kinetics are in agreement with data obtained using microdialysis, and could allow an early diagnosis of successful reperfusion.²

In summary, this study demonstrates that local, but not systemic, capillary lactate levels might be reperfusion biomarkers after limb IR. Since capillary blood lactate monitoring is a rapid and repeatable bedside method,⁵ clinical studies are warranted to test whether local lactate kinetics might be helpful in determining the success of revascularisation in vascular surgery in man.

Conflict of Interest/Funding

None.

References

- Alves WF, Aguiar EE, Guimarães SB, da Silva Filho AR, Pinheiro PM, Soares G dos S, et al. L-alanyl-glutamine preoperative infusion in patients with critical limb ischemia subjected to distal revascularization reduces tissue damage and protects from oxidative stress. *Ann Vasc Surg* 2010;**24**:461.
- Metzsch C, Lundberg CJ, Danielsson P, Norgren L. Microdialysate metabolites before, during and after vascular surgery for chronic leg ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;**25**:438.
- Thaveau F, Zoll J, Bouitbir J, Ribera F, Di Marco P, Chakfe N, et al. Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2009;**155**:65.
- Pedersen BL, Baekgaard N, Quistorff B. Muscle mitochondrial function in patients with type 2 diabetes mellitus and peripheral arterial disease: implications in vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009;**38**:356.
- Collange O, Charton A, Greib N, Joshi GP, Schaeffer R, Diemunsch PA. Correlation between arterial and capillary lactate measurements in a porcine hemorrhagic shock model. *J Trauma* 2010;**68**:32.

Comparative analysis of human serum albumin plus crystalloids and 130/0.4 HES plus crystalloids resuscitation on skeletal muscle metabolic profile during experimental hemorrhagic shock in swine.

E Noll MD^{a,b,c}, M Diana MD^{b,c}, AL Charles PhD^b, F Singh^b, TJ Gan MD^d, J Pottecher MD PhD^{a,b,c}, FM Moussallieh PharmD PhD^{e,f}, IJ Namer MD PhD^{e,f}, B Geny MD PhD^b, P Diemunsch MD PhD^{a,b,c}

- a. Anesthesia and Intensive Care, Hopital de Hautepierre, University Hospitals of Strasbourg, France
- b. EA 3072, Laboratoire de Physiologie, Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg University, France
- c. IHU-Strasbourg, University Institute for Image-Guided Surgery, Strasbourg, France
- d. Department of Anesthesiology, Stony Brook University, Stony Brook, U.S.A.
- e. Biophysics and Nuclear Medicine, Hopital de Hautepierre, University Hospitals of Strasbourg, France
- f. ICube, University of Strasbourg / CNRS UMR 7357, Strasbourg, France

1. Eric Noll, M.D.

Title: Dr

Affiliation: Anesthesia and Intensive Care, Hopital de Hautepierre, University Hospitals of Strasbourg, France

Email: eric.noll@chru-strasbourg.fr

Role: This author helped design the study, conduct the study, analyze the data, and write the manuscript

Conflicts: Eric Noll received research funding from LFB Biomedicaments and reported a conflict of interest with LFB Biomedicaments One paid lecture in 2013

Attestation: Eric Noll has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, approved the final manuscript, and is the author responsible for archiving the study files

2. Michele Diana, M.D.

Title: Dr

Affiliation: IHU-Strasbourg, University Institute for Image-Guided Surgery, Strasbourg, France

Email: michelediana@virgilio.it

Role: This author helped conduct the study and write the manuscript

Conflicts: Michele Diana reported no conflicts of interest

Attestation: Michele Diana has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript

3. Anne Laure Charles, Ph.D.

Title: Dr

Affiliation: EA 3072, Laboratoire de Physiologie, Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg University, France

Email: annelaure.lang@yahoo.fr

Role: This author helped conduct the study and write the manuscript

Conflicts: Anne Laure Charles reported no conflicts of interest

Attestation: Anne Laure Charles reviewed the analysis of the data and approved the final manuscript

4. Francois Singh,

Title: Mr

Affiliation: EA 3072, Laboratoire de Physiologie, Federation de Médecine Translationnelle, Strasbourg University, France

Email: francois.singh@etu.unistra.fr

Role: This author helped conduct the study and write the manuscript

Conflicts: Francois Singh reported no conflicts of interest

Attestation: Francois Singh approved the final manuscript

5. Tong J Gan, M.D.

Title: Pr

Affiliation: Department of Anesthesiology, Stony Brook University, Stony Brook, U.S.A.

Email: Tong.Gan@stonybrookmedicine.edu

Role: This author helped write the manuscript

Conflicts: Tong J Gan reported a conflict of interest with Fresenius Investigator for a clinical trial

Attestation: Tong J Gan approved the final manuscript

6. Julien Pottecher, M.D., Ph.D.

Title: Dr

Affiliation: Anesthesia and Intensive Care, Hopital de Hautepierre, University Hospitals of Strasbourg, France

Email: julien.pottecher@chru-strasbourg.fr

Role: This author helped write the manuscript

Conflicts: Julien Pottecher reported a conflict of interest with LFB Biomedicaments One paid lecture in 2013

Attestation: Julien Pottecher approved the final manuscript

7. Francois-Marie Moussalieh, Pharm.D., Ph.D.

Title: Dr

Affiliation: Biophysics and Nuclear Medicine, Hopital de Hautepierre, University Hospitals of Strasbourg, France (current affiliation: ICube, University of Strasbourg / CNRS UMR 7357, Strasbourg, France)

Email: francoismarie.moussalieh@chru-strasbourg.fr

Role: This author helped conduct the study and write the manuscript

Conflicts: Francois-Marie Moussalieh reported no conflicts of interest

Attestation: Francois-Marie Moussalieh has seen the original study data and approved the final manuscript

8. Izzie Jacques Namer, M.D., Ph.D.

Title: Pr

Affiliation: Biophysics and Nuclear Medicine, Hopital de Hautepierre, University Hospitals of Strasbourg, France (current affiliation: ICube, University of Strasbourg / CNRS UMR 7357, Strasbourg, France)

Email: izzie.jacques.namer@chru-strasbourg.fr

Role: This author helped write the manuscript

Conflicts: Izzie Jacques Namer reported no conflicts of interest

Attestation: Izzie Jacques Namer approved the final manuscript

9. Bernard Geny, M.D., Ph.D.

Title: Pr

Affiliation: EA 3072, Laboratoire de Physiologie, FÃ©deration de MÃ©decine Translationnelle, Strasbourg University, France

Email: bernard.geny@chru-strasbourg.fr

Role: This author helped write the manuscript

Conflicts: Bernard Geny reported no conflicts of interest

Attestation: Bernard Geny approved the final manuscript

10. Pierre Diemunsch, M.D., Ph.D.

Title: Pr

Affiliation: Anesthesia and Intensive Care, Hopital de Hautepierre, University Hospitals of Strasbourg, France

Email: pierre.diemunsch@chru-strasbourg.fr

Role: This author helped design the study and write the manuscript

Conflicts: Pierre Diemunsch reported no conflicts of interest

Attestation: Pierre Diemunsch approved the final manuscript

Institution: Anesthesia and Intensive Care, Hopital de Hautepierre, University Hospitals of Strasbourg, FranceEA 3072, Laboratoire de Physiologie, FÃ©deration de MÃ©decine Translationnelle, Strasbourg University, FranceIHU-Strasbourg, University Institute for Image-Guided Surgery, Strasbourg, FranceDepartment of Anesthesiology, Stony Brook University, Stony Brook, U.S.A.Biophysics and Nuclear Medicine, Hopital de Hautepierre, University Hospitals of Strasbourg, FranceICube, University of Strasbourg / CNRS UMR 7357, Strasbourg, France

Short Title: HSA vs HES resuscitation on experimental hemorrhagic shock

Funding: This work was supported with a grant from LFB Biomedicaments. Courtaboeuf, France.

Corresponding Author:

Eric Noll, M.D.

Anesthesia and Intensive Care, Hopital de Hautepierre, University Hospitals of Strasbourg, France

10 avenue Achille Baumann Illkirch Graffenstaden 67400

Phone: +33 (0)3 88 55 23 37
FAX: +33 (0)3 88 11 70 74
Email: eric.noll@chru-strasbourg.fr

Information for LWW regarding depositing manuscript into PubMed Central: This paper does not need to be deposited in PubMed Central.

Study starting date : 6 February 2012

Submitted as a **Research Report**

This manuscript was screened for plagiarism using CrossRefMe.

Abstract :

Background: Protection against acute skeletal muscle metabolic dysfunction and oxidative stress could be a potentially therapeutic target in volume expansion for the severely bleeding patients.

Objectives: This study aims at comparing 130/0.4 hydroxyethyl starch (HES) with 4% albumin for first line volume expansion in experimental hemorrhagic shock (HS) with a particular emphasis on oxidative stress and mitochondrial function.

Design: randomized, experimental study

Setting: Digestif cancer Research institute pre-clinical laboratory, Strasbourg University Hospital, France, from February 2012 to June 2013.

Animals: 20 *large white* pigs.

Intervention: Pressure targeted HS and volume resuscitation (4 % human serum albumin or 130/0.4 HES) was performed in 20 large white pigs.

Main outcomes measures: Muscular biopsy on gastrocnemius muscle were performed for metabolomics screening, mitochondrial respiratory chain assessment and Electron Spin Resonance reactive oxygen species (ROS) production along with arterial and venous ROS production at baseline (T0), and of shock (T1), 90 min (T2) and 180 min (T3) after volume expansion.

Results: Arterial superoxide production between T1 and T2 showed a significant decrease in albumin group ($p=0.02$) but not in the HES group. Venous blood superoxide production significantly decreased between T1 and T2 in the HES group ($p=0.004$). There was a statistically significant decrease in gastrocnemius muscle creatine content from T0 to T2 ($p<0.05$) and T3 ($p<0.05$), in contrast with muscular lactate content and mitochondrial respiratory chain oxidative capacity which remained constant at these respective time points.

Conclusion : The main findings of this study are (1) the systemic reduction in superoxide anions production observed with either albumin or HES, coinciding with (2) a similar protected metabolic profile on skeletal muscle in both HES and albumin resuscitated groups.

Ethical Approval number: 38.2012.01.031

Introduction

Hemorrhagic shock (HS) is a major cause of morbidity and mortality in trauma and surgical practice ^{1 2}. Volume expansion is critical along with hemostatic attempt, particularly before packed red blood cells are available ³. The optimal plasma volume expander to be administered remains controversial ^{4 5}. In the critical care setting, most clinical trials failed to distinguish the effects of the resuscitative fluid itself from other interventions ⁶.

Skeletal muscle (SM) metabolism impairment, such as mitochondrial dysfunction, have recently been shown to play a key role in experimental HS ^{7 8}. Therefore protection against acute SM metabolic dysfunction could be a potentially therapeutic target in the severely bleeding patients.

Oxidative stress (OS) is a key factor in the process of triggering the tissue insults observed during the ischemia-reperfusion sequence observed during treated HS ⁹. Indeed, OS favors microvascular leakage ^{10 11} and mitochondrial dysfunction ^{7 12}.

Experimentally, hydroxyethyl starches (HES) have shown protective effects against OS in HS models ^{13 14}. However, HES have detrimental side effects on hemostasis and renal function limiting their use in the severely bleeding patient. Human serum albumin fluid resuscitation is not associated with these drawbacks and also possesses some biochemical anti oxidative properties ¹⁵. However, human serum albumin effects on skeletal muscle metabolism has not been appropriately assessed in the experimental HS setting.

This study aims at comparing 130/0.4 HES with 4% albumin for first line volume expansion associated with crystalloid perfusion in experimental HS with a particular emphasis on OS and mitochondrial function. Our hypothesis was a similar antioxidant

effect and protective properties on SM mitochondrial metabolism during HS resuscitation with 4% albumin and 130/0.4 HES associated with crystalloid perfusion.

Material and methods:

Animals:

After institutional approval by the institutional Ethical Committee on Animal Experimentation (IRCAD, Strasbourg, France, approval number: 38.2012.01.031 on the 6 February 2012, Chair: Pr D. Mutter), 20 *Large White* pigs were studied under standardized general anesthesia.

All animals used in the experimental laboratory were managed according to the ARRIVE guidelines, French laws for animal use and care as well as directives of the European Community Council (2010/63/EU). Pigs were fasted for 24 hours before surgery with free access to water. Premedication by intramuscular injection of ketamine (20 mg.kg⁻¹) and azaperone (2 mg.kg⁻¹) was administered 1 hour before surgery. After arrival at the surgical lab, animals were weighed and a 22-gauge IV catheter was inserted into an auricular vein with constant saline perfusion (0.9% sodium chloride) at 6 ml.kg⁻¹.h⁻¹ flow during the entire experimental procedure. General anesthesia was induced with IV propofol (3 mg.kg⁻¹) and tracheal intubation (Portex Blue line 6 mm) was facilitated with rocuronium (1 mg.kg⁻¹).

Anesthesia was maintained with 2% end-tidal isoflurane concentration with 60 % nitrous oxide in oxygen^{16 17}. Analgesia was provided with IV tramadol (2 mg.kg⁻¹) every 5 hours. Mechanical ventilation was controlled with an Aisys Carestation (GE Healthcare, United Kingdom) to reach an end-tidal CO₂ concentration between 35 and 45 mmHg¹⁸.

Experimental setting:

A central IV line (Arrow® international) was inserted into the left external jugular vein for central venous blood sampling. An arterial catheter (leader cath, Vygon®) was

placed into the right femoral artery for invasive arterial pressure monitoring and arterial blood sampling.

A controlled hemorrhagic shock was induced by progressive jugular vein blood withdrawal to reach a target mean arterial blood pressure (MAP) of 40 ± 5 mmHg. When required, additional arterial blood subtractions were performed to maintain the target MAP at 40 mmHg during 2 hours. After 2 hours of hypotension, colloidal fluid therapy was initiated with a randomized use of either 4% human serum albumin (Vialebex® LFB Biomedicaments, France) (n=10) or 130/0.4 hydroxyethyl starch (Voluven® Fresenius-Kabi, Finland), (n=10). Colloidal volume expansion depending of the randomized group (HES or Albumin) was added to the basal crystalloid perfusion to compare the two mixed crystalloid-colloidal volume expansion strategies as used in routine clinical setting.

Fluid therapy was stopped after reaching 90% of baseline MAP and the experiment proceeded for 3 additional hours.

Monitoring:

Monitoring included electrocardiography (ECG), oxygen saturation by pulse oxymetry (SpO₂), core temperature monitoring with esophageal probe (Odam Physiogard SM785 TM, France). Normothermia was maintained with an under and upper-body warming blanket.

Heart rate, (MAP), core temperature, SpO₂, were recorded every 15 min for all animals.

Blood Sampling

Arterial blood, central venous blood samples were harvested before the induction of the HS (baseline ,T₀), after 2 hours of bleeding (T₁), 90 min after fluid therapy (T₂) and 180

min after fluid therapy (T3) for planned analysis (arterial blood gas, arterial and venous EPR analysis).

Arterial Blood Gas analysis:

Arterial blood gas and arterial lactate¹⁹ contain were analysed using the Siemens® Rapidlab® 865 Blood Gas Analyser. Blood gas and lactate measurement were performed on 13 animals.

Mitochondrial respiratory chain functional assessment:

Gastrocnemius muscle samples were harvested at baseline (T0), after 2 hours of bleeding (T1), 90 min after fluid therapy (T2) and 180 min after fluid therapy (T3).

Immediately after harvesting, mitochondrial respiratory chain was assessed in the gastrocnemius samples using the saponin skinned fibers technique. This technique, as previously described²⁰, allows an in-depth study of mitochondria in their tissue environment.

After recording the tissular baseline oxygen consumption (V0) the Complex I linked (CI-linked) substrate state respiratory rate was monitored with the adjunction of saturating amount of adenosine diphosphate (ADP). To assess the activity of the mitochondrial respiratory chain complexes II, complex I was then blocked with amital (0,02 mM) and complex II stimulated with succinate (25 mM) for selective complexes II linked substrate state respiratory rate monitoring (CII linked).

After the measurements, fibers were dried at room temperature for 24 h and 15 min at 150°C^{12 20 21}. Respiration rates were expressed as $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g dry weight}^{-1}$.

Metabolomic measurement:

HRMAS NMR spectroscopy was performed for all the tissular samples of the cohort. Tissular samples were prepared at -20°C as previously described^{22 23}. HRMAS NMR spectra were analyzed on a Bruker Avance III 500 spectrometer operating at a proton frequency of 500.13MHz. HRMAS NMR data acquisition and spectra processing were performed as previously described^{22 23}. A one-dimensional (1D) proton spectrum using a Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence²⁴ and 128 transients was acquired for each sample. Free induction decays were multiplied by an exponential window function of 0.3 Hz prior to Fourier transformation and were corrected for phase and baseline distortions using TopSpin 2.1 (Bruker GmbH, Germany). The chemical shift was referenced to the peak of the methyl proton of L-lactate at 1.33 ppm. The quantification procedure was based on the pulse length-based concentration measurement (PULCON) as previously described²³. Spectra were normalized according to each sample weight and calibrated using the signal intensity of a 19.3 nmol reference standard external solution of lactate, scanned under the same analytical conditions. Quantification results were expressed as nmol/mg of tissue.

Electron Spin Resonance (EPR) :

ROS, which has unpaired electrons, could absorb electromagnetic radiation energy and move between energy levels in magnetic field. Through detecting and recording the electromagnetic radiation energy, the ROS concentration could be directly determined with a specific spin probe 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine hydrochloride (CMH) which is specific for superoxide^{25 26}.

Arterial and Venous blood sample were collected in a heparinized syringe and stored on ice at 4°C. After one hour, 20µl of blood were mixed with 20µl of spin probe CMH /Heparin (400uM/100U per mL) solution and introduced in a capillary. Detection of ROS production was conducted using BenchTop EPR spectrometer E-SCAN. The EPR signal is proportional to the unpaired electron numbers and could, in turn, be transformed in absolute produced micromoles ($\mu\text{mol}/\text{min}^{-1}$).

For tissular supeoxyde production, muscular biopsies harvested at the gastrocnemius were incubated in a plate at 37°C with the spin probe CMH (200µM) for 30 minutes under 20 mmHg of oxygen partial pressure (in order to be under physiological conditions) using Gas-Controller (Noxygen Sciences Transfer, Elzach, Germany). Detection of ROS production in the supernatant was conducted using BenchTop EPR spectrometer E-SCAN.

After the EPR measurement, pieces of muscles were dried at room temperature for 24 h and 15 minutes at 150°C, and ROS production was expressed in $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ dry weight.

For comparative analysis between HES and albumin group data are expressed as ratio from T0.

At the end of the procedure the pigs were sacrificed according to our protocol with an intravenous injection of a lethal dose of potassium chloride under deep general anesthesia.

Statistical analysis

Analyses were performed using pooled analysis of the 20 animals to study global hemorrhagic shock effect and comparative analysis of albumin (n=10) and HES group (n=10).

All data are shown as means and standard errors (S.E.M.). The Student's *t* test or analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett multiple comparison test, when appropriate, were used to calculate p values. A $p < 0.05$ (two sided) was required to reject the null hypothesis. Statistical analyses were performed using the Prism© 6 software (GraphPad Software©).

Since there was no previous data to support an educated sample size calculation, this study serves as a pilot to better determine the sample size.

Results:

One animal did not survive throughout the entire study period (5 % global mortality rate). The other animals completed the study. Total body weight, amount of shed blood and colloid resuscitation volumes did not significantly differ between the two treatment groups. The experimental vascular volume management characteristics did not differ between the albumin and HES groups (Table 1). Table 2 shows standard monitoring values and main biological findings. As per protocol, hemorrhage markedly reduced MAP to the target value at T1 and similarly increased heart rates in both groups. Blood lactate concentrations were increased to a similar value in both groups.

The animals' core temperature and SpO₂ did not differ between the study groups at any time point.

EPR superoxide anions production assessment:

Figure 1 shows arterial and venous EPR superoxide production. Pooled analysis including all animals showed significant decrease in arterial blood superoxide production between T0 (baseline) and T2 (90 min after colloid resuscitation initiation, 0.46 ± 0.04 and $0.33 \pm 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ respectively, $p < 0.05$). Venous blood superoxide anions production shows similar trend between T0 and T2 without reaching statistical significance (0.34 ± 0.04 and $0.23 \pm 0.02 \mu\text{mol}/\text{min}^{-1}$ respectively, $p = 0.09$).

Comparative analysis of the arterial blood EPR superoxide production in treatment groups between the end of the shock state (T1) and 90 min (T2) after volume resuscitation showed a significant decrease in albumin group (from 1.02 ± 0.09 to $0.81 \pm 0.09 \mu\text{mol}/\text{min}^{-1}$, $p = 0.02$) but not in the HES group (from 0.77 ± 0.09 to $0.64 \pm 0.03 \mu\text{mol}/\text{min}^{-1}$, $p = 0.15$).

Conversely, venous blood EPR superoxide production significantly decreased between T1 and T2 in the HES group (from 0.88 ± 0.09 to $0.70 \pm 0.09 \mu\text{mol}/\text{min}^{-1}$, $p=0.004$) At the same time points the albumin group showed a trend in decrease (from 0.94 ± 0.06 to $0.78 \pm 0.08 \mu\text{mol}/\text{min}^{-1}$, $p=0.08$).

Figure 2 shows tissue EPR superoxide production in gastrocnemius skeletal muscle. Compared to baseline values, there was no significant change in pooled analysis at T1, T2 and T3. In albumin and HEA groups, comparative analysis at T2 and T3 didn't show any difference.

Gastrocnemius muscle mitochondrial respiratory chain functional assesment:

In pooled analysis of gastrocnemius muscle mitochondrial respiratory chain oxidative capacity : at T1, T2 and T3 compared to T0 there was no statistically change in oxidative capacity considering CI linked substrate state: 2.85 ± 0.25 , 2.71 ± 0.18 , 2.68 ± 0.21 and $3.1 \pm 0.24 \mu\text{mol O}_2.\text{min}^{-1}.\text{g dry weight}^{-1}$, respectively, $p>0.05$), CII linked substrate state: 3.02 ± 0.24 , 2.84 ± 0.16 , 2.87 ± 0.17 and $3.20 \pm 0.23 \mu\text{mol O}_2.\text{min}^{-1}.\text{g dry weight}^{-1}$, respectively, $p>0.05$).

Comparative analysis of the gastrocnemius skeletal muscle mitochondrial respiratory chain oxidative capacity after HES or albumin volume restoration is represented in figure 3. After HES or albumin reanimation CI linked and CII linked substrate state oxidative capacity did not differ from end of shock value (T1) compared to 90 (T2) and 180 min (T3).

Gastrocnemius Muscle Metabolomics screening:

Gastrocnemius muscle lactate content measured with metabolomics screening is shown in figure 4. In pooled analysis, there was no statistically significant variation at T1, T2 and T3 when compared to T0. Comparative analysis between albumin and HES groups did not show any difference at T2 and T3.

Gastrocnemius muscle creatine and phosphorylcreatine content, as assessed with metabolomics screening, is shown in figure 4.

In pooled analysis, there was a statistically significant decrease in gastrocnemius muscle creatine content from T0 ($12.19 \pm 0.57 \text{ nmol.mg}^{-1}$) to T2 ($9.93 \pm 0.73 \text{ nmol.mg}^{-1}$, $p < 0.05$) and T3 ($9.35 \pm 0.78 \text{ nmol.mg}^{-1}$, $p < 0.05$) whereas phosphorylcreatine content did not show any significant variation.

Comparative analysis at T2 and T3 showed no difference between albumin and HES group in gastrocnemius muscle creatine and phosphorylcreatine content.

Discussion:

The main findings of this study are (1) the systemic reduction in superoxide anions production observed with either albumin or HES, coinciding with (2) a similar metabolism profile on skeletal muscle in both HES and albumin resuscitated groups, including maintained mitochondrial oxidative capacity, confined tissue superoxide anions production, a conserved lactate and phosphorylcreatine muscular contents, corresponding to a preserved muscular metabolism.

To our knowledge, this is the first direct experimental finding of systemic decrease in ROS production at the early stage of HS with albumin resuscitation. Albumin is biochemically expected to have free radical-trapping properties due to its cysteine residue representing the main thiol circulating pool ¹⁵ and its six methionine residues. However these biochemical properties had to be confirmed *in vivo* during standardized HS resuscitation.

Our findings confirm the indirect experimental evidences of decreased ROS production during HS resuscitation with 130/0.4 HES. Intestine, lung, liver and brain lipid peroxidation levels were decreased in the 130/0.4 HES treated group compared to the 200/0.5 and succinylated gelatin groups in a volume-targeted HS model in rodents ²⁷. The same finding was observed in a pressure-targeted HS model focusing on ileal levels of lipid peroxidation and comparing 130/0.4 HES, ringer lactate and shed blood ²⁸. On the contrary, increase in systemic ROS production have been suspected during experimental HS resuscitation with lactate Ringer's ²⁹. ROS production seems to be alleviated still not abolished with balanced crystalloid resuscitation ³⁰.

In our study we also focused on the metabolic consequences of HS resuscitation on skeletal muscle. Impairment of heart mitochondrial respiratory chain function has been reported during rodent HS resuscitation combining lactate Ringers solution and shed blood ³¹. Mitochondrial respiratory chain dysfunction is a major cellular insult leading to intense redox signaling, reduced ATP production and impaired cell viability. We already demonstrated in the past mitochondrial respiratory chain involvement in severe pathological situations such as acute lower limb and mesenteric ischemia ^{16 32}. Protection against mitochondrial respiratory chain dysfunction is a major therapeutic goal for acute resuscitation. In our study, mitochondrial respiratory chain function was preserved in both groups during the shock state and the resuscitation period. This mitochondrial protection could have been mediated by the systemic decrease in ROS production ³³.

Metabolomic screening of skeletal³⁴ muscle during the shock and resuscitation time course also showed a protected metabolism profile: decrease in muscular creatine and stable lactate content. Reduced serum content in creatine has been observed in hypothermic resuscitation of HS and was associated with improved survival ⁷. Intramuscular variation of Phosphorylcreatine/creatine content has also been described in left ventricular muscle during experimental ischemic preconditioning procedures³⁴. Phosphorylcreatine/creatine cycle act as a shuttle for high energy phosphate produced in the mitochondrial intermembrane space³⁵ and energy supply source for anaerobic metabolism. Creatine is synthesized in the liver and targeted to the muscle where it is phosphorylated to phosphorylcreatine. The mechanistic relationship between skeletal muscle creatine content and the protective effect observed in some resuscitation strategies has yet to be determined. Our data are showing preserved mitochondrial respiratory rate and stable phosphorylcreatine level, ruling out alteration of high energy

phosphate production. The mechanistic relationship between skeletal muscle creatine content and the protective effect observed in some resuscitation strategies has yet to be determined. Metabolic switch to hibernating-like condition is one of the suggested theories³⁴ for the metabolic shift in the creatinine metabolic pathway.

The stable muscle lactate content is associated with the absence of muscular mitochondrial respiratory chain dysfunction at the resuscitation time point. At the end of the shock period, the lack of lactate increase despite reduced oxygen delivery was somewhat surprising. However this is consistent with microdialysis skeletal muscle interstitial lactate monitoring in another experimental pretransfusionnal hemorrhagic shock model^{36 37}.

This experiment has some limitations. We did not investigate the survival consequences associated with this protected skeletal muscle metabolism profile. This was an exploratory pilot study on acute anti oxidative and muscular effect of two colloids resuscitation strategies that were associated to crystalloid perfusion, albumin and 130/0.4 HES. These results should be further confirmed. There was no crystalloid control group in this study. We decided to compare albumin to the other anti oxidant related colloid: 130/0.4 HES. Introduction of a third group would have limited the power of the statistical analysis or mandated the use of a larger number of animals. This was found unnecessary since a direct comparison between HES and crystalloid has already been investigated in a rodent HS model and showed more intestinal lipid peroxidation with crystalloid resuscitation²⁸. In addition, colloids have been demonstrated to be more efficacious in plasma volume expansion than crystalloids.

Conclusion:

During pressure controlled experimental HS model, albumin and 130/0.4 HES in conjunction with crystalloid perfusion, demonstrated similar systemic antioxidant properties and preservation of skeletal muscle metabolic profile.

ACKNOWLEDGEMENTS :

1. Assistance with the article: none.
 2. Financial support and sponsorship: the study was funded in part with a grant from LFB Biomedicament (Courtaboeuf, France) to the Strasbourg University Foundation and the study drugs (Vialbex) were provided by LFB Biomedicament (Courtaboeuf, France).
 3. Conflicts of interest: EN and JP gave a paid lecture in 2013 for LFB Biomedicament, (Courtaboeuf, France). TJG was investigator in a clinical trial for Fresenius (Bad Homburg, Germany)
 4. Presentation: none declared.
- LFB Biomedicaments wasn't otherwise involved in the study design, data processing, manuscript redaction and submitting process.

References:

1. Minei JP, Cuschieri J, Sperry J, et al. The changing pattern and implications of multiple organ failure after blunt injury with hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 2012;**40**:1129–35
2. Dutton RP, Lee LA, Stephens LS, Posner KL, Davies JM, Domino KB. Massive Hemorrhage: A Report from the Anesthesia Closed Claims Project. *Anesthesiology* 2014;
3. Moore FA, McKinley BA, Moore EE, et al. Inflammation and the Host Response to Injury, a large-scale collaborative project: patient-oriented research core--standard operating procedures for clinical care. III. Guidelines for shock resuscitation. *J Trauma* 2006;**61**:82–9
4. Spahn DR, Bouillon B, Cerny V, et al. Management of bleeding and coagulopathy following major trauma: an updated European guideline. *Crit Care Lond Engl* 2013;**17**:R76
5. Kozek-Langenecker SA, Afshari A, Albaladejo P, et al. Management of severe perioperative bleeding: guidelines from the European Society of Anaesthesiology. *Eur J Anaesthesiol* 2013;**30**:270–382
6. Kehlet H. Multimodal approach to control postoperative pathophysiology and rehabilitation. *Br J Anaesth* 1997;**78**:606–17
7. Luszczek ER, Lexcen DR, Witowski NE, Determan C, Mulier KE, Beilman G. Prolonged induced hypothermia in hemorrhagic shock is associated with decreased muscle metabolism: a nuclear magnetic resonance-based metabolomics study. *Shock Augusta Ga* 2014;**41**:79–84
8. Hancock HM, Stannard A, Burkhardt GE, et al. Hemorrhagic shock worsens neuromuscular recovery in a porcine model of hind limb vascular injury and

- ischemia-reperfusion. *J Vasc Surg* 2011;**53**:1052–62; discussion 1062
9. Douzinas EE, Livaditi O, Tasoulis M-K, et al. Nitrosative and oxidative stresses contribute to post-ischemic liver injury following severe hemorrhagic shock: the role of hypoxemic resuscitation. *PloS One* 2012;**7**:e32968
 10. Kupinski AM, Bock DE, Bell DR. Skeletal muscle ischemia-reperfusion causes transitory increase in microvascular protein permeability. *Am J Physiol* 1997;**273**:H303–9
 11. Kauvar DS, Baer DG, Dubick MA, Walters TJ. Effect of fluid resuscitation on acute skeletal muscle ischemia-reperfusion injury after hemorrhagic shock in rats. *J Am Coll Surg* 2006;**202**:888–96
 12. Pottecher J, Santelmo N, Noll E, et al. Cold ischemia with selective anterograde in situ pulmonary perfusion preserves gas exchange and mitochondrial homeostasis and curbs inflammation in an experimental model of donation after cardiac death. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 2013;**26**:1027–37
 13. Tsai M-C, Chen W-J, Ching C-H, Chuang J-I. Resuscitation with hydroxyethyl starch solution prevents nuclear factor kappaB activation and oxidative stress after hemorrhagic shock and resuscitation in rats. *Shock Augusta Ga* 2007;**27**:527–33
 14. Inan N, Iltar S, Surer H, et al. Effect of hydroxyethyl starch 130/0.4 on ischaemia/reperfusion in rabbit skeletal muscle. *Eur J Anaesthesiol* 2009;**26**:160–5
 15. Oettk K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 2007;**151**:580–90
 16. Diana M, Noll E, Diemunsch P, et al. Enhanced-reality video fluorescence: a real-time assessment of intestinal viability. *Ann Surg* 2014;**259**:700–7

17. Noll E, Bouitbir J, Collange O, et al. Local but not systemic capillary lactate is a reperfusion biomarker in experimental acute limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 2012;**43**:339–40
18. Noll E, Schaeffer R, Joshi G, Diemunsch S, Koessler S, Diemunsch P. Heat loss during carbon dioxide insufflation: comparison of a nebulization based humidification device with a humidification and heating system. *Surg Endosc* 2012;**26**:3622–5
19. Régnier M-A, Raux M, Le Manach Y, et al. Prognostic significance of blood lactate and lactate clearance in trauma patients. *Anesthesiology* 2012;**117**:1276–88
20. Charles A-L, Guibert A-S, Geny B. Effect of pst-conditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Brit J Surg* 2010;
21. Bouitbir J, Charles A-L, Echaniz-Laguna A, et al. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a ‘mitohormesis’ mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J* 2012;**33**:1397–407
22. Piotto M, Moussallieh F-M, Dillmann B. Metabolic characterization of primary human colorectal cancers using high resolution magic angle spinning 1H magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics* 2009;**5**:291–301
23. Piotto M, Moussallieh F-M, Imperiale A. Reproducible sample preparation and spectrum acquisition techniques for metabolic profiling of human tissues by proton high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance; In: Lutz N, editor. 2013. p. 627
24. Meiboom S, Gill D. Modified spin echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev Sci Instrum* 1958;**29**:688–91
25. Dikalov S, Griending KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 2007;**49**:717–27

26. Dikalov SI, Kirilyuk IA, Voinov M, Grigor'ev IA. EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines. *Free Radic Res* 2011;**45**:417–30
27. Chen G, You G, Wang Y, et al. Effects of synthetic colloids on oxidative stress and inflammatory response in hemorrhagic shock: comparison of hydroxyethyl starch 130/0.4, hydroxyethyl starch 200/0.5, and succinylated gelatin. *Crit Care Lond Engl* 2013;**17**:R141
28. Wang P, Li Y, Li J. Protective roles of hydroxyethyl starch 130/0.4 in intestinal inflammatory response and oxidative stress after hemorrhagic shock and resuscitation in rats. *Inflammation* 2009;**32**:71–82
29. Takasu A, Shibata M, Uchino S, Nishi K, Yamamoto Y, Sakamoto T. Effects of arterial oxygen content on oxidative stress during resuscitation in a rat hemorrhagic shock model. *Resuscitation* 2011;**82**:110–4
30. Aksu U, Bezemer R, Yavuz B, Kandil A, Demirci C, Ince C. Balanced vs unbalanced crystalloid resuscitation in a near-fatal model of hemorrhagic shock and the effects on renal oxygenation, oxidative stress, and inflammation. *Resuscitation* 2012;**83**:767–73
31. Karamercan MA, Weiss SL, Villarroel JPP, et al. Can peripheral blood mononuclear cells be used as a proxy for mitochondrial dysfunction in vital organs during hemorrhagic shock and resuscitation? *Shock Augusta Ga* 2013;**40**:476–84
32. Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, et al. Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 2007;**46**:541–7; discussion 547
33. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, et al. Mitochondrial dysfunction results from

- oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest* 2008;**118**:789–800
34. Bravo C, Kudej RK, Yuan C, et al. Metabolomic Analysis of Two Different Models of Delayed Preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2013;**55**:19–26
35. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 2000;**80**:1107–213
36. Audonnet-Blaise S, Krafft M-P, Smani Y, et al. Resuscitation of severe but brief haemorrhagic shock with PFC in rabbits restores skeletal muscle oxygen delivery and does not alter skeletal muscle metabolism. *Resuscitation* 2006;**70**:124–32
37. Leong B, Reynolds PS, Tiba MH, et al. Effects of a combination hemoglobin based oxygen carrier-hypertonic saline solution on oxygen transport in the treatment of traumatic shock. *Resuscitation* 2011;**82**:937–43

Figure legend

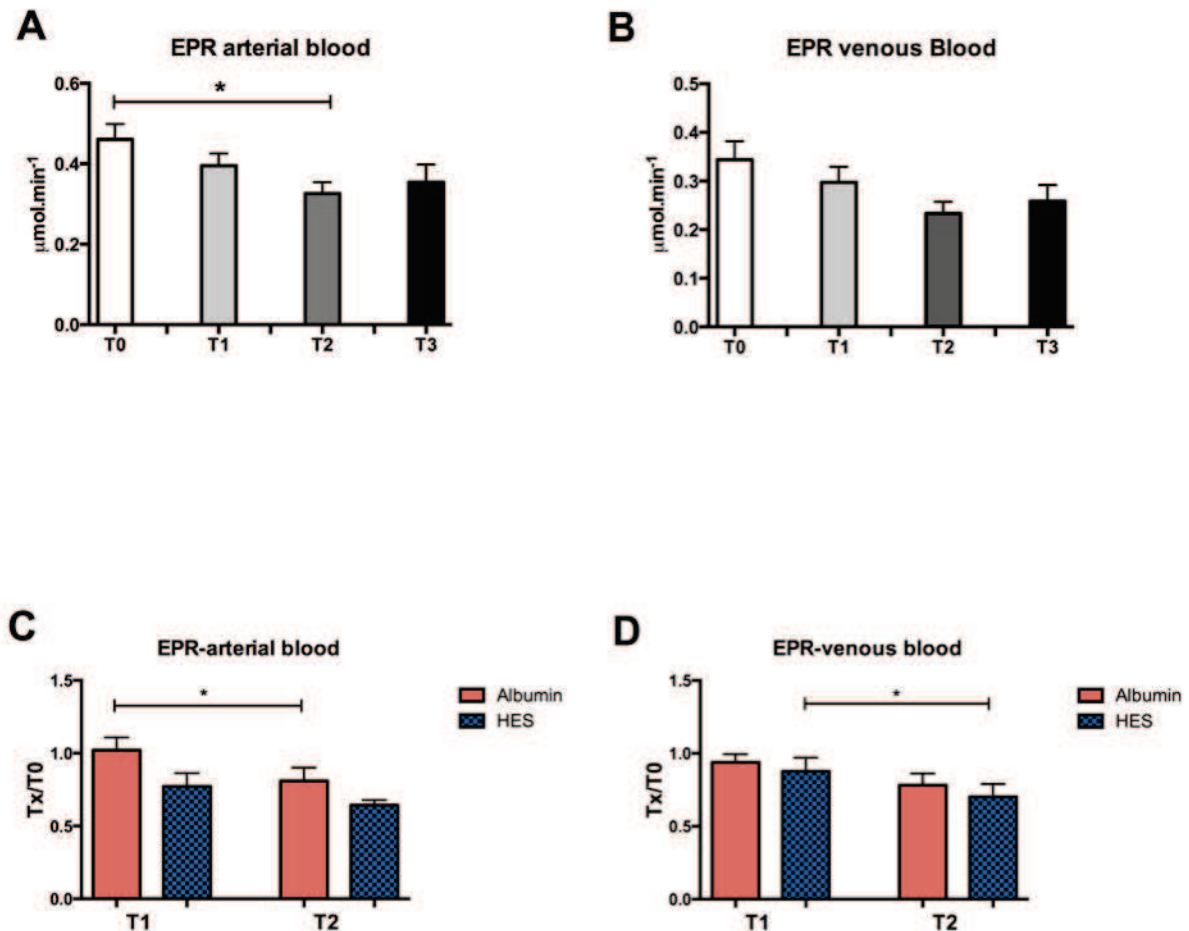


Figure 1:

Effect of hemorrhagic shock (T1), 90 min (T2) and 180 min (T3) colloid resuscitation on arterial and venous superoxide anion production compared to baseline (T0). Pooled albumin and HES group analysis on arterial (A) and central venous (B) blood superoxide anions productions. Comparative analysis of albumin and HES groups arterial (C) and central venous (D) blood superoxide anions productions.

Values are means (s.e.m.). * $p < 0,05$

HES=Hydroxyethylstarch ; EPR=Electron paramagnetic resonance, T_x =T1 or T2

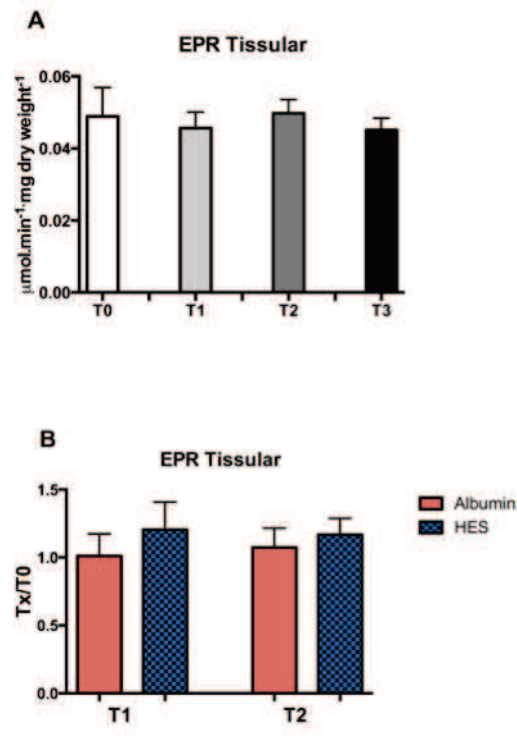


Figure 2:

Effect of hemorrhagic shock (T1), 90 min (T2) and 180 min (T3) colloid resuscitation on gastrocnemius skeletal muscle EPR superoxide anions production assessment compared to baseline (T0). A, pooled albumin and HEA group analysis on gastrocnemius skeletal muscle. B, comparative analysis of albumin and HES groups on gastrocnemius skeletal muscle superoxide anions productions.

Values are means (standard error of the mean [S.E.M.]).

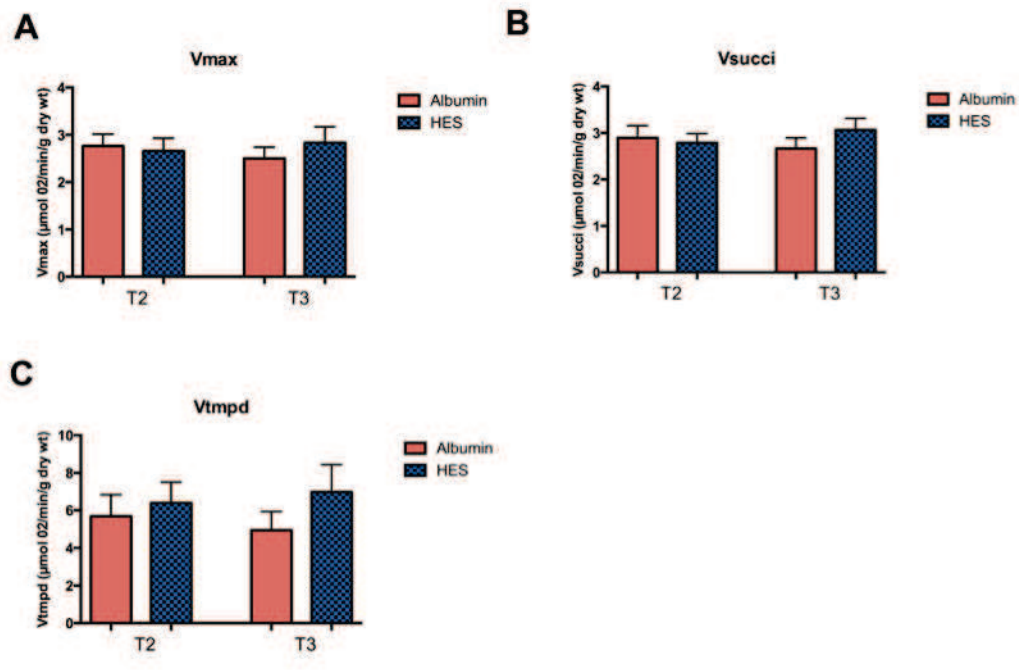


Figure 3 :

Comparative effect of albumin (red bars) and HES (blue bars) volume expansion after hemorrhagic shock, 90 min (T2) and 180 min (T3) after colloid administration, on gastrocnemius skeletal muscle mitochondrial respiratory chain oxidative capacity. **A** Complex I linked oxidative capacity, **B** Complex II linked oxidative capacity. Values are means (S.E.M.), wt, weight.

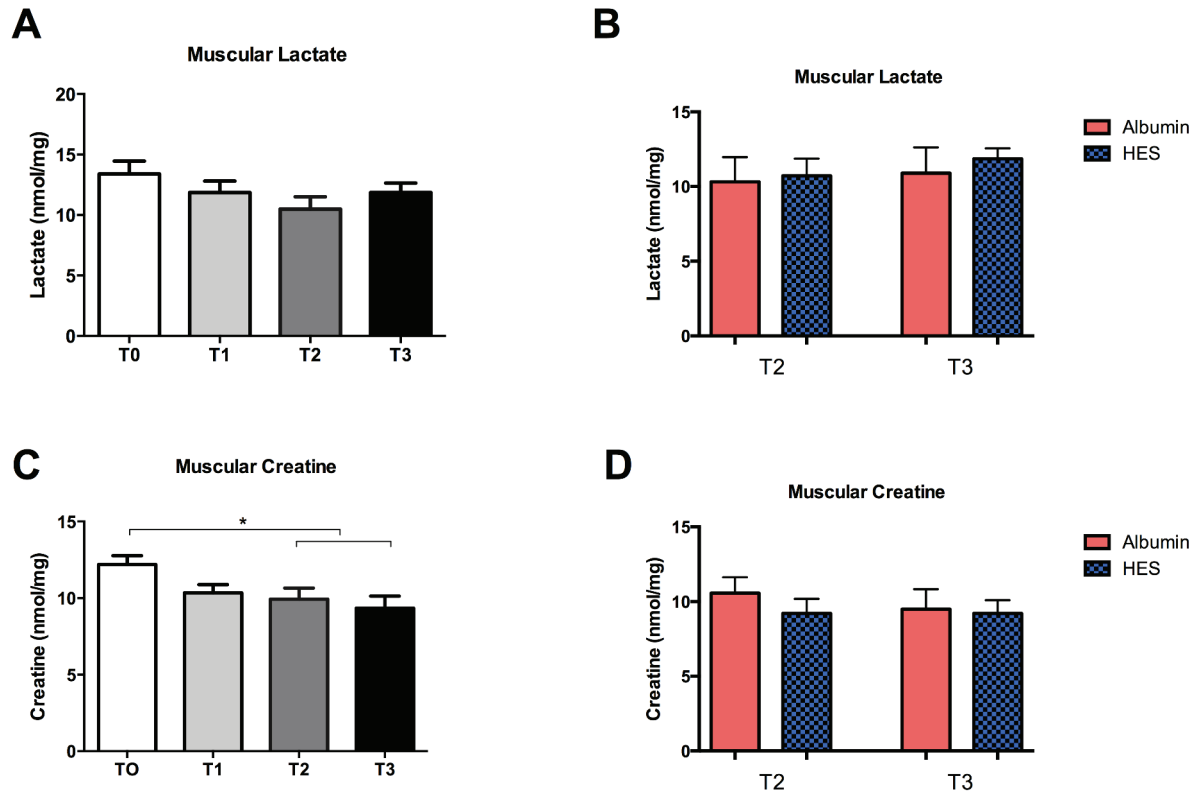


Figure 4 :

Effect of hemorrhagic shock (T1), 90 min (T2) and 180 min (T3) colloid resuscitation on gastrocnemius skeletal muscle metabolomic screening for lactate, creatine and phosphocreatine.

Pooled albumin and HES group analysis on gastrocnemius skeletal muscle lactate **(A)** creatine **(C)** and phosphocreatine **(E)** content. Comparative analysis of albumin and HES groups on gastrocnemius skeletal muscle lactate **(B)**, creatine **(D)** and phosphocreatine **(F)** content.

*p<0.05

Table 1 : volume characterization of the hemorrhage and resuscitation

	HES	Albumin	p
Body Weight (kg)	25.9 ± 1.4	26.1 ± 1.0	0.94
Shed blood (ml.kg ⁻¹)	31.5 ± 1.9	31.5 ± 2.2	0.98
Colloid resuscitation (ml.kg ⁻¹)	22.3 ± 1.9	24.0 ± 3.1	0.63

HES = Hydroxyethylstarch

Table 2: Hemodynamic variables and biochemical data at different experimental time points.

		T0	T1	T2	T3
Heart Rate (Bpm)	HES	91 ± 6	152 ± 17 ^a	122 ± 7	132 ± 6 ^a
	Albumin	78 ± 6	153 ± 16 ^a	137 ± 14 ^a	126 ± 9 ^a
MAP (mmHg)	HES	66 ± 3	40 ± 2 ^a	55 ± 3 ^a	52 ± 3 ^a
	Albumin	63 ± 2	42 ± 2 ^a	51 ± 2 ^a	52 ± 2 ^a
SpO2 (%)	HES	94 ± 2	92 ± 7	89 ± 5	95 ± 3
	Albumin	95 ± 3	98 ± 1	97 ± 1	97 ± 2
Temperature (°C)	HES	36.9 ± 0.5	38.4 ± 0.7	38.0 ± 0.7	38.0 ± 0.8
	Albumin	36.7 ± 0.2	38.0 ± 0.3 ^a	38.0 ± 0.3 ^a	37.8 ± 0.4 ^a
HCO ₃ ⁻ (mmol.l-1)	HES	32.0 ± 1.5	27.9 ± 0;5	27.4 ± 1;9	30.6 ± 0;85
	Albumin	32.4 ± 0.6	29.0 ± 1.0 ^a	30.5 ± 0.7	30.7 ± 0.7
Lactate (mmol.l-1)	HES	1.5 ± 0.4	3.5 ± 0.7 ^a	2.2 ± 0.3	1.5 ± 0.2
	Albumin	1.7 ± 0.2	3.0 ± 0.3 ^a	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.2
Hb (g/dl)	HES	8.6 ± 0.3	7.5 ± 0.4	5.0 ± 0.3 ^a	5.5 ± 0.3 ^a
	Albumin	8.1 ± 0.3	7.7 ± 0.4	5.0 ± 0.4 ^a	4.8 ± 0.3 ^a

^ap<0.05 vs T0 within each group

^bp<0.05 Albumin vs HES group

HES Hydroxytehlstarch

Bpm = beat per minutes, SpO2 = pulse oxymetry, °C= Celsius degrees, Hb=arterial Hemoglobin. T0=baseline, T1=end of bleeding, T2=90 min after volume expansion, T3=180 min after volume expansion.

Enhanced-Reality Video Fluorescence

A Real-Time Assessment of Intestinal Viability

Michele Diana, MD,*[¶] Eric Noll, MD,[†] Pierre Diemunsch, MD, PhD,[†] Bernard Dallemagne, MD,*
Malika A. Benahmed, PhD,[‡] Vincent Agnus, PhD,* Luc Soler, PhD,* Brian Barry, MD, FRCSI,*
Izzie Jacques Namer, MD,[‡] Nicolas Demartines, MD, FACS,[¶] Anne-Laure Charles, PhD,[§]
Bernard Geny, MD, PhD,[§] and Jacques Marescaux, MD, FACS, (Hon) FRCS, (Hon) FJSES*

Objective: Our aim was to evaluate a fluorescence-based enhanced-reality system to assess intestinal viability in a laparoscopic mesenteric ischemia model.

Materials and Methods: A small bowel loop was exposed, and 3 to 4 mesenteric vessels were clipped in 6 pigs. Indocyanine green (ICG) was administered intravenously 15 minutes later. The bowel was illuminated with an incoherent light source laparoscope (D-light-P, KarlStorz). The ICG fluorescence signal was analyzed with Ad Hoc imaging software (VR-RENDER), which provides a digital perfusion cartography that was superimposed to the intraoperative laparoscopic image [augmented reality (AR) synthesis]. Five regions of interest (ROIs) were marked under AR guidance (1, 2a-2b, 3a-3b corresponding to the ischemic, marginal, and vascularized zones, respectively). One hour later, capillary blood samples were obtained by puncturing the bowel serosa at the identified ROIs and lactates were measured using the EDGE analyzer. A surgical biopsy of each intestinal ROI was sent for mitochondrial respiratory rate assessment and for metabolites quantification.

Results: Mean capillary lactate levels were 3.98 (SD = 1.91) versus 1.05 (SD = 0.46) versus 0.74 (SD = 0.34) mmol/L at ROI 1 versus 2a-2b ($P = 0.0001$) versus 3a-3b ($P = 0.0001$), respectively. Mean maximal mitochondrial respiratory rate was $104.4 (\pm 21.58)$ pmolO₂/second/mg at the ROI 1 versus 191.1 ± 14.48 (2b, $P = 0.03$) versus 180.4 ± 16.71 (3a, $P = 0.02$) versus 199.2 ± 25.21 (3b, $P = 0.02$). Alanine, choline, ethanolamine, glucose, lactate, myoinositol, phosphocholine, syloinositol, and valine showed statistically significant different concentrations between ischemic and nonischemic segments.

Conclusions: Fluorescence-based AR may effectively detect the boundary between the ischemic and the vascularized zones in this experimental model.

Keywords: augmented reality, capillary lactate, indocyanine green (ICG) video fluorescence, intestinal viability, ischemia, laparoscopic intraoperative ischemia assessment, metabonomics, mitochondrial, nuclear magnetic resonance, oxidative stress, respiration, spectroscopy.

(Ann Surg 2013;00: 1–8)

From the *IRCAD-IHU; [†]Department of Anesthesiology; [‡]Membrane Biophysics Laboratory and Nuclear Medicine Chemistry Institute, and; [§]Physiology Laboratory, Oxidative Stress, University of Strasbourg, France; and [¶]CHUV, University Hospital of Lausanne, Switzerland.

This work was presented at the annual meeting of the Swiss Society of Biomedical Engineering, August 27–28, 2012, at the Federal Polytechnic School of Lausanne (EPFL).

Disclosure: The authors declare no conflicts of interest.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.annalsofsurgery.com).

Reprints: Michele Diana, MD, Department of Visceral Surgery, CHUV University Hospital of Lausanne, Rue du Bugnon 46, 1011 Lausanne, Switzerland; or IRCAD-EITS, University of Strasbourg, Place de l'Hôpital 1, 67091 Strasbourg, France. E-mail: michelediana@virgilio.it.

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0003-4932/13/00000-0001

DOI: 10.1097/SLA.0b013e31828d4ab3

Sufficient blood supply is of paramount importance for successful anastomotic healing and avoidance of intestinal ischemia and necrosis. Insufficient microcirculation of the anastomosed segments leads to anastomotic leakage and stricture.¹ Intestinal microcirculation and viability are usually estimated from the color of the serosa's surface, the presence of peristalsis, pulsation, and bleeding from marginal arteries. This is subjective and based on the surgeon's experience and may well lead to misinterpretations.² Several methods have been proposed to assess the intestinal viability intraoperatively and guide the extent of the resection.³ The most reliable techniques include spectroscopy and fluorescence methods.

Spectroscopic studies, near-infrared spectroscopy (NIRS) and visible light spectroscopy (VLS), evaluate O₂ tension (StO₂) by assessing the amount of light passing through tissues. On the basis of wavelength, NIRS (700–730 nm) is suitable for all vascular segments whereas VLS (475–625 nm) is suitable mainly for capillaries. In a series of 20 patients undergoing colorectal resection, Hirano et al⁴ showed that StO₂ can be safely and reliably measured by NIRS and that a low StO₂ is strongly related to an increased risk of anastomotic leakage. An important limitation of the StO₂ method is the lack of uniformity in StO₂ measurements between various VLS and NIRS equipment and different wavelength profiles.

Fluorescence studies, perfusion fluorometry or laser fluorescence angiography (LFA), evaluate blood flow by referring to the fluorescence of a dye [fluorescein or indocyanine green (ICG)] when illuminated by a laser.

Kudszus et al⁵ recently evaluated the impact of indocyanine-green LFA in a case-matched study involving 201 patients undergoing open colorectal resection with LFA compared with a retrospective well-matched cohort of 201 patients. Authors found that LFA may significantly reduce the rate of severe complications and the rate of anastomotic leakage.

In 2011, Matsui and Winer evaluated the ability of intraoperative near-infrared (NIR) ICG-based angiography to predict ischemic bowel in an experimental model of mesenteric ischemia in pigs and rats. Authors used the FLARE (Fluorescence-Assisted Resection and Exploration) imaging system, consisting in light-emitting diodes in the spectra of white light (400–650 nm) and NIR fluorescence excitation light (745–779 nm). The exposed bowel images were acquired using customary optics and eventually merged with the ICG fluorescence distribution images. The FLARE demonstrated better accuracy in predicting bowel survival when compared with clinical evaluation alone.⁶

The use of this technology has been limited to open surgery, and new tools are becoming available to extend the benefits of fluorescence-guided surgery to the minimally invasive approach.^{7–9}

Recently, a new incoherent light source (D-light P) equipped with a special filter and special NIR-optimized endoscope to detect the ICG fluorescence signal has been developed by Karl Storz, Tuttlingen, Germany. Our Research and Development department developed the Ad Hoc imaging software (VRRENDER PERFUSION,

IRCAD) to analyze the region of interest (ROI) within the operative field of the high definition laparoscopic camera, extrapolating the tissue perfusion difference by comparing it with a control area. Fluorescence intensity (as time to fluorescence peak) is directly correlated to perfusion, and the software allows to construct a virtual cartography of the perfused area and to overlay it to the laparoscopic image of the patient. This overlaying of real and synthetic images to enhance the definition of anatomic details goes along with the concept of augmented reality (AR).

The aim of this experimental study was to assess the performance and accuracy of a fluorescence-based AR method to evaluate the intestinal perfusion in a model of mesenteric ischemia by comparing the results of the image analyzer software to the objective measurement methods of visceral and cellular ischemic suffering, local capillary lactate level, mitochondrial activity, and the metabonomic fingerprint of ischemia, at the different ROI in the ischemic and nonischemic bowel.

Lactate is the end product of the anaerobic energetic metabolism acting as a biomarker of tissue hypoxia-ischemia. In this experimental study, we aimed to evaluate the capillary lactate level at the small bowel ROIs outlined by the AR. In addition, we measured mitochondrial activity at the ROIs identified by the AR because this is highly dependent on the O₂ supply and reflects cellular energetic status. Finally, the metabonomic profile of ischemia was defined on the ischemic and nonischemic bowel segments as identified with the AR. The “metabolome” or “metabonome” is the complete set of the low-molecular-weight (<1500 Daltons) metabolites found in a system (cell, tissue, or organism) in a specific condition.¹⁰ Assessing the metabonomic profile implies quantifying the dynamic metabolic response of the living system to physiologic or pathologic stimulation.

MATERIALS AND METHODS

Animals

A total of 7 adult swine were used in this nonsurvival study. One pig was involved in the pilot study to establish the technical steps of the experiment and to assess the ICG dose that produces optimal signals for the image analyzer software. Six animals [3 males and 3 females, mean weight 38.3 kg (SD = 10.2)] were involved in the study protocol.

All animals used in the experimental laboratory were managed according to French laws for animal use and care and according to the directives of the European Community Council (number 86/609/EEC). Pigs were fasted for 24 hours before surgery with free access to water. Premedication by intramuscular injection of ketamine (20 mg/kg) and azaperone (2 mg/kg) (Stresnil, Janssen-Cilag, Belgium) was administered 1 hour before surgery. Induction was achieved by intravenous propofol (3 mg/kg) combined with pancuronium (0.2 mg/kg). Anesthesia was maintained with 2% isoflurane. At the end of the procedure, the pig was sacrificed according to our protocol with an endovenous injection of a lethal dose of potassium chloride.

NIR Optimized Laparoscope

To capture the fluorescence signal, the D-light P laparoscope (Karl Storz, Tuttlingen, Germany) was used. The filter of the D-light P can be switched into the light transmission path. The filter transmits light in a range of 690 to 780 nm and completely blocks light of more than 800 nm. In addition, switching the filter out of the light path allows standard white light observation.

Image Analyzer Software

VR RENDER is a proprietary medical imaging analyzer software suite, which allows for 3D reconstruction of Digital Imaging and Communication in Medicine (DICOM) images.

VR-RENDER PERFUSION is a plug-in to the VR RENDER using the Python Scientific Package, with a modified algorithm able to correlate fluorescence over time intensity changes to tissue perfusion.

Determination of the Optimal ICG Dose Regimen

The minimum dose regimen of ICG to obtain a reliable fluorescence that could be converted into a pixel/intensity curve using the VR-RENDER PERFUSION software was determined in a pilot pig in which 4 different doses of ICG—0.05 mg/kg, 0.12 mg/kg, 0.25 mg/kg, and 0.5 mg/kg—were injected intravenously after creation of 4 ischemic small bowel loops. Digital videos were recorded and analyzed with the software during the procedure to determine the dose of ICG allowing for an optimal signal/noise ratio.

Laparoscopic Creation of the Model of Ischemia

A pneumoperitoneum was established with a Veress needle. A vertical midline incision was made and a 10-mm port was introduced through the fascia for the D-Light-P laparoscope (Karl Storz, Tuttlingen, Germany). Two additional 10-mm working ports were placed. A loop of small bowel was identified and suspended using 3 transperitoneal fixing devices (T-Pea Lifter, Surgical Perspective, France). Windows were created in the mesentery and 3 to 4 vessels were clipped. The laparoscope was fixed to an articulated mechanical support to stabilize the image during video capture. After 15 minutes of ischemia, the scope was shifted to laser modality and 0.5 mg/kg of ICG (ICG-PULSION, Pulsion Medical System, Munich, Germany) was rapidly injected intravenously. Ventilation was suppressed for 20 seconds to stop the breathing motion during video capture.

Augmented Reality Identification of the Ischemic Area

The algorithm of the VR-RENDER PERFUSION highlighted the signals generated at maximum fluorescence intensity, at the starting flow point, and at the time to reach peak level. The software was set to detect areas of the bowel in which there was a delay of at least 50% to reach peak of fluorescence intensity. This allowed to construct digital cartography with a code-color correlated to the intestinal perfusion, which was overlapped to the laparoscopic real-time images to obtain AR. The ROIs were marked laparoscopically on the small bowel serosa using a surgical pen mounted over a needle holder and following the profile designed by the AR (Fig. 1). The ROIs were coded as follows: segment 1 (ischemic area); segments 2a and 2b (marginal areas or future resection lines); segments 3a and 3b (vascular areas) (see Supplemental Digital Content 1, which shows the procedure, at <http://links.lww.com/SLA/A370>).

Systemic and Local Capillary Lactates Measurement

After 60 minutes of ischemia, a laparotomy was performed and the small bowel was exteriorized. Systemic capillary lactates were measured on a blood sample obtained by puncturing the groin of the pig, and local capillary lactates were measured on blood samples obtained by puncturing the serosa at the ROI outlined by the AR using a handheld device (EDGE analyzer, Apex Biotechnology, Taiwan). The order of sampling at the ROI was predetermined by means of randomizer software.

Mitochondrial Respiratory Chain Assessment

Full-thickness bowel biopsies were taken at the previously marked ROI following the same predetermined randomized order.

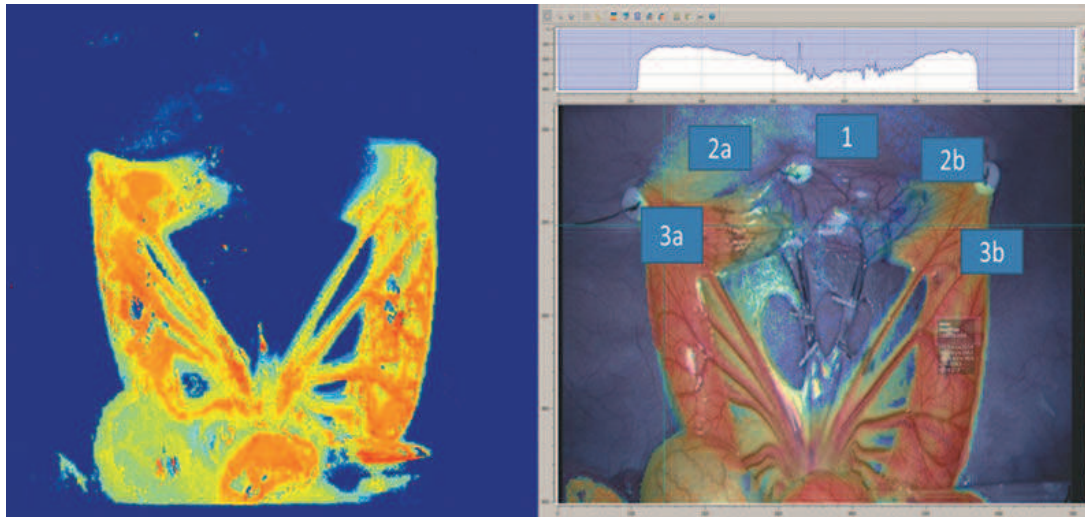


FIGURE 1. Augmented reality identification of the ischemic area. VR RENDER PERFUSION software correlated fluorescence intensity changes over time to the tissue perfusion. The algorithm highlighted the signals generated at maximum fluorescence intensity, at the starting flow point, and at the time to reach peak level. This allowed to put together a digital cartography correlated to the intestinal perfusion, which was overlapped to the real-time laparoscopic images. The ROIs were marked laparoscopically on the small bowel serosa using a surgical pen mounted over a needle holder and following the profile designed by the fluorescence-based augmented reality. The ROIs were coded as follows: segment 1 (ischemic area), segments 2a and 2b (marginal areas), segments 3a and 3b (vascular areas).

Mitochondrial activity was determined as previously reported.¹¹ Intestinal biopsies were quickly cut into 5 pieces each (1–2 mm³) allowing mitochondria challenge within their cellular environment. The samples were placed in a 2 mL water-jacketed oxygraphic cell (Oxygraph-2k, Oroboros instruments, Innsbruck, Austria) equipped with a Clark electrode. After determination of basal oxygen consumption (V_0), the maximal tissue respiration rates were measured at 37°C under continuous stirring in the presence of saturating amount of adenosine triphosphate as phosphate acceptor (V_{max}). Once V_{max} has been recorded, electron flow goes through complexes I, III, and IV, because of the presence of glutamate (5 mmol/L) and malate (2 mmol/L). Complex I was then blocked with Amytal (0.02 mmol/L) and complex II was stimulated with succinate (25 mmol/L). In this condition, mitochondrial respiration is evaluated by complexes II, III, IV (V_{succ}). Finally, N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD, 0.5 mmol/L) and ascorbate (0.5 mmol/L) were added as an artificial electron donor to cytochrome c. So, cytochrome c oxidase (complex IV) is studied as an isolated step of respiratory chain (V_{tmpd}).

After the experiments, tissues were harvested and dried (15 minutes at 150°C) and respiration rates were expressed as pmol of oxygen/second/mg of dry weight.

Magnetic Resonance Spectroscopy Metabonomics Measurement

A small quantity of the same full-thickness small bowel biopsies taken at the ROI following the predetermined randomized order was immediately snapped frozen in liquid nitrogen to stop any metabolic activity and sent for magnetic resonance spectroscopy. High-resolution magic-angle spinning (HRMAS) spectra were recorded on a Bruker Advance III 500 spectrometer (Bruker Biospin, Fällanden, Switzerland) operating at a proton frequency of 500.13 MHz. The spectrometer is equipped with a 4-mm double-resonance (1H, 13C) gradient HRMAS probe. A Bruker Cooling Unit regulates the temperature at 4°C. All nuclear magnetic resonance (NMR) experiments were conducted on samples spinning at 3502

Hz. For each biopsy sample, a 1D 1H spectrum using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence was acquired as previously reported.¹² Metabolites were quantified using the 1D CPMG spectra. Spectra were normalized according to each sample weight and calibrated using the signal intensity of a reference solution containing a known amount of lactate.¹³ Peak area integration was used to calculate the concentration. For our experiments, only peaks that were well resolved in 1D CPMG spectra were quantified using MatLab R2010 (MathWorks, France).

Statistical Analysis

Statistics were performed using the GraphPad Prism 5 software. The *t* test or the analysis of variance analyses followed by the Dunnett Multiple Comparison test were used to calculate *P* values for continuous variables, when appropriate. A nonparametric Spearman correlation was also performed when required. A *P* < 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

The optimal dose of ICG giving the best signal/noise ratio using the setting D-Light (Karl Storz) and the customary VR-RENDER plug-in was determined at 0.5 mg/kg in the pilot study. The surgical procedure was uneventful. Establishment of small bowel ischemia was systematically reproduced in all animals.

Mean *fluorescence time-to-peak* in segment 1 (= ischemic area) was 12.89 seconds (SD = 7.02) and was significantly longer when compared with segments 2a + 2b (= future resection lines) in which it was 6.01 seconds (SD = 3.44), *P* = 0.01, and to segments 3a + 3b (= vascular zones) in which it was 5.69 seconds (SD = 3.68), *P* = 0.01. There was no statistically significant difference between marginal (2a + 2b) and vascular (3a + 3b) zones.

Mean *systemic lactate* level was 0.95 mmol/L (SD = 0.5). Mean *local capillary lactates* levels were statistically significantly higher in the segment 1 (3.98 mmol/L; SD = 1.91) than in segments 2a-2b (1.05 mmol/L; SD = 0.46) and segments 3a-3b (0.74 mmol/LSD 0.34). The nonparametric Spearman correlation showed

a correct relationship between local lactates and fluorescence time-to-peak in the ischemic area ($\rho = 0.71$) and a decreasing correlation in future resection lines ($\rho = 0.5$ for 2a and $\rho = 0.42$ for 2b) and in vascular areas ($\rho = 0.33$ and 0.30).

Mitochondrial Respiratory Chain

Mean V_0 (basal oxygen consumption) in the ischemic area (segment 1) was 66.4 pmol O_2 /s/mg (SD = 25.67), and as a result lower when compared with the mean values of all the other segments, reaching a statistically significant difference when compared with the mean values of segment 3a (110 pmol O_2 /s/mg; SD = 24.68).

Mean $V_{\max}$ (complexes I, III, IV) was statistically significantly reduced in the ischemic zone (104.4 pmol O_2 /s/mg of dry tissue; SD = 52.87) when compared with resection line 2b (191.1 pmol O_2 /s/mg of dry tissue; SD = 25.08) ($P = 0.03$) and to both perfused zones 3a (180.4 pmol O_2 /s/mg of dry tissue; SD = 37.36) ($P = 0.02$) and 3b (199.2 pmol O_2 /s/mg of dry tissue; SD = 50.41) ($P = 0.02$).

Mean V_{succi} (complexes II, III, IV) was statistically significantly reduced in the ischemic zone (105.3 pmol O_2 /s/mg of dry tissue; SD = 58.14) when compared with zones 2b (213.2 pmol O_2 /s/mg of dry tissue; SD = 22.75) ($P = 0.02$) and 3b (219.1 pmol O_2 /s/mg of dry tissue; SD = 63.86) ($P = 0.01$).

Mean V_{tmpd} (complex IV) was lower in the ischemic zone when compared with both resection lines and vascular zones but the difference was not statistically significant.

Metabonomics

A total of 23 metabolites were quantified in the small bowel biopsies by the NMR HRMAS: (1) lactate, (2) glucose, (3) acetate, (4) alanine, (5) ascorbic acid, (6) asparagine, (7) aspartate, (8) choline, (9) creatinine, (10) ethanolamine, (11) glutamine, (12) glutamate, (13) glutathione, (14) glycerophosphocholine, (15) glycine, (16) lysine, (17) myoinositol, (18) phenylalanine, (19) phosphocholine, (20) sylloinositol, (21) taurine, (22) tyrosine, and (23) valine. For the remaining metabolites, quantification was compromised because of low signals and/or overlapping of the spectra. Among these metabolites, statistically significant different concentrations (expressed in nmol/mg of tissue) between the ROIs 2a, 2b, 3a, and 3b when compared with the ischemic segment 1 were found for alanine, choline, ethanolamine, glucose, lactate, myoinositol, sylloinositol and valine (Fig. 2). No statistically significant differences in concentrations were found between segments 2a or 2b (resection lines) versus 3a or 3b (vascular zones).

DISCUSSION

Proper evaluation of bowel perfusion is the key to success for resection anastomoses in surgery of the gastrointestinal tract. Indeed, improvement in local perfusion due to the development of collateral circulation is unlikely to occur during the first 5 days after a bowel resection with inadequately vascularized margins.¹⁴ Consequently, anastomotic perfusion and intestinal viability are determined at the time of surgery and should be assessed correctly during the surgical procedure. Implementation in the clinical routine of an objective and accurate assessment method of intestinal blood supply could be desirable to decrease the rate of anastomotic complications directly ascribable to reduced perfusion.

Fluorescence-based methods are the most promising, and new platforms are now available for intraoperative assessment in the setting of minimally invasive laparoscopic surgery. However, interpretation of the fluorescence signal in NIR video mode without any image manipulation is difficult. In the present experimental study, we propose a new fluorescence videography-based real-time AR tool to guide the intestinal resection and to assess vascular supply at the future anastomotic site.

Surgical AR is the process of superimposing virtual images of a patient to real-time intraoperative images to “augment” the live view. Virtual images are generally generated by software manipulation of preoperative DICOM images (CT-SCAN, NMR, or US) to obtain a virtual 3D model of the patient. Currently, the virtual model allows surgeons to navigate into the patient’s anatomy and plan the surgical procedure. More recent developments aim at integrating the model in the real intraoperative images allowing to guide the surgical procedure by precise discrimination of crucial anatomical details and organ relationships.^{15,16} One of the main limitations of AR is in that the virtual model is a snapshot of the preoperative patient anatomy and is not “flexible,” and hence the very low intraoperative accuracy of the AR for mobile structures. In our method of assessment of bowel vascular supply, virtual images are directly generated from the intraoperative “live” image signals produced by the specific laparoscope and light source. The system provides an “intraoperative real-time” virtual digital cartography of bowel vascularization on the basis of the fluorescence signal of ICG, which is directly correlated to perfusion.

ICG is a fluorescent dye, which is used to assess cardiac function and liver function and is a well-tolerated compound with some anaphylactic or urticarial reactions described. The ICG binds totally to albumin and solely stays in the intravascular compartment. The uptake of ICG is an active process, and more than 95% of ICG passes in the bile in 15 minutes provided that hepatic function is normal. The current dose of ICG to determine liver function in humans is 0.5 mg/kg.¹⁷ The optimal dose of ICG in fluorescent studies has not yet been determined. Paschen and Muller¹⁸ evaluated the pharmacokinetic of ICG in pigs using the standard dose of 0.5 mg/kg to evaluate liver blood flow. In our pilot study, the dose providing the optimal signal/noise ratio was also 0.5 mg/kg.

In 2006, Toens et al validated the indocyanine (IC) view videography in a rabbit model of ischemia. Animals were injected with ICG (ICG-PULSION, Pulsion Medical System, Munich, Germany) at 0.25 mg/kg. The regions of interest were illuminated with a laser (0.16 W; wavelength 780 nm). Digital videos were recorded using a digital video camcorder (IC View System, Pulsion Medical System, Munich, Germany), showing uptake, steady-state distribution, and substance clearance. Recorded fluorescence was correlated to tissue perfusion using the specific software (IC-CALC SOFTWARE, Pulsion Medical System, Munich, Germany). The increment of fluorescence (pixel intensity) in regions of interest was measured as the curve steepness of light-emission pixel intensity per second.¹⁹ The accuracy of the IC view in assessing intestinal viability was very high.

The main differences between the Toens et al’s study and our model are as follows: first, we used a laparoscopic platform equipped with a NIR optical system and second, we converted the fluorescence signal into a digital cartography that was overlapped to the live laparoscopic images to guide resection according to perfusion degree. A third major difference lies in the fact that we did not use fluorescence intensity, which is influenced by the distance between light source and target, but fluorescence time-to-peak is independent of the distance and is related to the blood flow, and gives a dynamic information as opposed to fluorescence intensity alone. The software’s algorithm was initially set to discriminate a difference of 50% in fluorescence intensity between the ROIs when compared to the manufacturer’s standard, which is a “calibration aid” provided by Pulsion Medical consisting in a sterile plastic card with a squared spot that gives a constant signal when illuminated by NIRS (Fig. 3). After the pilot pig was used, the software setting was changed to identify a 50% rise in time-to-peak (perfusion delay) and alter the color code attributing an “empty spot” to the digital perfusion cartography when the rise in the fluorescence signal was delayed by more than 50%. With this setting, fluorescence-based AR videography allowed to precisely identify the ischemic region and the well-vascularized bowel in our model. The

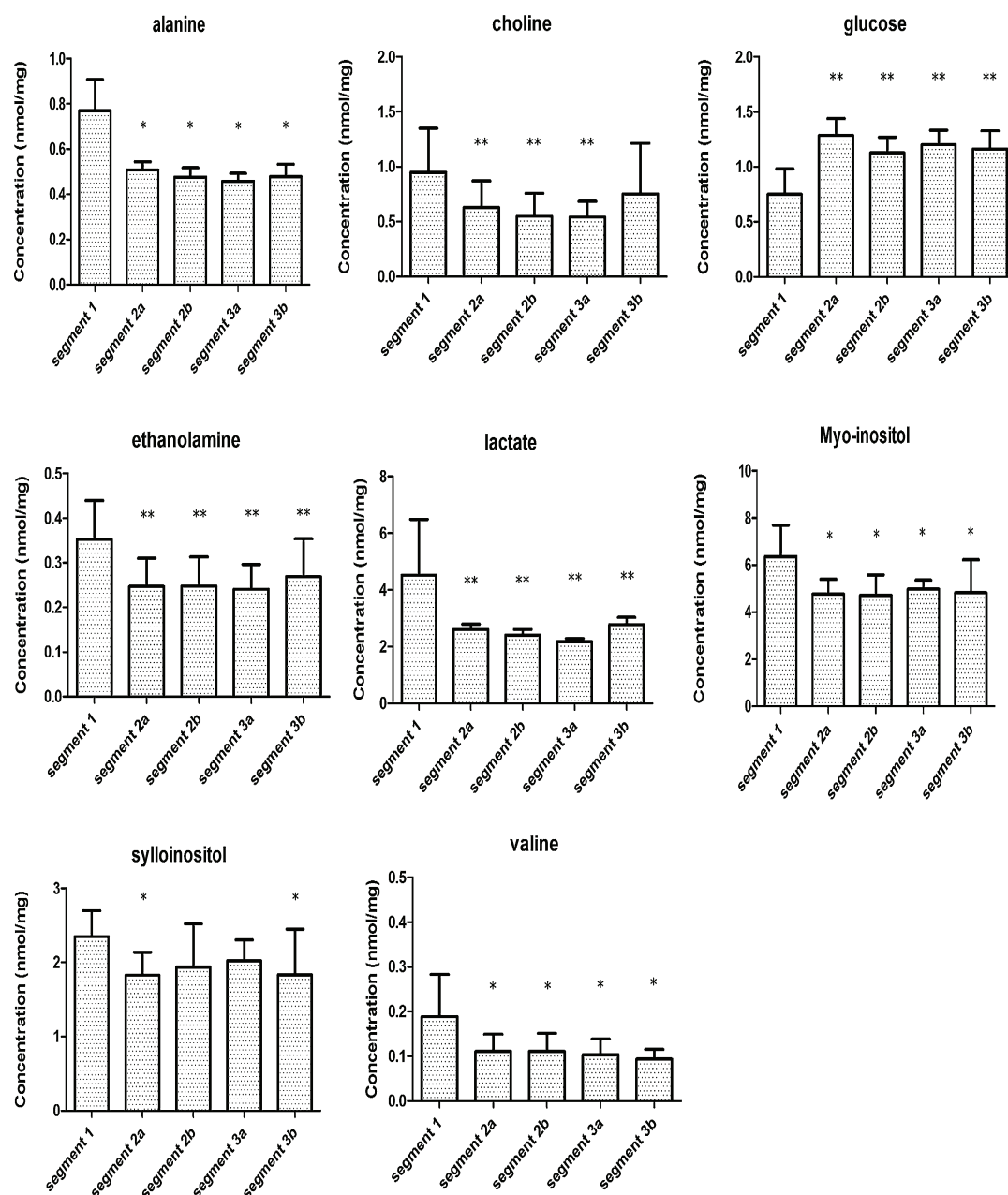


FIGURE 2. Metabolites presenting statistically significant different concentrations between the ischemic (= segment 1) resection lines (= segment 2a-2b) and vascular zones (= segment 3a-3b). Metabolites concentrations are expressed as nmol/mg of tissue. Analysis of variance test followed by Dunnett's test comparing the metabolites concentration in the ischemic segment (segment 1) with segments 2a, 2b, 3a, and 3b. $P < 0.05$ was considered statistically significant. * $P < 0.05$; † $P < 0.001$.

results provided by our system were compared to objective measures of visceral and cellular suffering. Lactate is the end product of the anaerobic energetic metabolism and an increase in lactate levels reflects hypoxic-ischemic conditions.

Systemic capillary lactate is of prognostic interest in mesenteric ischemia but its increase is slow and not suitable for early diagnosis.²⁰ Local capillary lactate,²¹ directly sampled at the ischemic site and measured with the Lactate Pro device (LT170, Arkay, KGK, Japan), appeared more accurate in an ischemic leg model showing both rapid increase during ischemia and a rapid decrease during reperfusion. In our experimental study, we aimed to evaluate the capillary lactate level at the ROIs outlined by the AR using the Edge handheld device. The system provided a fast, consistent, and quantitative evaluation

of the grading of ischemia in this 1-hour model of ischemia. The fluorescence-based laparoscopic augmented-reality system allowed to precisely identify the resection line separating the ischemic zone from vascular areas with a good correlation between fluorescence time-to-peak and capillary lactate level ($\rho = 0.71$ for the ischemic area).

Mitochondria are the main source of energy of cells through a process known as "oxidative phosphorylation." This is a complex phenomenon. Schematically, it starts with a series of redox reactions in which electrons are transferred from donors (NADH or QH_2) to the most electronegative acceptor, which is oxygen (O_2). This electron transport chain produces the energy necessary to generate an electrochemical gradient across the mitochondrial membrane by

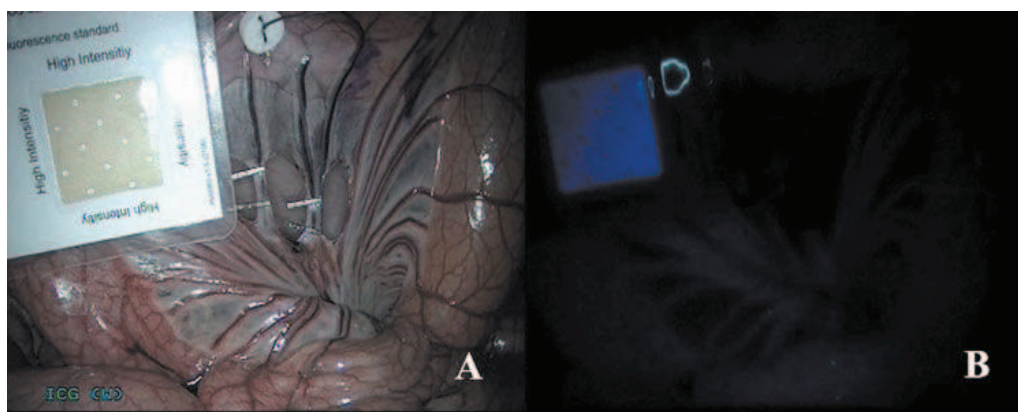


FIGURE 3. Laparoscopic view of the calibration aid. A calibration aid consisting in a sterile plastic card with a squared spot that gives a constant signal when illuminated by NIRS (Pulsion Medical) was inserted through a small laparotomy and used as a reference for fluorescence intensity to eliminate the variable “distance” between light source and target. (A) White light laparoscopic image showing the calibration aid close to the ischemic small bowel loop. (B) Near-infrared illuminated image showing fluorescence intensity of the reference spot as compared to fluorescent mesenteric vessels.

actively pumping H⁺ protons into the intermembrane space. The transmembrane gradient is used to produce the “cellular currency of energy,” adenosine triphosphate. There are 3 enzymatic proton pumps: complexes I, III, and IV.

Ischemic lesions, by reducing the presence of O₂ as terminal electron acceptor, impair complexes I, III, and IV, and the transmembrane gradient is consequently abolished with energy depletion and cellular necrosis.¹³ In our 1-hour model of mesenteric ischemia, we found an already significant impairment of respiratory chain in the ischemic zone as compared with the nonischemic segments as expressed by the V_{max} and V_{succi}. The fluorescence-based AR could effectively differentiate the small bowel zones presenting these very early signs of energetic suffering. The preserved activity of complex IV (V_{tmpd}) can be easily explained by the short duration of the ischemia and is a sign of cellular viability, because the reactions depending on complexes I and III are ready reversible in the ischemia-reperfusion models. It would be of particular interest to assess the mitochondrial respiration at different time points to exactly establish the point of no return and if fluorescence AR would be able to exactly determine whether this limit has been outreached.

There are 2 main techniques to analyze the metabolome: Mass spectroscopy and NMR spectroscopy. NMR spectroscopy is rapid, cost-effective, nonselective (i.e., it removes bias for a specific molecule), and by this sample preparation requires minimal manipulation and gives metabolic information on intact biological tissues. All in all, the principle of NMR spectroscopy is similar to the MR imaging process. The sample is placed into a magnetic field that aligns molecular nuclear spins. The application of a radiofrequency pulse enhances the energy level by inverting spin orientation, and the magnetization of the sample is deflected away from the magnetic field. Switching off the radiofrequency pulse allows the spins to relax to the original and stable energy level. This modification produces a detectable NMR signal that can be analyzed. Each molecule is identified by a series of spikes in the spectrum (Fig. 4) and the area under the peak is proportional to the concentration. The NMR spectrum of most metabolites has been analyzed and new spectra may be extrapolated on the basis of the available metabolic fingerprints. NMR spectroscopy has been used to characterize malignant tissues.^{22,23} Our laboratory of membrane physics reported on the usefulness of metabolomic profiling to determine the adequacy of lung transplant.²⁴ Vincenti et al²⁵ assessed metabolomic profiling in small bowel samples after induction of intestinal ischemia-reperfusion injury by mesenteric artery

or portal vein outflow occlusion in rats. Similarly to our study, the authors found dramatic changes in the intestinal biochemical profile and outlined 9 metabolites (out of 43 quantified) as being significantly different among the mesenteric artery, portal vein, and sham groups. Among these metabolites, there were glucose, lactate, and amino acids such as glutamate, glutamine, methionine, valine, leucine, and isoleucine.

In our model, metabolic profiles demonstrated decreased glucose levels and increased tissue lactate and amino acids following ischemia, showing an increased anaerobic glycolysis. The significant increase of choline, ethanolamine, syloinositol, and myoinositol, which are phospholipids involved in the cellular membrane integrity, may represent an early sign of cellular ischemic damage. Interestingly, in our study, the glutathione, which is one of the most important endogenous antioxidant functions, and thereby an important marker of oxidative stress,²⁶ was only marginally modified and was not different in the ischemic, marginal, and vascular zones. This is due to the short duration of ischemia in our model (1 hour), which is not sufficient to generate irreversible tissue damage. The same consideration applies to glutamate, glutamine, and creatinine, which were also within normal value range. The small bowel samples analyzed for metabolic profile were taken after the vascular cartography generated by AR in a randomized fashion to reduce the influence of the time “ischemia start-to-sampling” of a specific ROI in the analysis, because metabolites are extremely labile and all metabolic activity has to be blocked immediately after sampling (by snap freezing tissue).

To summarize, there was a strong agreement between the fluorescence-based AR discrimination of the intestinal perfusion at the ROIs and different markers of cellular energetic status and metabolism: local lactates, mitochondrial respiration rate, and metabolomic profiling. The main aim of the present study was to show the feasibility of the technique and to identify precise outcomes to allow for the reduction in the number of experimental subjects. In fact, the outcome of anastomotic leak or stricture would require a very large number of animals to evaluate the superiority of fluorescence-based AR to determine intestinal viability when compared with clinical assessment alone. The surrogate use of cellular suffering markers (metabolomics and mitochondrial respiratory rate) might considerably reduce the number of experimental subjects. Further experimental studies to evaluate the clinical interest of this technology including survival models with digestive resections and anastomoses are currently underway at our institute.

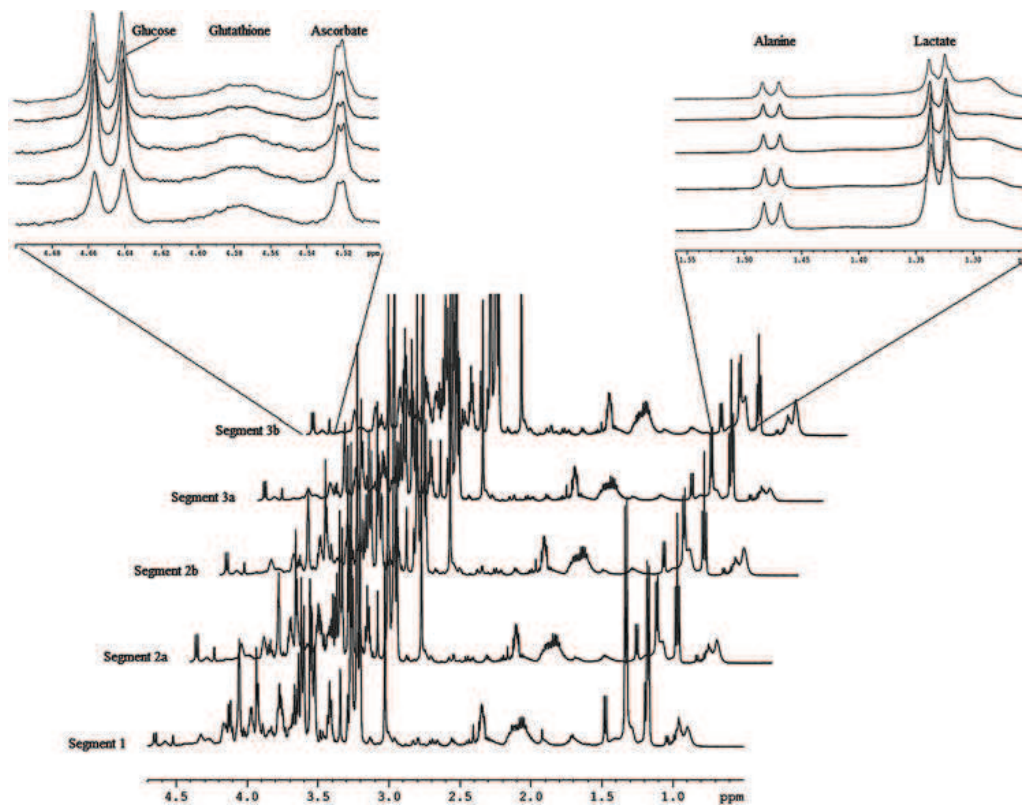


FIGURE 4. NMR high-resolution magic angle spin spectra. ^1H NMR HRMAS spectra performed on pig bowel biopsies obtained after AR identification of the ROI: ischemic zone (segment 1), marginal zones (segments 2a and 2b), and vascularized zones (segments 3a and 3b). Each molecule is identified by a series of spikes in the spectrum and the area under the peak is proportional to the concentration (nmol/mg of tissue).

CONCLUSIONS

This experimental study gives robust evidence that fluorescence-videography-based real-time AR system may effectively detect the boundary between the ischemic and the vascularized area in a laparoscopic model of mesenteric ischemia. Further experimental studies are underway to evaluate this technology to intraoperatively determine intestinal perfusion and viability at the future anastomotic site in various surgical procedures to reduce the risk of anastomotic or leak or stricture.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Guy Temporal and Christopher Burel for their valuable assistance in proofreading the manuscript. D-Light Laparoscope was kindly provided by Karl Storz (Tübingen, Germany).

REFERENCES

- Karliczek A, Benaron DA, Baas PC, et al. Intraoperative assessment of microperfusion with visible light spectroscopy for prediction of anastomotic leakage in colorectal anastomoses. *Colorectal Dis.* 2010;12:1018–1025.
- Karliczek A, Harlaar NJ, Zeebregts CJ, et al. Surgeons lack predictive accuracy for anastomotic leakage in gastrointestinal surgery. *Int J Colorectal Dis.* 2009;24:569–576.
- Urbanavicius L, Pattyn P, de Putte DV, et al. How to assess intestinal viability during surgery: a review of techniques. *World J Gastrointest Surg.* 2011;3:59–69.
- Hirano Y, Omura K, Tatsuzawa Y, et al. Tissue oxygen saturation during colorectal surgery measured by near-infrared spectroscopy: pilot study to predict anastomotic complications. *World J Surg.* 2006;30:457–461.
- Kudszus S, Roesel C, Schachtrupp A, et al. Intraoperative laser fluorescence angiography in colorectal surgery: a noninvasive analysis to reduce the rate of anastomotic leakage. *Langenbeck's Arch Surg.* 2010;395:1025–1030.
- Matsui A, Winer JH, Laurence RG, et al. Predicting the survival of experimental ischaemic small bowel using intraoperative near-infrared fluorescence angiography. *Br J Surg.* 2011;98:1725–1734.
- Cahill RA, Anderson M, Wang LM, et al. Near-infrared (NIR) laparoscopy for intraoperative lymphatic road-mapping and sentinel node identification during definitive surgical resection of early-stage colorectal neoplasia. *Surg Endosc.* 2012;26:197–204.
- Cahill RA, Mortensen NJ. Intraoperative augmented reality for laparoscopic colorectal surgery by intraoperative near-infrared fluorescence imaging and optical coherence tomography. *Minerva Chirurgica.* 2010;65:451–462.
- Cahill RA, Ris F, Mortensen NJ. Near-infrared laparoscopy for real-time intra-operative arterial and lymphatic perfusion imaging. *Colorectal Dis.* 2011;13:12–17.
- Goldsmith P, Fenton H, Morris-Stiff G, et al. Metabonomics: a useful tool for the future surgeon. *J Surg Res.* 2010;160:122–132.
- Mansour Z, Bouitbir J, Charles AL, et al. Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg.* 2012;55:497–505.
- Imperiale A, Elbayed K, Moussallieh FM, et al. Metabolomic pattern of childhood neuroblastoma obtained by ^1H -high-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *Pediatr Blood Cancer.* 2011;56:24–34.
- Charles AL, Guilbert AS, Bouitbir J, et al. Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br J Surg.* 2011;98:511–516.
- Seike K, Koda K, Saito N, et al. Laser Doppler assessment of the influence of division at the root of the inferior mesenteric artery on anastomotic blood flow in rectosigmoid cancer surgery. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22:689–697.
- D'Agostino J, Diana M, Vix M, et al. 3D virtual neck exploration prior to parathyroidectomy. *N Engl J Med.* 2012;367:1072–1073.
- Marescaux J, Rubino F, Arenas M, et al. Augmented-reality-assisted laparoscopic adrenalectomy. *JAMA.* 2004;292:2214–2215.

17. Torzilli G, Makuuchi M, Inoue K, et al. No-mortality liver resection for hepatocellular carcinoma in cirrhotic and noncirrhotic patients: is there a way? A prospective analysis of our approach. *Arch Surg*. 1999;134:984–992.
18. Paschen U, Muller MJ. Liver blood flow measured by indocyanine green in conscious unrestrained miniature pigs. *Res Exp Med (Berl)*. 1987;187:71–79.
19. Toens C, Krones CJ, Blum U, et al. Validation of IC-VIEW fluorescence videography in a rabbit model of mesenteric ischaemia and reperfusion. *Int J Colorectal Dis*. 2006;21:332–338.
20. Alves WF, Aguiar EE, Guimaraes SB, et al. L-alanyl-glutamine preoperative infusion in patients with critical limb ischemia subjected to distal revascularization reduces tissue damage and protects from oxidative stress. *Ann Vasc Surg*. 2010;24:461–467.
21. Noll E, Bouitbir J, Collange O, et al. Local but not systemic capillary lactate is a reperfusion biomarker in experimental acute limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012;43:339–340.
22. Lehnhardt FG, Rohn G, Ernestus RI, et al. ¹H- and ³¹P-MR spectroscopy of primary and recurrent human brain tumors in vitro: malignancy-characteristic profiles of water soluble and lipophilic spectral components. *NMR Biomed*. 2001;14:307–317.
23. Rocha CM, Barros AS, Gil AM, et al. Metabolic profiling of human lung cancer tissue by ¹H high resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *J Proteome Res*. 2010;9:319–332.
24. Benahmed MA, Santelmo N, Elbayed K, et al. The assessment of the quality of the graft in an animal model for lung transplantation using the metabolomics ¹H high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Magn Reson Med*. 2012;68:1026–1038.
25. Vincenti M, Behrends M, Dang K, et al. Induction of intestinal ischemia reperfusion injury by portal vein outflow occlusion in rats. *J Gastroenterol*. 2010;45:1103–1110.
26. Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact*. 1998;111–112:1–14.

Metabolism-Guided Bowel Resection: Potential Role and Accuracy of Instant Capillary Lactates to Identify the Optimal Resection Site

Surgical Innovation

1-9

© The Author(s) 2015

Reprints and permissions:

sagepub.com/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/1553350615598620

sri.sagepub.com



Michele Diana, MD^{1,2,3}, Eric Noll, MD⁴, Pierre Diemunsch, MD, PhD⁴, François-Marie Moussallieh, PhD⁵, Izzie-Jacques Namer, MD, PhD⁵, Anne-Laure Charles, PhD⁶, Véronique Lindner, MD, PhD⁷, Vincent Agnus, PhD¹, Bernard Geny, MD, PhD⁶, and Jacques Marescaux, MD, FACS, (Hon) FRCS, (Hon) FJSES, (Hon) APSA^{1,2}

Abstract

Background. Strip-based handheld devices can measure lactatemia on capillary blood obtained by needle puncturing. We aimed to assess the kinetic of bowel capillary lactates, metabolomics profiling, and mitochondria respiratory rate in a prolonged model of bowel hypoperfusion. **Materials and Methods.** In 6 pigs, a 3- to 4-cm ischemic segment was created in 6 small bowel loops (total = 36 loops) by clamping the vascular supply, for a duration of 1 to 6 hours. Hourly, 5 blood samples were obtained by puncturing the serosa, and lactates were measured using a handheld analyzer. Samples were made at the following regions of interest (ROIs): center of the ischemic area (1), proximal and distal clinical margins of resection (2a-2b), and vascularized zones (3a-3b). Every hour, surgical biopsies of ROIs were sampled. Activity of bowel mitochondria complexes was measured after 1, 3, and 5 hours of ischemia. Quantification of metabolites was performed on all samples (total N = 180). **Results.** Capillary lactates were significantly higher at ROI 1 versus ROI 3ab at all time points. After 1 hour lactates at the margins were significantly higher than those at vascularized areas ($P = .0095$), showing a mismatch between visual assessment and actual perfusion status. From 2 to 6 hours, there was no difference in lactates between ROIs 2a-2b and 3a-3b. Maximal tissue respiration decreased significantly after 1 hour (ROI 1 vs ROI 3ab). Seven metabolites (lactate, glucose, aspartate, choline, creatine, taurine, and tyrosine) expressed significantly different evolutions between ROIs. **Conclusions.** Capillary lactates could help precisely estimate local bowel perfusion status.

Keywords

capillary lactates, metabolomics profiling, magnetic resonance spectroscopy, oxygraphic mitochondria respiratory rate, bowel hypoperfusion

Introduction

Intestinal perfusion is a crucial parameter to promote optimal digestive anastomotic healing after intestinal resections. Clinical intraoperative evaluation of bowel perfusion is based on macroscopic subjective criteria (eg, the color of the serosa), which are unreliable.¹

Reduced oxygen supply impairs the mitochondria respiration process and triggers a cytoplasmic low-performance energy-producing process, which is the anaerobic fermentation of 6-carbon sugars. Lactate is the end product of this anaerobic energy shift. The measurement of local production of lactates could precisely inform on the perfusion status of the limited portion of bowel that will be involved in the anastomosis.

¹IRCAD Institute for Research Against Cancer of the Digestive System, Strasbourg, France

²IHU-Strasbourg, University Institute for Image-Guided Surgery, Strasbourg, France

³University of Strasbourg, Strasbourg, France

⁴Department of Anesthesiology, University of Strasbourg, Strasbourg, France

⁵Biophysics and Nuclear Medicine Department, University of Strasbourg, Strasbourg, France

⁶Physiology Institute, EA3072 Mitochondria and Oxidative Stress, University of Strasbourg, Strasbourg, France

⁷Department of Pathology, University of Strasbourg, Strasbourg, France

Corresponding Author:

Michele Diana, IHU-Strasbourg, University Institute for Image-Guided Surgery, 1, Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France.

Email: michele.diana@ircad.fr

Lactatemia can be measured on capillary blood using strip-based devices² within seconds. For example, the Edge lactate analyzer (ApexBio, Taipei, Taiwan, ROC) is a handheld device that measures lactatemia using test strips equipped with a specific biosensor. Only a small amount of blood (<3 μ L) is required, and results are obtained in less than 45 seconds.

In previous experiments, we could demonstrate that capillary local lactates measured directly on blood obtained by needle puncturing of the intestinal serosa represent an accurate marker of intestinal perfusion status³⁻⁵ and that pre-anastomotic lactate levels are predictive of anastomotic healing.⁶

In those experiments the level of bowel perfusion to be identified was preset by a software interface, and lactates were used to assess the accuracy of the software. We used a near-infrared fluorescence videography system integrating a proprietary software able to generate a digital cartography of the perfusion based on the fluorescence time-to-peak of the dye indocyanine green (ICG), and to overlap the digital cartography on real-time laparoscopic images. This technique, named FLER (FLuorescence-based Enhanced Reality), showed good accuracy and correlation with metabolic data and the ability to provide quantitative assessment of organ perfusion. However, FLER analysis require extensive technological resources.

Following experimental works from our anesthesiology and vascular surgery departments,^{7,8} a clinical trial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01634815) is currently ongoing to evaluate local capillary lactates as potential markers of recurrent ischemia in revascularized limbs.

In analogy with the application to vascular surgery, this low-price technology could well represent an easy-to-use and readily available biological marker to assist the surgeon during digestive surgery to correctly assess the anastomotic site in gastrointestinal resections.

The aim of this study was to evaluate the kinetic of instant capillary lactates, mitochondria respiratory rate, and metabolomics profiling in a controlled, prolonged model of bowel ischemia in order to validate the use of local capillary lactates as a tool to guide intestinal resection.

Materials and Methods

Animals

A total of 6 female swine (*Sus scrofa domestica*, ssp. Large White), mean weight 30.2 ± 3.1 kg, were used in this nonsurvival study. There was no specific reason for sex selection, and the resultant cohort of female-only animals was due to chance. The present experimental study is part of an experimental protocol on intestinal ischemia (No. 38.2012.01.039), which received full approval by the local ethical committee on animal experimentation

(ICOMETH, Registration No. 38, agreement from the French Ministry of Higher Education and Research renewed on December 30, 2013). All animals used in the experimental laboratory were managed according to French laws for animal use and care and according to the directives of the European Community Council (2010/63/EU) and the ARRIVE guidelines.⁹

Anesthesia and Animal Monitoring

Premedication was achieved by intramuscular injection of ketamine (20 mg/kg) and azaperone (2 mg/kg) (Stressnil; Janssen-Cilag, Belgium) administered 10 minutes before surgery. Induction was obtained by intravenous propofol (3 mg/kg) combined with pancuronium (0.2 mg/kg). Anesthesia was maintained with 2% isoflurane. A venous central catheter was placed in the jugular vein, and an invasive arterial line was placed in the contralateral carotid artery for continuous invasive pressure registration. Hypothermia was prevented using warming blankets. An esophageal temperature probe was also inserted.

Model of Mesenteric Ischemia

A laparotomy was performed and a short 3- to 4-cm ischemic segment was created in 6 small bowel loops in each animal (total = 36 loops) by clamping the vascular supply. Duration of clamping ranged from 1 to 6 hours. Based on the position of the clamping and on the discolored “bluish” aspect of the serosa, 5 regions of interest (ROIs) were visually identified as the ischemic zone (ROI 1), margins of resection (ROIs 2a-2b, “boundaries”), and normally vascularized (ROIs 3a-3b) zones. ROIs were marked with a surgical pen (Figure 1A-D). The ischemic area was removed “en bloc,” every hour.

Arterial, Venous, and Capillary Lactates

Every hour, a blood gas analysis was performed on blood samples withdrawn from the carotid artery and the jugular vein, respectively. At the same time points, capillary lactates were measured using the EDGE analyzer, on blood drops obtained by puncturing the pig’s groin (supposed to reflect systemic lactatemia) and by puncturing bowel serosa at the ROIs to measure local intestinal lactatemia (Figure 1E).

Mitochondria Respiratory Rate (pmol of Oxygen/Second/mg of Dry Weight)

After 1, 3, and 5 hours, a surgical biopsy of each intestinal ROI was sampled and immediately placed in a 2-mL water-jacketed oxygraphic cell (Oxygraph-2k OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria). The following activities were measured as previously described^{5,10,11}:

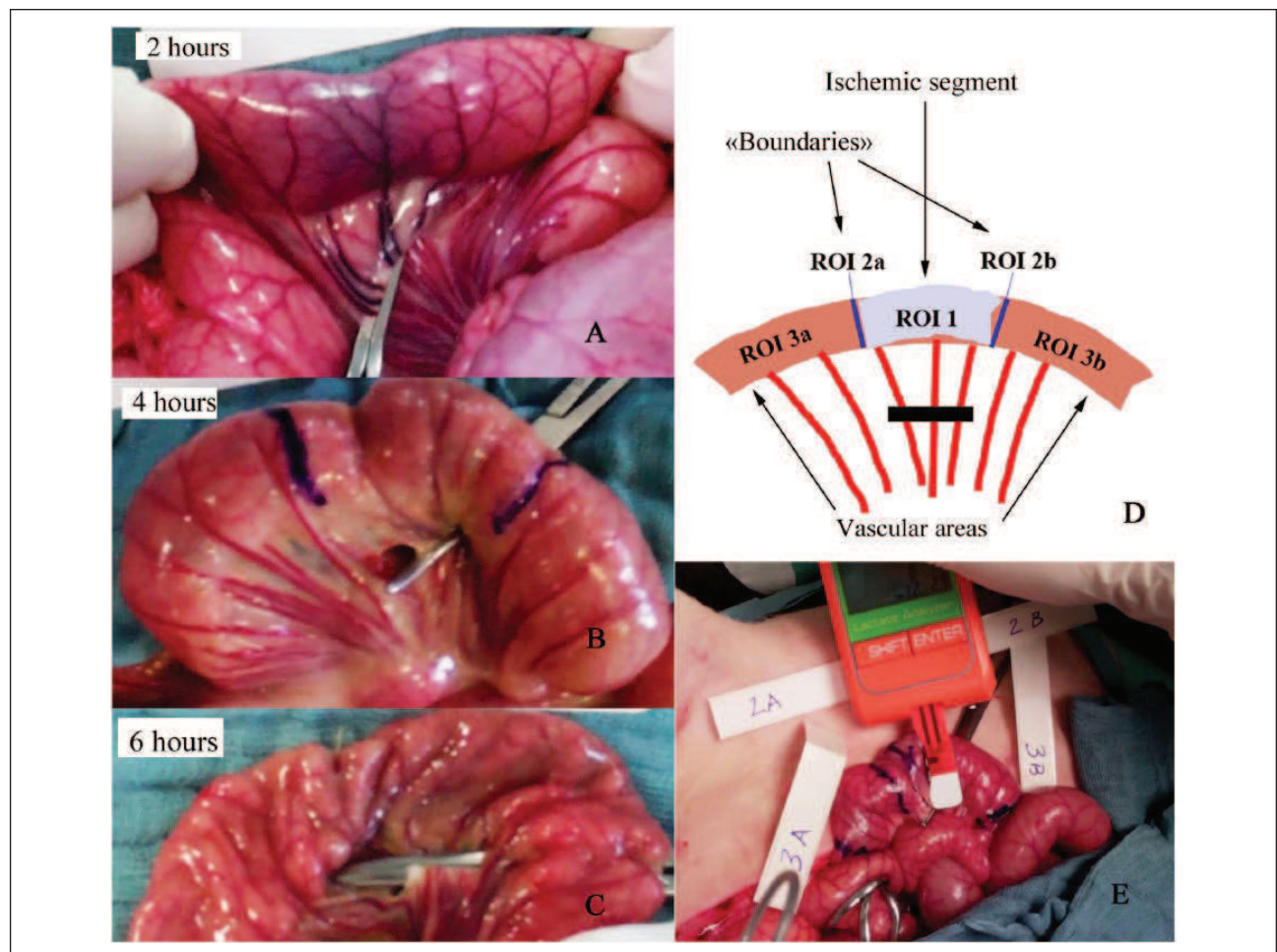


Figure 1. Schema of intestinal regions of interest (ROIs).

Visual aspect of small bowel loops after 2 hours (A), 4 hours (B), and 6 hours (C) of ischemia. Based on the discolored “bluish” aspect of the serosa, 5 ROIs were visually identified as the ischemic zone (ROI 1), margins of resection (ROIs 2a-2b, “boundaries”), and normally vascularized (ROIs 3a-3b) zones (D). Capillary lactates were analyzed using the EDGE lactate analyzer (E).

1. V_0 = basal oxygen consumption
2. V_{ADP} = tissue respiration in the presence of a saturating amount of ADP to evaluate complexes I, II, III, and IV of mitochondrial respiration
3. V_{MAX} = tissue respiration after stimulation of complex II with succinate, to evaluate complexes I, II, III, and IV
4. V_{AMYTAL} = tissue respiration after complex I is blocked with Amytal, to evaluate complexes II, III, and IV
5. V_{TMPD} = tissue respiration after addition of artificial electron donors to cytochrome c oxidase (complex IV)

Metabolomics Profiling of Ischemia Using High-Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy (nmol/mg of Tissue)

Every hour, a piece of the surgical biopsy taken at the different intestinal ROIs was placed in an Eppendorf tube

and immediately snap frozen in liquid nitrogen. Subsequently, biopsies were placed into a disposable 30-mL Kelf insert in the presence of 10 mL of D_2O and stored at $-80^{\circ}C$ until the HRMAS analysis was performed. HRMAS spectra were recorded on a spectrometer (Bruker Advance III 500) equipped with a 4-mm double resonance (1H , ^{13}C) gradient HRMAS probe as previously reported.^{5,12}

Pathology

Every hour, full-thickness bowel biopsies were sampled at the ischemic area and at a control site (vascular areas 3a and 3b alternatively) and placed in 4% buffered formalin for at least 24 hours. Sections (4- μm thick) were cut from paraffin-embedded tissues and stained with hematoxylin and eosin. Six sections per biopsy were analyzed. A standardized semi-quantitative histology score to evaluate ischemia was applied by a blinded pathologist to normal and ischemic

areas. The score was composed as follows: 0 = normal mucosa; 1 = partial epithelial edema and necrosis; 2 = diffuse swelling and necrosis of epithelium; 3 = necrosis with submucosal neutrophil infiltration; 4 = widespread necrosis and massive neutrophil infiltration and hemorrhage.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6. Bias and agreements between systemic capillary and arterial lactates were assessed using the Bland–Altman method. Pearson's parametric correlation coefficients were also calculated. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests were used to calculate *P* values for continuous variables at the different zones of the bowel.

Results

Hemodynamic and body temperature remained stable over the 6-hour experimental procedure time. Subjectively, there was a progressive "recoloring" of the bowel serosa during the progression of ischemia (Figure 1A–C).

Systemic Arterial and Capillary Lactates (mmol/L)

Pearson's *R* correlation between systemic arterial and systemic groin capillary lactates per all time points was 0.9. Rho coefficients between systemic arterial and local capillary lactates were 0.87 (ROI 3a), 0.85 (ROI 3b), 0.75 (ROI 2a), 0.79 (ROI 2b), and 0.53 (ROI 1). The Bland–Altman method showed a good agreement with low bias (difference between the means) for arterial and groin capillary lactates and for arterial and vascularized intestinal areas. High biases were found between arterial and capillary lactates at the ischemic area (Figure 2). Mean capillary lactates (mmol/L) were significantly higher at the ischemic zone (ROI 1) than at the clinically identified margins of resection (ROIs 2ab) at all time points but after 5 hours of ischemia, and higher than at the vascularized zones (ROIs 3ab) at all time points. Mean capillary lactates were statistically significantly higher at the clinically identified margins of resection (ROI 2ab) when compared with ROIs 3ab after 1 hour of ischemia (*P* = .0095). At longer ischemia times, there was no statistically significant difference (Table 1).

Mitochondria Respiratory Rate (pmol of Oxygen/Second/mg of Dry Weight)

Mean maximal tissue respiration rate (V_{MAX}) was statistically significantly reduced after 1 hour of ischemia when compared to the control area (*P* = .03). At a longer duration, the difference was not significant. Mean V_{ADP}

was significantly decreased after 3 hours of ischemia when compared to viable margins (*P* = .01) but improved after 5 hours at the ischemic zone. Mean V_{TMPD} was progressively reduced with increased ischemia time without reaching statistical significance at any time point (Figure 3 and Table 2).

HRMAS NMR Spectroscopy (nmol/mg of Tissue)

A total of 25 metabolites could be quantified in small bowel biopsies (lactate, glucose, acetate, alanine, ascorbate, asparagine, aspartate, free choline, creatine, ethanolamine, glutamine, glutamate, reduced glutathione, glycerophosphocholine, glycine, lysine, myo-inositol, phenylalanine, phosphocholine, sylo-inositol, taurine, tyrosine, valine, isoleucine, total choline; Figure 4). At some point, 7 metabolites (lactate, glucose, aspartate, free choline, creatine, taurine, and tyrosine) expressed a statistically significant different values between the ischemic area (ROI 1) and vascular areas (ROI 3ab). Pearson's *R* correlation between capillary lactates and HRMAS lactates per all time points (*n* = 180 replicates) was 0.69.

Pathology

Mean ischemia score was invariably zero at control areas at all time points. At the ischemic area, tissue damage was mild and the score presented no statistically significant differences over time at the ANOVA analysis. Minimum score was observed after 4 hours of ischemia (0.5 ± 0.8) while a maximum score was observed after 5 hours (1.33 ± 0.8).

Discussion

Oxygen debt leads to a local rapid accumulation of lactate in ischemic tissues and, more slowly, in the systemic circulation. A simple tool to obtain an intraoperative cartography of bowel perfusion is the measurement of local capillary lactates using strip-based technology.

In the present model, systemic lactates (arterial measured on blood sampled at the femoral artery and capillary lactates measured at the pig's groin) showed a high agreement and were both comparable to local capillary lactates at boundaries (2a–2b) and to those at vascularized areas (3a–3b) per all time points. A low agreement was found with ischemic bowel areas, reflecting that systemic lactatemia is unreliable to identify bowel hypoperfusion, at least when a small portion of the bowel is ischemic. Capillary lactates at the ischemic zone did not display a time-dependent increase, and for this reason one could conclude that local lactates are not a good chronological marker of ischemia. However, per any time point,

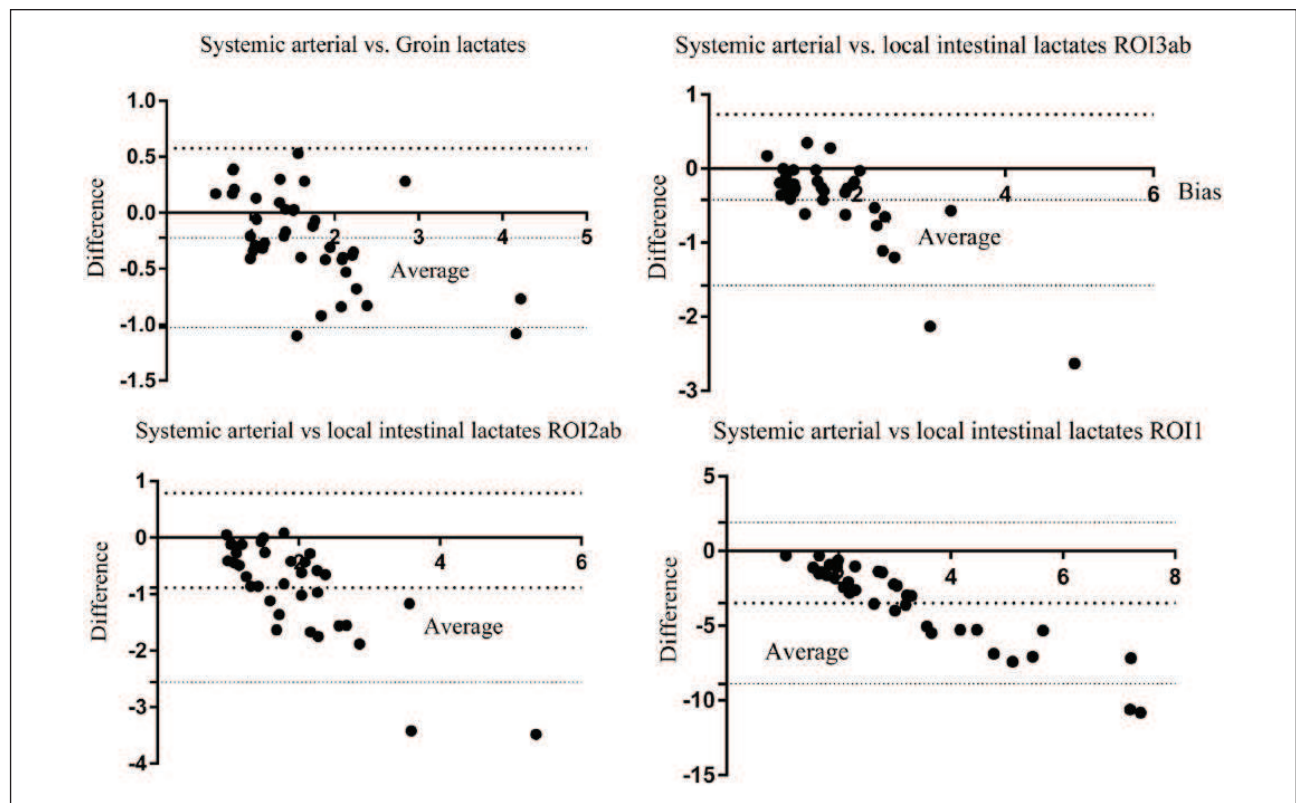


Figure 2. Bland–Altman difference versus average of arterial versus capillary lactates.

The Bland–Altman bias between systemic and capillary lactates was -0.22 (SD 0.4), -0.42 (SD 0.58), -0.88 (SD 0.85), and -3.5 (SD 2.75) for groin, vascular areas (region of interest [ROI] 3ab), boundaries (ROI 2ab), and ischemic area (ROI 1), respectively. Upper and lower 95% limits of agreement with arterial lactates ranged from -1.02 to 0.57 (groin), from -1.58 to 0.73 (ROI 3ab), from -2.55 to 0.79 (ROI 2ab), and from -8.9 to 1.9 (ROI 1).

Table 1. Local Capillary Lactates.

Ischemia Time	ROI 1 (Ischemic Zone)	ROI 2a/2b (Resection Lines)	P Value ^a (1 vs 2a/2b)	ROI 3a/3b (Vascular Zones)	P Value ^a (1 vs 3a/3b)	P Value ^a (2a/2b vs 3a/3b)
1 hour	4.75 ± 2.54	2.38 ± 0.74	.007	1.67 ± 0.45	.0007	.0095
2 hours	7.68 ± 4.16	3.14 ± 1.59	.003	2.34 ± 0.78	.0004	.13
3 hours	4.5 ± 2.11	2.02 ± 0.56	.0012	1.85 ± 0.62	.0008	.48
4 hours	4.08 ± 2.85	2.24 ± 0.82	.04	1.87 ± 1.13	.029	.36
5 hours	4.75 ± 3.21	2.32 ± 2.27	.08	2.09 ± 2.04	.04	.79
6 hours	3.82 ± 2.24	2.10 ± 1.17	.045	1.74 ± 1.02	.014	.43

Abbreviation: ROI, region of interest.

^a $P < .05$ was considered statistically significant.

capillary lactates allowed to build a clear cartography of bowel perfusion per all time points (except after 5 hours of ischemia). More interestingly, after 1 hour ischemia, lactates at the clinically identified resection line were still significantly higher than those at the vascular zone, demonstrating a mismatch between the visual appreciation and the real metabolic status of the bowel.

Lactate clearance is a sign of improved O_2 supply since the lactate pool can be mobilized as substrate for oxidative energy production and glucose synthesis in the presence of

O_2 . We surmised that the apparent improved perfusion at the ischemic area, which occurred particularly between 2 hours and 6 hours of ischemia, was probably due to a problem with the model itself. More specifically, the phenomenon could be explained by the limited length of the ischemic segment and by the presence of an overlapping vascular network on the serosa, which might have favored reperfusion starting from the second hour of ischemia. The second potential explanation could be the occurrence of some ischemic preconditioning. This could have occurred

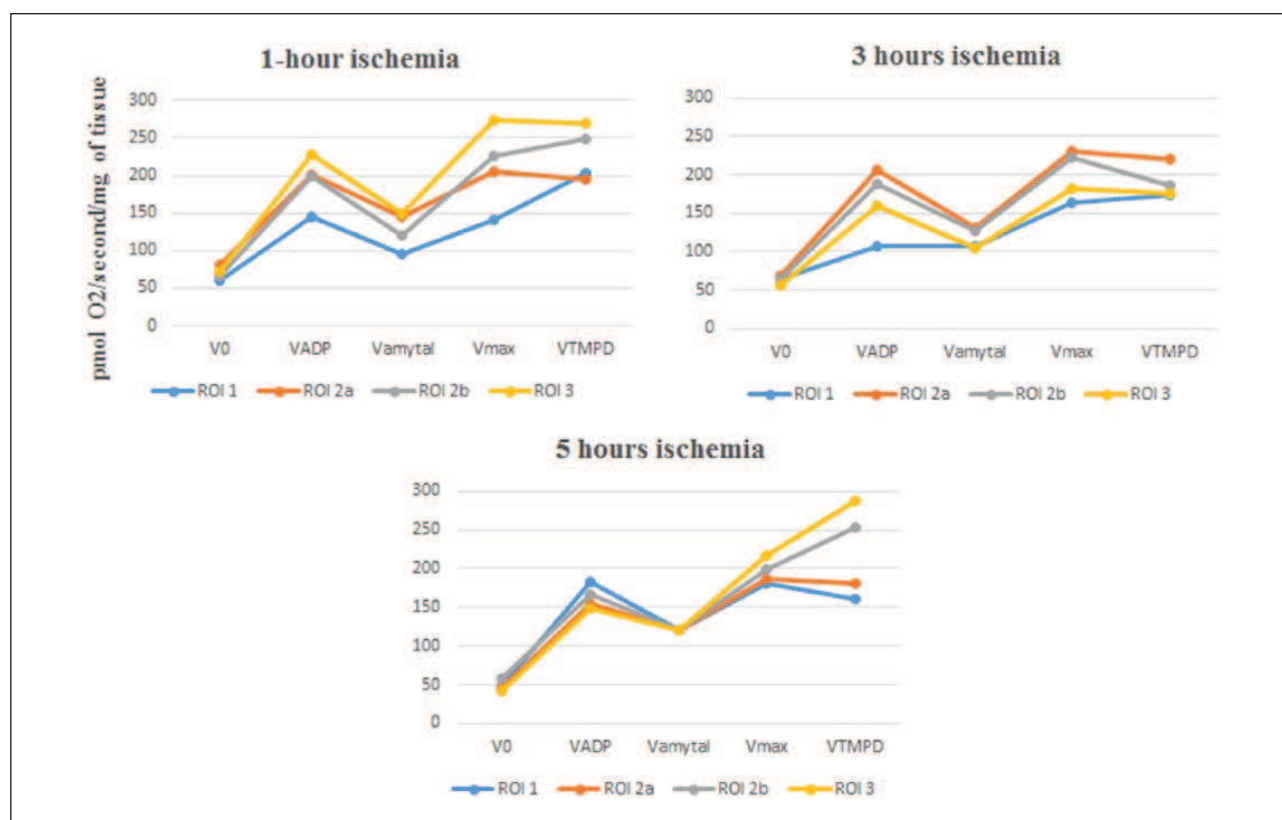


Figure 3. Changes over time in mitochondria respiratory rate.

The figure shows the sequencing of mitochondria respiration rates (V_0 , V_{ADP} , V_{AMYTAL} , V_{MAX} , V_{TMPD}) in the ischemic zone (region of interest [ROI] I), in boundaries (ROI 2a-2b), and in the vascularized control area (ROI 3). Activated complexes: V_0 (I); V_{ADP} (I, III, IV); V_{AMYTAL} (II, III, IV); V_{MAX} (I, II, III, IV); V_{TMPD} (IV). Required substrate: V_0 (glutamate, malate); V_{ADP} (adenosine-diphosphate); V_{AMYTAL} (amytal, inhibitor of complex I); V_{MAX} (succinate, stimulator of complex II); V_{TMPD} (tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride and ascorbate, electron donors for complex IV, cytochrome C oxidase).

Table 2. Mitochondria Respiratory Rate.

Ischemia Time	Respiration Rate	ROI I (Ischemic Zone)	ROI 2a/2b (Boundaries)	P Value ^a (I vs 2a/2b)	ROI 3 (Control)	P Value ^a (I vs Control)
1 hour	V_0	60.38 ± 28.81	73.23 ± 34.51	.44	73.15 ± 39.24	.53
	V_{ADP}	144.51 ± 45.71	200.19 ± 90.46	.17	228.44 ± 89.83	.06
	V_{AMYTAL}	94.79 ± 35.37	132.52 ± 57.72	.16	150.33 ± 51.77	.055
	V_{MAX}	141.57 ± 52.48	215.92 ± 105.48	.12	273.12 ± 116.68	.03
	V_{TMPD}	203.2 ± 60.62	221.33 ± 121.64	.73	270.45 ± 156.37	.34
3 hours	V_0	63.85 ± 44.81	67.2 ± 26.18	.84	55.36 ± 18.96	.67
	V_{ADP}	106.88 ± 54.69	196.99 ± 70.29	.01	159.42 ± 46.35	.14
	V_{AMYTAL}	107.4 ± 54.76	128.75 ± 37.73	.34	104.55 ± 32.44	.91
	V_{MAX}	163.83 ± 108.13	226.36 ± 75	.16	182.42 ± 46.38	.7
	V_{TMPD}	172.74 ± 84.83	202.68 ± 58.85	.39	175.46 ± 34.73	.94
5 hours	V_0	48.8 ± 28.09	52.22 ± 27.34	.8	42.79 ± 23.39	.69
	V_{ADP}	183.15 ± 82.88	160.65 ± 60.14	.51	149.09 ± 34.53	.37
	V_{AMYTAL}	119.62 ± 58.23	120.58 ± 5.17	.97	119.58 ± 50.35	.99
	V_{MAX}	181.11 ± 99.57	192.87 ± 78.67	.78	216.78 ± 128.34	.78
	V_{TMPD}	160.1 ± 61.22	216.85 ± 116.41	.28	287.39 ± 168.17	.11

Abbreviation: ROI, region of interest.

^aP < .05 was considered as statistically significant.

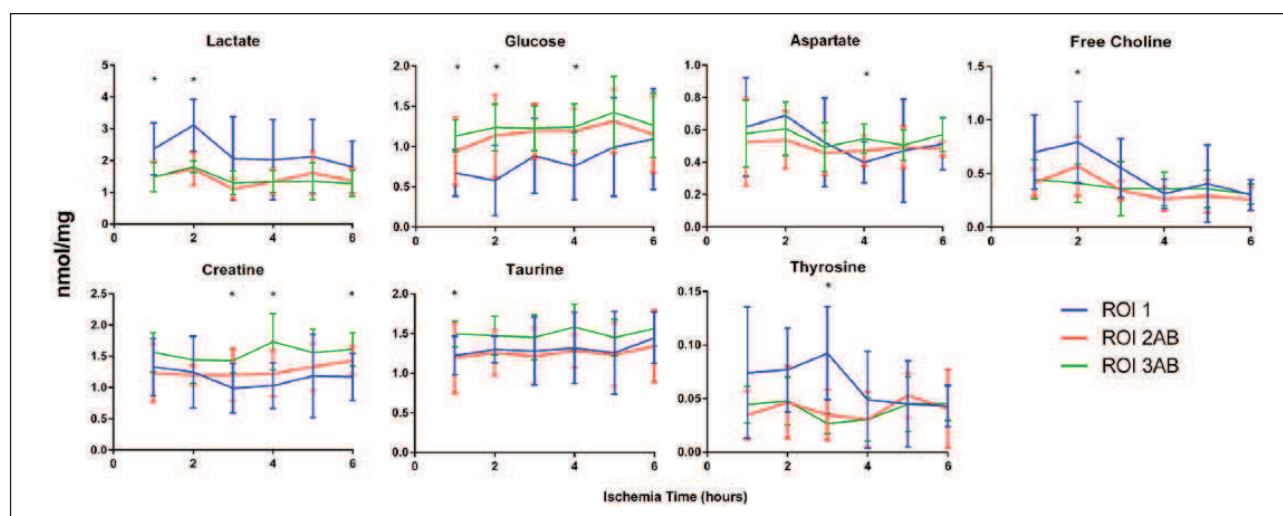


Figure 4. High-resolution magic angle spin nuclear magnetic resonance spectroscopy (nmol/mg of tissue): significant metabolites. Lactate, glucose, aspartate, free choline, creatine, taurine, and tyrosine, expressed at some point statistically significant different values between the ischemic area (region of interest [ROI] 1) and vascular areas (ROI 3ab) at the ANOVA analysis. $P < .05$ was considered statistically significant.

because 6 small bowel loops were simultaneously made ischemic and evaluated subsequently at a 1-hour interval. Although great care was taken to reduce the risk of any reperfusion by removing the ischemic area “en bloc” every hour, some systemic signaling might have induced preconditioning.

In a porcine model of free small bowel flaps, Birke-Sorensen and Andersen used a microdialysis catheter to monitor local lactate and glucose. They could identify an accurate cutoff of the lactate/glucose ratio to discriminate between ischemic and nonischemic segments.¹³

In a 1-hour ischemia experiment, using magnetic resonance spectroscopy to assess the metabolic profile, we also found significantly decreased glucose levels and increased tissue lactate and amino acids, demonstrating a shift toward anaerobic glycolysis.⁵ In the present long-lasting model, the lactate/glucose ratio at tissue level remained constant in the ischemic area over time, with an increase in mean glucose levels after 6 hours of ischemia. This increased glucose production is compatible with the occurrence of reperfusion.

On the other hand, Abrahão et al¹⁴ evaluated ischemia-reperfusion injury in a rat small bowel modulated by ischemic preconditioning. The authors found that lactate values were significantly lower in the group receiving 20 minutes of ischemic preconditioning irrespective of morphological aspect of mucosal damage. Pathology evaluation did not show any significant time-dependent progression of mucosal damage. We also found a very mild mucosal damage even after 6 hours of ischemia.

Additional evidence toward the hypothesis of local reperfusion of the ischemic bowel, which occurred in this model, stems from the oxygraphic assessment of the mitochondria respiratory rate. This technique allows for the dynamic assessment of the functional status of mitochondria by

measuring the activity of various oxidative phosphorylation enzymatic complexes. Oxidative phosphorylation starts with a series of redox reactions (electron transport chain) in which electrons are transferred to the oxygen, which is the most electronegative acceptor. These reactions generate the energy necessary to actively pump H^+ protons in the inter-membrane space and create an electrochemical transmembrane gradient, which is used to produce adenosine triphosphate (ATP). There are 3 enzymatic proton pumps: complexes I, III, and IV. While severe impairment of complex IV (cytochrome C oxidase) leads to irreversible lesions, ischemia-induced dysfunction of complexes I and III can be readily reversible during the reperfusion phase.

Ischemia, by reducing the presence of O_2 as terminal electron acceptor, impairs the activity of those complexes, with progressive reduction of the gradient, energy depletion, and ultimately necrosis.

After 1 hour of ischemia, we found a significant respiratory chain impairment in the ischemic zone as compared to the nonischemic segments as expressed by reduced V_{MAX} (1 hour). However, while a relative decrease of basal respiration (V_0) occurred, V_{MAX} remained constant over time, witnessing a preserved function of complex IV activity as well as the absence of decoupling between oxidation and phosphorylation (OXPHOS), which is an additional marker of occurred reperfusion. Decoupling can be calculated with the acceptor control ratio ($ACR = V_{MAX}/V_0$),¹⁵ which was not modified in this model.

The potential protective effect of multiple ischemic loops could have played the same role on mitochondrial respiration as stressed for lactate/glucose ratio, since ischemic preconditioning has been shown to specifically restore activities of complexes I and II in ischemic skeletal muscle by our group.¹⁶

To provide insights in order to better understand what happened in this short segment ischemia model, we performed a metabolomics analysis of small bowel full-thickness biopsies, using nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMRS). This is a powerful research tool, which provides a quantitative snapshot of the tissue metabolism in a given condition.¹⁷

In a rat model of intestinal ischemia/reperfusion by mesenteric artery or portal vein occlusion, Vincenti et al performed NMRS quantification of intestinal metabolic impairment in both conditions.¹⁸ The authors found that portal vein occlusion leads to more severe metabolic changes in terms of accumulation of lactates, amino acids, and fatty acids, and decrease of glucose, while a more intense oxidative stress is observed in arterial occlusion, with reduction of reduced glutathione.

In our experiment, among the 25 metabolites that could be identified, only 7 (lactate, glucose, aspartate, free choline, creatine, taurine, and tyrosine) expressed some statistically significant differences during the evolution of the hypoperfusion. Critical metabolites involved in oxidative stress, such as reduced glutathione, although lower in the ROI 1 when compared to vascular areas, showed no statistically significant differences.

Aspartate is a nonessential amino acid that participates in gluconeogenesis. In this model, aspartate presented a bimodal evolution in the ischemic area when compared to vascular areas (increased after 2 hours, significantly decreased after 4 hours to increase again after 6 hours). This evolution might correlate with a modification in gluconeogenesis during the alternate anaerobic/aerobic metabolic phases that occurred in the model.

Choline is an essential component of cell membranes.¹⁹ The significant peak of choline levels observed after 2 hours in the ischemic area when compared to controls could well correlate with the most intense period of cellular turnover with a higher release of membrane components in response to the hypoxic injury. This phenomenon was probably slowed down once functional recovery occurred.

Creatine metabolism plays a crucial role in intestinal mucosal homeostasis and adaptive response to stress factors such as hypoxia.²⁰ In our model, creatine constantly expressed lower values at the ischemic area reaching statistically significant difference after 3, 4, and 6 hours of ischemia.

Taurine has an antioxidant activity, which protects mitochondria from excessive superoxide production (radical of oxygen mediated damage) by stimulating the electron transport chain.²¹ Taurine was significantly decreased after 1 hour in the ischemic region when compared to perfused areas, and remained lower over time, but without reaching statistically significant differences from 2 to 6 hours. Conversely, tyrosine, which also expresses antioxidant activities,²² but more specifically against reactive nitrogen intermediates damage,²³ was significantly higher in the ischemic zone and decreased over time.

What must be remembered concerning this highly controlled study is the following: (a) that the measurement of local capillary lactates using strip-based low-cost technology can very accurately build a metabolic cartography of the bowel in almost real time and (b) that there was a concordance between kinetics of capillary lactates, mitochondria respiratory rate, and metabolomics profiling of ischemia, witnessing the robustness of the experimental model. The ability to precisely discriminate well-perfused areas using capillary lactates was preserved during the progression of ischemia per all time points. To obtain capillary blood samples in the laparoscopic setting, we have used in previous experiments a motorized sterile pipette¹⁰ introduced through one of the laparoscopic ports. Capillary blood is aspirated from the bowel and then transferred on the strip of the lactate analyzer. A clinical trial will be promoted soon at the University Hospital of Strasbourg to evaluate the accuracy of indocyanine green fluorescence and capillary lactates in identifying the optimal resection site in laparoscopic colorectal resections. More generally, the indications for the use of capillary lactates in gastrointestinal surgery are all those requiring some resection (eg, sleeve gastrectomy) or resection-anastomosis (eg, colorectal surgery). The barrier for clinical adoption today is mainly the absence of any data on patients (except the trial performed currently at the University of Strasbourg on limb perfusion after vascular surgery). Capillary lactates have been largely used by athletes to self-monitor their pre and post effort levels. In medicine, the largest use of real-time lactate assessment is done in obstetrics (scalp or umbilical cord lactates) to exclude an acidotic status of the baby. The cost is 2 Euros (approximately US\$2.5) per strip, and the time to obtain results is 45 seconds, which means a mild impact on global costs. Should the serial lactate measure be of clinical impact in reducing the rate of anastomotic leakage, this simple technology will certainly gain popularity.

Conclusions

Intraoperative measurement of capillary lactates is accurate to identify optimal resection margins and future anastomotic sites in digestive resections. Oxygraphic evaluation of mitochondria respiratory rate and evolution of the metabolomics profiling over time showed concordant kinetics in this experimental model. The next step is the translation to the clinical setting of this simple technology to evaluate the potential impact to establish the optimal resection site in digestive resections.

Acknowledgments

The authors are grateful to Christopher Burel and Guy Temporal, professionals in medical English editing, employees of IRCAD-IHU, for their valuable help with the proofreading of the manuscript.

Author Contributions

Study concept and design: Michele Diana, Eric Noll, Pierre Diemunsch, Izzie-Jacques Namer, Bernard Geny, Jacques Marescaux

Acquisition of data: Michele Diana, Eric Noll, Anne-Laure Charles, François-Marie Moussallieh, Véronique Lindner

Analysis and interpretation: Michele Diana, Eric Noll, Anne-Laure Charles, François-Marie Moussallieh, Véronique Lindner, Vincent Agnus

Study supervision: Pierre Diemunsch, Izzie-Jacques Namer, Bernard Geny, Jacques Marescaux

Authors' Note

Part of the data of this study were presented at the International Anesthesia Research Society Annual Meeting in San Diego, CA, on May 4-7, 2013.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Urbanavičius L, Pattyn P, de Putte DV, Venskutonis D. How to assess intestinal viability during surgery: a review of techniques. *World J Gastrointest Surg*. 2011;3(5):59-69.
- Seoane L, Papisidero M, De Sanctis P, Posadas-Martínez LM, Soler S, Rodríguez M. Capillary lactic acid validation in an ED. *Am J Emerg Med*. 2013;31:1365-1367.
- Diana M, Dallemagne B, Chung H, et al. Probe-based confocal laser endomicroscopy and fluorescence-based enhanced reality for real-time assessment of intestinal microcirculation in a porcine model of sigmoid ischemia. *Surg Endosc*. 2014;28:3224-3233.
- Diana M, Halvax P, Dallemagne B, et al. Real-time navigation by fluorescence-based enhanced reality for precise estimation of future anastomotic site in digestive surgery. *Surg Endosc*. 2014;28:3108-3118.
- Diana M, Noll E, Diemunsch P, et al. Enhanced-reality video fluorescence: a real-time assessment of intestinal viability. *Ann Surg*. 2014;259:700-707.
- Diana M, Agnus V, Halvax P, et al. Intraoperative fluorescence-based enhanced reality laparoscopic real-time imaging to assess bowel perfusion at the anastomotic site in an experimental model. *Br J Surg*. 2015;102:e169-e176.
- Noll E, Bouitbir J, Collange O, et al. Local but not systemic capillary lactate is a reperfusion biomarker in experimental acute limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012;43:339-340.
- Thaveau F, Zoll J, Bouitbir J, et al. Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J Surg Res*. 2009;155:65-69.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8:e1000412.
- Diana M, Halvax P, Pop R, et al. Gastric supply manipulation to modulate ghrelin production and enhance vascularization to the cardia: proof of the concept in a porcine model. *Surg Innov*. 2015;22:5-14.
- Diana M, Pop R, Beaujeux R, et al. Embolization of arterial gastric supply in obesity (EMBARGO): an endovascular approach in the management of morbid obesity. Proof of the concept in the porcine model. *Obes Surg*. 2015;25:550-558.
- Benahmed MA, Santelmo N, Elbayed K, et al. The assessment of the quality of the graft in an animal model for lung transplantation using the metabolomics 1H high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Magn Reson Med*. 2012;68:1026-1038.
- Birke-Sorensen H, Andersen NT. Metabolic markers obtained by microdialysis can detect secondary intestinal ischemia: an experimental study of ischemia in porcine intestinal segments. *World J Surg*. 2010;34:923-932.
- Abrahão MS, Montero EF, Junqueira VB, Giavarotti L, Juliano Y, Fagundes DJ. Biochemical and morphological evaluation of ischemia-reperfusion injury in rat small bowel modulated by ischemic preconditioning. *Transplant Proc*. 2004;36:860-862.
- Schlagowski AI, Singh F, Charles AL, et al. Mitochondrial uncoupling reduces exercise capacity despite several skeletal muscle metabolic adaptations. *J Appl Physiol (1985)*. 2014;116:364-375.
- Thaveau F, Zoll J, Rouyer O, et al. Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg*. 2007;46:541-547.
- Goldsmith P, Fenton H, Morris-Stiff G, Ahmad N, Fisher J, Prasad KR. Metabonomics: a useful tool for the future surgeon. *J Surg Res*. 2010;160:122-132.
- Vincenti M, Behrends M, Dang K, et al. Induction of intestinal ischemia reperfusion injury by portal vein outflow occlusion in rats. *J Gastroenterol*. 2010;45:1103-1110.
- Guerrerio AL, Mattis L, Conner KG, et al. Oral choline supplementation in children with intestinal failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;53:115-119.
- Glover LE, Bowers BE, Saeedi B, et al. Control of creatine metabolism by HIF is an endogenous mechanism of barrier regulation in colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:19820-19825.
- Jong CJ, Azuma J, Schaffer S. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids*. 2012;42:2223-2232.
- Moosmann B, Behl C. Cytoprotective antioxidant function of tyrosine and tryptophan residues in transmembrane proteins. *Eur J Biochem*. 2000;267:5687-5692.
- Fishman JE, Levy G, Alli V, Sheth S, Lu Q, Deitch EA. Oxidative modification of the intestinal mucus layer is a critical but unrecognized component of trauma hemorrhagic shock-induced gut barrier failure. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;304:G57-G63.



**ÉVALUATION DE LA LACTATÉMIE CAPILLAIRE LOCALE DANS L'ISCHÉMIE
CRITIQUE CHRONIQUE DE MEMBRE INFÉRIEUR, AVANT ET APRÈS
REVASCULARISATION.**

PRI 2011 HUS n°5244
N° IDRCB : 2012-A00239-34

Promoteur : Hôpitaux Universitaires de Strasbourg 1, place de l'Hôpital, 67 091 STRASBOURG cedex Tél. : 03 88 11 52 66 Fax : 03 88 11 52 40 Email : DRCI@chru-strasbourg.fr	P. le Directeur Général, Le Directeur Adjoint Chargé des Projets, de la Recherche Clinique et de l'Innovation C. GEILLER
Investigateur Coordonnateur : Pr Pierre DIEMUNSCH Anesthésie Réanimation Chirurgicale Hôpital de Hautepierre Avenue Molière 67098 Strasbourg cedex Tél : 03 88 12 70 76 Email : pierre.diemunsch@chru-strasbourg.fr	Signature de l'Investigateur Coordonnateur :

Version N° 5.1 intégrant la modification substantielle n°4.1
Date de la version : 11/11/2014

RESUME DE L'ETUDE

Titre de la recherche	Evaluation de la lactatémie capillaire locale dans l'ischémie critique chronique de membre inférieur, avant et après revascularisation.
Titre abrégé	Lactatémie capillaire et ischémie critique chronique de membre
Promoteur	Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
Investigateur coordonnateur	Professeur Pierre DIEMUNSCH
N° HUS	5244
N° ID RCB	2012-A00239-34
Justification de la recherche	Evaluation d'un nouveau critère biologique, la lactatémie capillaire locale pour optimiser la prise en charge des patients porteurs d'une ischémie critique chronique nécessitant une revascularisation rapide. Utilisation potentielle à terme de la lactatémie capillaire comme indicateur diagnostique d'une récurrence ischémique dans un membre revascularisé.
Objectif principal	Etude descriptive de la lactatémie capillaire locale dans un membre inférieur en ischémie critique chronique avant intervention de revascularisation de ce membre par détermination des valeurs de lactatémie capillaire au niveau de ce membre comparées aux valeurs obtenues au membre supérieur vascularisé normalement (rapport lactatémie capillaire orteil/ lactatémie capillaire doigt : LCO/LCD).
Objectifs secondaires si applicable	- Déterminer la cinétique de décroissance de la lactatémie capillaire (rapport LCO/LCD) dans le membre ischémié reperfusé, - Corréler cette cinétique de décroissance de la lactatémie capillaire aux facteurs de risque cardiovasculaires associés (diabète, tabagisme, hypercholestérolémie, âge, sexe), - Corréler cette cinétique de décroissance à un pronostic de récupération du membre, - Corréler les résultats de lactatémie capillaire aux méthodes classiques d'évaluation de la perfusion d'un membre (évaluation clinique, écho-doppler artériel, Index de Pression Systolique: IPS, TcPO2), - Corréler une éventuelle re-augmentation de la lactatémie capillaire à une récurrence ischémique par oblitération précoce après revascularisation.
Critère d'évaluation principal	Rapport Lactatémie Capillaire Orteil / Lactatémie Capillaire Doigt (LCO/LCD) avant intervention de revascularisation d'un membre inférieur en ischémie critique chronique (considéré comme positif si > 2).

Critères d'évaluation secondaires	Les critères d'évaluation secondaire seront : - la diminution du ratio LCO/LCD dans les suites immédiates de la revascularisation (étude de cinétique). - modélisation de la cinétique de décroissance de la lactatémie capillaire dans le membre reperfusé et analyse multivariée (régression logistique) pour déterminer les facteurs prédictifs de variations de la lactatémie capillaire (succès ou échec de la revascularisation, statut hémodynamique, facteurs de risque cardio-vasculaires associés), - détermination d'une courbe ROC et de son aire sous la courbe, pour décrire la sensibilité et la spécificité d'une re-augmentation significative de la lactatémie capillaire pour la détection d'une oblitération précoce du pontage.
Plan expérimental	Etude multicentrique Interventionnelle Prospective Ouvverte
Critères d'éligibilité	Critères d'inclusion : - Ischémie critique chronique d'un membre inférieur nécessitant une procédure de revascularisation rapide. - Consentement écrit éclairé du patient âge supérieur ou égal à 18 ans- Critères de non inclusion : - Présence d'un syndrome inflammatoire ou infectieux (érysipèle par exemple) dans le membre ischémié. - Patient à risque de pied diabétique c'est à dire, selon la définition de l'HAS (prévention pied diabétique, 2007) - o présence d'une neuropathie sensitive, et/ou - o déformation du pied (hallux valgus, orteils en marteau ou en griffe, proéminence de la tête des métatarsiens), et/ou - o antécédent d'ulcération du pied, et/ou - o antécédent de l'un de ces facteurs (c'est à dire antécédent de pied diabétique). - Nécrose des orteils. - Participation à un autre protocole de recherche clinique. - Présence d'une artériopathie oblitérante bilatérale au niveau des membres supérieurs. - Patient en état de choc quelle qu'en soit la cause. - Présence d'une insuffisance hépato-cellulaire. - état général trop altéré (grabataires, démences, ...) - Refus du patient de participer à l'étude - Personnes majeures protégées

Déroulement pratique de l'essai	Mesure de la lactatémie capillaire à l'orteil et au doigt : 1) après l'inclusion et juste avant la procédure de revascularisation 2) à 1h30, 3h, 6h, 12h, 24h et 48h après la revascularisation Le taux de lactate capillaire de référence est celui mesuré au doigt avant la procédure de revascularisation.
Dispositif Médical de Diagnostic <i>ex vivo</i>	The Edge – Lecteur de Lactatémie Appareil de mesure du lactate sanguin », produit par la société : APEX BIOTECHNOLOGY CORP Taiwan Certificat CE 0197
Médicaments/traitements autorisés	Prise en charge habituelle des ischémies critiques chroniques de membre au CHU de Strasbourg. Aucune restriction ni addition du fait du protocole.
Nombre de sujets nécessaires	30
Méthode statistique	Test non paramétrique apparié de Wilcoxon pour le ratio LCO/LCD. Méthode de Pearson pour le calcul des corrélations. Analyses multivariées pour les déterminants des variations de lactatémie capillaire (régression logistique).
Calendrier prévisionnel	Durée de la période d'inclusion : 3 ans Durée de participation de chaque sujet : 48h Durée totale de l'étude : 3 ans et 48h

Résumé

Les objectifs de ce travail expérimental étaient :

1. Évaluer la place de la lactatémie capillaire comme dispositif de monitoring de l'ischémie et de la reperfusion tissulaire.
2. Comparer le suivi local du taux de lactate, au niveau du compartiment ischémié, par rapport au taux systémique du lactate lors des l'ischémie de membre, l'ischémie intestinale ainsi que durant le choc hémorragique.

La mesure capillaire du taux de lactate pourrait permettre:

1. d'affirmer l'existence d'une ischémie tissulaire régionale. Le taux systémique du lactate ne permet ce diagnostic,
2. de confirmer l'efficacité d'une reperfusion au niveau d'un membre préalablement ischémique tandis que la mesure systémique des lactates ne le permet pas. L'affirmation de l'efficacité de la reperfusion et de sa constance, par une mesure aussi simple que la lactatémie capillaire compartimentale représente une avancée majeure en comparaison avec les autres méthodes existantes. La mesure capillaire du taux de lactate systémique dans une situation d'hypoperfusion par choc hémorragique n'est pas associée à augmentation du taux de lactate intra-musculaire.

Mots clés : Ischémie-Reperfusion, lactate

Résumé en anglais

Our objectives for this experimental work were:

1. Assessment of capillary lactate for tissue ischemia and reperfusion monitoring.
2. Compare the local and systemic capillary lactate time course during compartmental ischemia insults like limb ischemia, intestinal ischemia or during hemorrhagic shock.

The capillary measurement of the lactate in IR could be interesting for:

- Assessing a limb or intestinal tissue ischemia. On the opposite, the systemic measurement could not assess this diagnosis.
- Assessing the efficiency of a limb reperfusion. On the opposite, the systemic measurement could not assess this diagnosis.

The systemic capillary lactate measurement during haemorrhagic shock related hypo perfusion could not be associated with an increase in intra muscular lactate.

Key words : Ischemia-Reperfusion, lactate