



**HAL**  
open science

**Chirurgie cardiaque sous circulation extra-corporelle et  
ses biomarqueurs : rôle du Growth / Différentiation  
Factor 15 (GDF 15) : études cliniques**

Abdelkader Kahli

► **To cite this version:**

Abdelkader Kahli. Chirurgie cardiaque sous circulation extra-corporelle et ses biomarqueurs : rôle du Growth / Différentiation Factor 15 (GDF 15) : études cliniques. Médecine humaine et pathologie. Université de Bourgogne, 2016. Français. NNT : 2016DIJOPE02 . tel-01766451

**HAL Id: tel-01766451**

**<https://theses.hal.science/tel-01766451>**

Submitted on 13 Apr 2018

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

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

# UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE-FRANCHE-COMTE

UFR des Sciences de Santé

Année 2016

Thèse n°

## THÈSE

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE-FRANCHE-COMTE**

Spécialité : Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires

Présentée et soutenue publiquement le 19 octobre 2016

Par Abdelkader KAHLI

Né le 27 juin 1983 à Marseille

## **CHIRURGIE CARDIAQUE SOUS CIRCULATION EXTRACORPORELLE ET SES BIOMARQUEURS : ROLE DU GROWTH/DIFFERENTIATION FACTOR-15 (GDF-15) *Etudes Cliniques***

Thèse dirigée par le Professeur Catherine VERGELY

Et co-encadrée par le Professeur Claude GIRARD

---

### Composition du jury

**M. le Professeur Denis ANGOULVANT**, Université de Tours  
**M. le Professeur Laurent ARGAUD**, Inserm U1060, Lyon  
**M. le Professeur Lucas LIAUDET**, Université de Lausanne  
**Mme le Professeur Catherine VERGELY**, Université de Bourgogne  
**M. le Professeur Claude GIRARD**, Université de Bourgogne  
**M. le Professeur émérite Luc ROCHETTE**, Université de Bourgogne

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur  
Co-encadrant  
Examinateur



# UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE-FRANCHE-COMTE

UFR des Sciences de Santé

Année 2016

Thèse n°

## THÈSE

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE-FRANCHE-COMTE**

Spécialité : Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires

Présentée et soutenue publiquement le 19 octobre 2016

Par Abdelkader KAHLI

Né le 27 juin 1983 à Marseille

### **CHIRURGIE CARDIAQUE SOUS CIRCULATION EXTRACORPORELLE ET SES BIOMARQUEURS : ROLE DU GROWTH/DIFFERENTIATION FACTOR-15 (GDF-15) *Etudes Cliniques***

Thèse dirigée par le Professeur Catherine VERGELY

Et co-encadrée par le Professeur Claude GIRARD

---

#### Composition du jury

**M. le Professeur Denis ANGOULVANT**, Université de Tours  
**M. le Professeur Laurent ARGAUD**, Inserm U1060, Lyon  
**M. le Professeur Lucas LIAUDET**, Université de Lausanne  
**Mme le Professeur Catherine VERGELY**, Université de Bourgogne  
**M. le Professeur Claude GIRARD**, Université de Bourgogne  
**M. le Professeur émérite Luc ROCHETTE**, Université de Bourgogne

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur  
Co-encadrant  
Examineur

# Remerciements

**A notre maître et co-directeur de thèse,**

**Madame le Professeur Catherine VERGELY-VANDRIESSE,**

Voici déjà cinq années que tu as accueilli au sein de ton équipe un marseillais exilé à la recherche d'épanouissement scientifique. Je te suis extrêmement reconnaissant pour ton hospitalité ainsi que pour ta gentillesse qui ont été sources de collaborations fructueuses. J'ai réalisé grâce à toi que le travail ne peut être correctement accompli que lorsque les conditions d'écoute mutuelle et d'ambiance apaisée sont réunies. Je retiendrai également le souvenir d'une directrice très consciencieuse et dotée d'un sens aigu quasi-chirurgicale dans l'analyse de ce manuscrit. Dans l'espoir de collaborer à l'avenir sur des projets en commun, je te remercie de tout mon cœur pour tous ces moments partagés ensemble.

**A notre maître et co-directeur de thèse,**

**Monsieur le Professeur Claude GIRARD,**

Je souhaite tout d'abord vous remercier d'avoir accepté de m'intégrer au sein de votre équipe mais plus encore d'avoir été un second père. Vous avez su me rendre à l'aise dans cet univers à la fois éprouvant et fascinant que représente l'anesthésie-réanimation chirurgicale. Je n'oublierai jamais votre soutien inconditionnel ainsi que votre disponibilité. Votre ouverture d'esprit ainsi que vos qualités humaines au service d'une meilleure prise en charge des patients révèlent en vous une foi inébranlable dans le progrès médical. C'est ainsi que vous m'avez convaincu jusqu'à me convertir à la persévérance dans la recherche de la vérité scientifique. Pour cela, je vous serai à jamais reconnaissant tel un disciple envers son guide.

**A notre examinateur de thèse,**

**Monsieur le Professeur Luc ROCHETTE,**

Au cours de ces dernières années, j'ai eu le privilège de vous côtoyer et j'ai découvert un véritable maître scientifique et spirituel. Vous représentez ce que tout étudiant recherche, un mentor érudit animé par la passion de la transmission du savoir, sans oublier bien-sûr votre célèbre humour. Vos talents artistiques ainsi que votre sens de la mise en scène resteront une véritable source d'inspiration pour l'apprenti que je suis. Je vous témoigne toute ma gratitude et ma reconnaissance pour votre participation à ce travail.

**A notre juge et rapporteur, Monsieur le Professeur Laurent ARGAUD**

Je vous suis extrêmement reconnaissant pour votre disponibilité à participer à l'évaluation de ce manuscrit d'autant plus que vous m'avez initié au concept de conditionnement cardiaque. Soyez assuré de ma gratitude et mon profond respect.

**A notre juge et rapporteur, Monsieur le Professeur Lucas LIAUDET**

Je suis très honoré que vous ayez accepté de consacrer du temps à la lecture de ce travail. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

**A notre juge, Monsieur le Professeur Denis ANGOULVANT**

Je vous suis très reconnaissant de me faire l'honneur d'être juge de ce travail scientifique. Soyez assuré de mon profond respect et de toute mon estime.

Un immense remerciement à toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail par leurs conseils, leur expérience, leurs connaissances et surtout leur soutien.

# Résumé

Les cardiopathies ischémiques sont des pathologies fréquentes et graves, responsables d'une part importante des décès d'origine cardiovasculaire. Une des alternatives pour la prise en charge des patients atteints de cardiopathie ischémique est la chirurgie cardiaque. La circulation extracorporelle compte parmi les progrès techniques majeurs associés à la chirurgie cardiaque, mais elle constitue aussi l'une des causes de complications principales car responsable d'une réponse inflammatoire généralisée. Cette réponse inflammatoire qui résulte de la conjugaison des effets du stress oxydant et des cytokines libérés, contribuerait à la dysfonction multi-organe aboutissant aux complications myocardiques et rénales survenant au cours des périodes per- et post-opératoires.

La première partie de notre travail avait pour objectif d'explorer l'évolution des taux circulants du GDF-15, cytokine associée au stress oxydant et à l'inflammation, dans ce contexte de chirurgie cardiaque. Notre étude prospective a démontré pour la première fois que cette procédure est accompagnée de l'augmentation du GDF-15 dont les taux plasmatiques sont associés aux lésions post-opératoires cardiaques et rénales.

L'évaluation du risque opératoire repose actuellement sur un ensemble de scores dont le calcul est basé essentiellement sur des caractéristiques cliniques. Bien qu'étant largement utilisés, ces scores présentent toutefois un certain nombre de limitations. A l'inverse, en dehors de tout contexte chirurgical, la stratification du risque chez les patients « médicaux » atteints de pathologies cardiovasculaires, est habituellement définie en associant des caractéristiques cliniques à l'évaluation des taux circulants de biomarqueurs (troponines cardiaques, BNP, Nt-proBNP). L'objectif de cette seconde partie a donc été de mettre en évidence le pouvoir prédictif du GDF-15 en tant que biomarqueur circulant dans la survenue de complications rénales au cours de la chirurgie cardiaque sous CEC. Nous avons mis en évidence que les patients présentant des taux préopératoires élevés de GDF-15 sont à risque de développer une insuffisance rénale aiguë postopératoire.

## **Mots clés :**

Biomarqueur, chirurgie cardiaque, circulation extracorporelle, GDF-15, inflammation, insuffisance rénale aiguë, stratification du risque

# Abstract

Ischemic cardiac diseases are the most frequent and deleterious pathologies leading to important cardiovascular-related mortality worldwide. One of the alternative therapies consists to treat these patients using cardiac surgery. Cardiopulmonary bypass was developed to greatly improve this surgical procedure. However, some adverse effects can occur during cardiac surgery associated with cardiopulmonary bypass due to the inflammatory response. This phenomenon is the result of various mechanisms including oxidative stress and inflammatory cytokines which lead to multi-organ failure and then to myocardial and renal injuries occurring during the peri- and post-operative periods.

The first part of this work was designed to evaluate in the context of cardiac surgery the kinetics of plasma GDF-15 levels, an oxidative stress and inflammation related cytokine. Our prospective study demonstrated for the first time the kinetic increase in plasma GDF-15 levels which were associated to postoperative cardiac and renal injuries.

Currently, operative risk evaluation is based on score calculation including clinical criteria. These risk scores present some limitations. Concerning other cardiac patients out of surgical fields, the risk assessment is defined using clinical parameters and biomarkers evaluation (cardiac troponin, BNP, Nt-proBNP). Thus, we aimed to determine whether pre-operative GDF-15 as plasma biomarker could help to identify patients at high risk of renal injuries. We found that patients with the highest pre-operative plasma GDF-15 levels are at risk for post-operative acute kidney injury.

**Keywords:**

Biomarker, cardiac surgery, cardiopulmonary bypass, GDF-15, inflammation, acute kidney injury, risk stratification

# Table des matières

<b><i>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</i></b> .....	<b>8</b>
<b><i>I. La circulation extracorporelle en chirurgie cardiaque</i></b> .....	<b>9</b>
<b>A. Rappel historique</b> .....	<b>9</b>
<b>B. Schéma général de la CEC</b> .....	<b>10</b>
<b><i>II. Physiopathologie de la chirurgie cardiaque associée à la CEC</i></b> .....	<b>13</b>
<b>A. Préambule</b> .....	<b>13</b>
<b>B. La réponse inflammatoire</b> .....	<b>14</b>
1. La phase précoce : activation du système contact .....	16
2. La phase tardive .....	27
<b>C. Les lésions d'I/R</b> .....	<b>28</b>
<b>D. L'endotoxine</b> .....	<b>29</b>
<b>E. Les stratégies visant à atténuer la réponse inflammatoire au cours de la CEC</b> .....	<b>30</b>
1. Les stratégies pharmacologiques .....	30
2. Les stratégies techniques .....	36
<b>F. Conclusion</b> .....	<b>37</b>
<b><i>III. Les complications post-opératoires cardiaques et rénales</i></b> .....	<b>39</b>
<b>A. Généralités</b> .....	<b>39</b>
<b>B. Les complications myocardiques</b> .....	<b>39</b>
1. Epidémiologie .....	39
2. Physiopathologie .....	39
3. Les stratégies thérapeutiques de cardioprotection au cours de la CEC .....	40
<b>C. Les complications rénales</b> .....	<b>48</b>
1. Epidémiologie .....	48
2. Physiopathologie de l'IRA-ACC .....	49
3. Stratégies de néphroprotection au cours de la chirurgie cardiaque associée à la CEC .....	51
<b>D. Conclusion</b> .....	<b>55</b>
<b><i>IV. Modèles de prédiction et biomarqueurs</i></b> .....	<b>57</b>
<b>A. Score et stratification du risque</b> .....	<b>57</b>
1. Définition .....	57
2. Méthodes d'évaluation .....	57
<b>B. Modèles de prédiction actuels</b> .....	<b>58</b>
<b>C. Place des biomarqueurs dans la stratification du risque</b> .....	<b>59</b>
1. Préambule .....	59
2. Méthodologie .....	60
3. Evaluation .....	61
4. Pré-analyse et analyse .....	61
5. Exemple d'identification de l'IRA associée à la chirurgie cardiaque .....	63



<b>V.</b>	<b><i>Le Growth/Differentiation Factor-15</i></b>	<b>67</b>
<b>A.</b>	<b>Structure, processus et sécrétion</b>	<b>68</b>
<b>B.</b>	<b>Schéma d'expression et mécanismes de régulation</b>	<b>71</b>
<b>C.</b>	<b>Analogies entre les mécanismes du signal de transduction du GDF-15 et des autres membres de la superfamille du TGF-<math>\beta</math></b>	<b>72</b>
<b>D.</b>	<b>Fonctions physiologiques et pathologiques du GDF-15 dans le domaine cardiovasculaire..</b>	<b>76</b>
1.	GDF-15 et athérosclérose	79
2.	GDF-15 dans les maladies coronariennes et l'infarctus du myocarde	80
3.	GDF-15 dans l'hypertrophie cardiaque	81
<b>E.</b>	<b>GDF-15 et néphropathies</b>	<b>84</b>
	<b><i>HYPOTHESE GENERALE ET OBJECTIFS</i></b>	<b>85</b>
	<b><i>MATERIEL ET METHODES</i></b>	<b>87</b>
<b>I.</b>	<b><i>Cohortes d'étude</i></b>	<b>88</b>
<b>A.</b>	<b>Etude ARTICLE</b>	<b>89</b>
1.	Justification scientifique	89
2.	Objectifs et critères d'évaluation	91
3.	Population	92
4.	Protocole de l'étude	93
5.	Evènements cliniques	94
<b>B.</b>	<b>Etude PAC/FA</b>	<b>95</b>
1.	Population	95
2.	Evènements cliniques	95
<b>II.</b>	<b><i>Dosages plasmatiques</i></b>	<b>96</b>
<b>A.</b>	<b>GDF-15</b>	<b>96</b>
<b>B.</b>	<b>Follistatin-like 1</b>	<b>97</b>
<b>C.</b>	<b>Evaluation du stress oxydant et de l'inflammation</b>	<b>98</b>
1.	Le pouvoir antioxydant du plasma	98
2.	Les hydroperoxydes plasmatiques	99
3.	Les myeloperoxydases (MPO)	99
<b>D.</b>	<b>Evaluation de dysfonction d'organes et caractéristiques des patients</b>	<b>99</b>
<b>E.</b>	<b>Outils statistiques</b>	<b>100</b>
1.	Etude ARTICLE (1er article)	100
2.	Etudes PAC/FA et ARTICLE (2nd article)	100
	<b><i>ETUDES CLINIQUES</i></b>	<b>102</b>
<b>I.</b>	<b><i>Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) Levels Are Associated with Cardiac and Renal Injury in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting with Cardiopulmonary Bypass (Protocole ARTICLE)</i></b>	<b>103</b>
<b>II.</b>	<b><i>Pre-operative growth differentiation factor 15 as a novel biomarker of acute kidney injury after cardiac bypass surgery (Protocoles ARTICLE et PAC/FA)</i></b>	<b>113</b>

<i><b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES GENERALES</b></i>	<b>114</b>
<b>A. BIOMAQUEURS ET STRATIFICATION DU RISQUE</b>	<b>115</b>
<b>B. CAS PARTICULIER DU GDF-15</b> .....	<b>116</b>
<b>C. DISCUSSION</b> .....	<b>117</b>
<b>D. PERSPECTIVES</b> .....	<b>121</b>
<b>E. CONCLUSIONS</b> .....	<b>126</b>
<i><b>BIBLIOGRAPHIE</b></i>	<b>127</b>
<i><b>ANNEXES</b></i>	<b>152</b>

# Liste des tableaux

Tableau I. Evaluation des performances analytiques pour le dosage d'un biomarqueur.....	62
Table II. Comparaison des moyennes des taux plasmatiques de GDF-15 corrigés et non-corrigés par la protidémie en réanimation cardiovasculaire .....	104
Table III. Association entre le ratio ARG/ADMA à l'induction et les variables biologiques et cliniques basales.....	109

# Liste des figures

Figure 1. Principe général de la CEC.....	11
Figure 2. Représentation schématique d'un circuit de CEC complet.....	12
Figure 3. Acteurs de la réponse inflammatoire au cours de la CEC .....	15
Figure 4. Voies de la coagulation mises en jeu lors de la chirurgie cardiaque associée à la CEC.....	19
Figure 5. Les voies de la fibrinolyse.....	21
Figure 6. Schéma récapitulatif des différentes phases et acteurs intervenant au cours de la réponse inflammatoire.....	27
Figure 7. Représentation schématique des facteurs intervenant dans la dysfonction et/ou les lésions lors des phénomènes d'I/R.....	29
Figure 8. Résumé des différentes stratégies visant à atténuer la réponse inflammatoire au cours de la CEC.....	30
Figure 9. Mécanismes physiopathologiques de l'IRA au cours de la CEC .....	51
Figure 10. Implications de GDF-15 dans diverses situations pathologiques.....	68
Figure 11. Mécanismes moléculaires associés à la synthèse, à la sécrétion, au stockage et aux actions autocrines et paracrines du GDF-15 [355] .....	70
Figure 12. Structure du gène et de la protéine GDF-15 [356].....	70
Figure 13. Situations et signaux stimulateurs de l'expression de GDF-15 .....	72
Figure 14. Mécanismes de transduction du signal potentiels impliquant la régulation des réponses cellulaires induites par le GDF-15.....	75
Figure 15. Voies de signalisation de cardioprotection par GDF-15.....	77
Figure 16. Concentrations du GDF-15 chez des volontaires sains selon le type d'échantillonnage (plasma EDTA, plasma héparine, sérum) .....	93
Figure 17. Protocole de prélèvements .....	94
Figure 18. Effets du Trolox® et des échantillons plasmatiques sur la décroissance de fluorescence de l'APC.....	98
Figure 19. Cinétiques des concentrations plasmatiques de GDF-15 non-corrigées (A) et corrigées par la protidémie (B) au cours des périodes pré-, per- et postopératoires (* p<0,05). .....	104
Figure 20. Structures moléculaires et métabolisme des dérivés diméthylés de la L-arginine .....	107
Figure 21. Cinétiques des concentrations plasmatiques de la L-Arginine, d'ADMA, de SDMA et du ratio Arginine/ADMA au cours des périodes pré-, per- et postopératoires. ....	111

# Abréviations

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride
ADMA	N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -diméthyl L-arginine asymétrique
AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
AKIN	Acute Kidney Injury Network
ALKs	Activin-Like receptors
AMH	Hormone anti-Müllerian
AMHR	Anti-Müllerian hormone receptor
APC	Allophycocyanine
ARA-2	Inhibiteur des récepteurs à l'angiotensine 2
ASC	Aire sous la courbe
ATIII	Anti-thrombine III
AVC	Accident vasculaire cérébrale
BMPR	Bone Morphogenetic Proteins Receptor
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins
BNP	Brain Natriuretic Peptide
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
CEC	Circulation extracorporelle
CI	Confidence interval
CK	Creatine kinase
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
DDAH	Diméthyl-arginine diméthyl-aminohydrolase
DFG	Débit de filtration glomérulaire
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FA	Fibrillation auriculaire
FEVG	Fraction d'éjection du ventricule gauche
FORT	Free Oxygen Radical Testing
FvW	Facteur von Willebrand
GDF-15	Growth/Differentiation Factor-15
HL	Hosmer-Lemeshow
HTA	Hypertension artérielle
HVG	Hypertrophie du ventricule gauche
I/R	Ischémie-reperfusion
IC	Insuffisance cardiaque
ICC	Insuffisance cardiaque congestive
IDM	Infarctus du myocarde
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
IRA	Insuffisance rénale aigue
IRA-ACC	Insuffisance rénale aigue associée à la chirurgie cardiaque
IRA-PCI	IRA post-PCI
IRA-TAVI	IRA post-TAVI
IRC	Insuffisance rénale chronique
KDIGO	Kidney Disease : Improving Global Outcomes
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor

MEC	Matrice extracellulaire
MIC-1	Macrophage Inhibitory Cytokine-1
MnSOD	Manganese SuperOxide Dismutase
MPO	Myeloperoxydase
mPTP	Pore de transition membranaire mitochondrial
NAC	N-Acétylcystéine
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NO	Monoxyde d'azote
NYHA	New York Heart Association
OR	Odd-ratio
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PAC	Pontage aorto-coronarien
PAS	Plasma Antioxydant Status
PCI	Percutaneous coronary intervention
PDE	Phosphodiesterases
PRMT	Protéine arginine méthyl-transférase
RIFLE	Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage Renal Disease
RLO	Radicaux libres de l'oxygène
ROC	Receiver operating characteristics
RV	Remplacement valvulaire
SCA	Syndrome coronarien aigu
SDMA	N <sup>G</sup> ,N' <sup>G</sup> -diméthyl L-arginine symétrique
SIRS	Syndrome de réponse inflammatoire systémique
Smad	Small Mothers Against Decapentaplegic
SRI	Index Rénal Simplifié
ST-	Sans surélévation du segment ST
ST+	surélévation du segment ST
TAVI	Transcatheter Aortic Valve Implantation
TGF-β	Transforming Growth factor-β
TIH	Thrombocytopénie induite par l'héparine
TNFα	Tumor Necrosis Factor-α
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène

# ***SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE***

## I. La circulation extracorporelle en chirurgie cardiaque

### A. Rappel historique

L'idée d'une perfusion artificielle fut imaginée dès 1812 par le Physiologiste français Jean-Jacques Le Gallois qui réalisa la perfusion de sang dans les carotides de lapins décapités dans l'objectif de prouver qu'une perfusion extérieure maintenait la fonction cérébrale. Par la suite d'autres physiologistes tels que Brown-Sequard et Starling ont tenté de mettre au point des versions artificielles du cœur et des poumons dès le milieu du 19<sup>ème</sup> siècle. Cependant, la genèse des machines considérées aujourd'hui comme les premiers circuits de CEC a débuté en octobre 1930 lorsque John Gibbon [1] réfléchissait à la manière de sauver un patient décédant suite à la formation d'un thrombus dans une artère pulmonaire. Ce n'est qu'en 1937 qu'il finira par créer la première machine de CEC complète permettant la survie d'animaux en Laboratoire. Cette prouesse fut possible notamment grâce à la découverte de l'héparine en 1916, puis celle de la protamine vingt ans plus tard, permettant ainsi de moduler les phénomènes de coagulation au cours de l'intervention [2]. Deux décennies plus tard, le 6 Mai 1953, Gibbon réalisa la première intervention chirurgicale intracardiaque humaine avec succès (réparation d'une communication inter-auriculaire chez une jeune femme) en utilisant une pompe oxygénatrice mécanique extracorporelle [3]. Suite aux succès réalisés grâce à la CEC, de nouveaux types d'interventions virent le jour : la chirurgie valvulaire avec l'apparition des premières prothèses en 1960 (Dwight et Albert Starr) et les interventions sur les artères coronaires par pontages veineux (Favaloro) ou artériels (à l'aide des artères mammaires internes) (Green) mises au point en 1967.

Depuis 1953, cette procédure expérimentale, considérée autrefois comme une entreprise périlleuse, s'est transformée en acte médical relativement courant, réalisé sur plus d'un demi-million de patients à travers le monde chaque année [4]. Cette évolution a été possible grâce à un certain nombre de facteurs. Les compétences et savoir-faire des chirurgiens, des anesthésistes et des perfusionnistes se sont améliorés rapidement, la recherche pharmacologique a abouti à une augmentation de l'arsenal thérapeutique disponible pour les cliniciens et un nombre important de technologies-clés de biomatériaux a été développé. Ces derniers ont permis la création de circuits de plus en plus petits, composés essentiellement d'éléments à usage unique, de surfaces biocompatibles ainsi que de membranes microporeuses perméables aux échanges gazeux. Ces développements ont



abouti à une réduction des altérations des éléments figurés du sang ainsi qu'à une diminution de la formation de thrombi (thrombogénicité) et de particules emboliques [5, 6].

## B. Schéma général de la CEC

La CEC remplace temporairement les fonctions cardiaques et pulmonaires au cours de la chirurgie cardiaque, permettant ainsi au cœur d'être ouvert et opéré. Pour atteindre ces objectifs, 3 postulats clés doivent être validés : la circulation sanguine à travers le système vasculaire du patient doit être maintenue par une pompe mécanique pendant que le cœur est arrêté, le sang veineux doit être artificiellement artérialisé par un dispositif d'échange gazeux extracorporel et la température du sang doit pouvoir être adaptée au type d'intervention. Par rapport aux machines historiques, les circuits actuels contiennent toujours les mêmes composants élémentaires, mais plus sûrs et plus sophistiqués. Le montage général du circuit de CEC est bien standardisé. La partie principale est constituée de 5 éléments qui se succèdent comme suit (Figure 1) [7] :

- ❖ Une ou deux canules introduites dans l'oreillette droite par le chirurgien, afin de récupérer le sang veineux arrivant par les veines caves supérieure et inférieure. Par gravité et par l'intermédiaire de tubulures, ce sang, pauvre en oxygène et riche en gaz carbonique, est conduit vers le réservoir veineux ;
- ❖ Une pompe principale, placée entre le réservoir veineux et l'oxygénateur ;
- ❖ Un oxygénateur auquel sont associés un évaporateur d'halogéné (isoflurane ou sévoflurane) et un débitmètre air-oxygène ;
- ❖ Un échangeur thermique ;
- ❖ Un circuit artériel conduisant le sang oxygéné dans l'aorte en aval du clamp aortique.

Une fois la CEC installée et l'aorte ascendante clampée, une solution dite de cardioplégie est injectée dans la circulation coronaire, afin d'arrêter les contractions cardiaques.

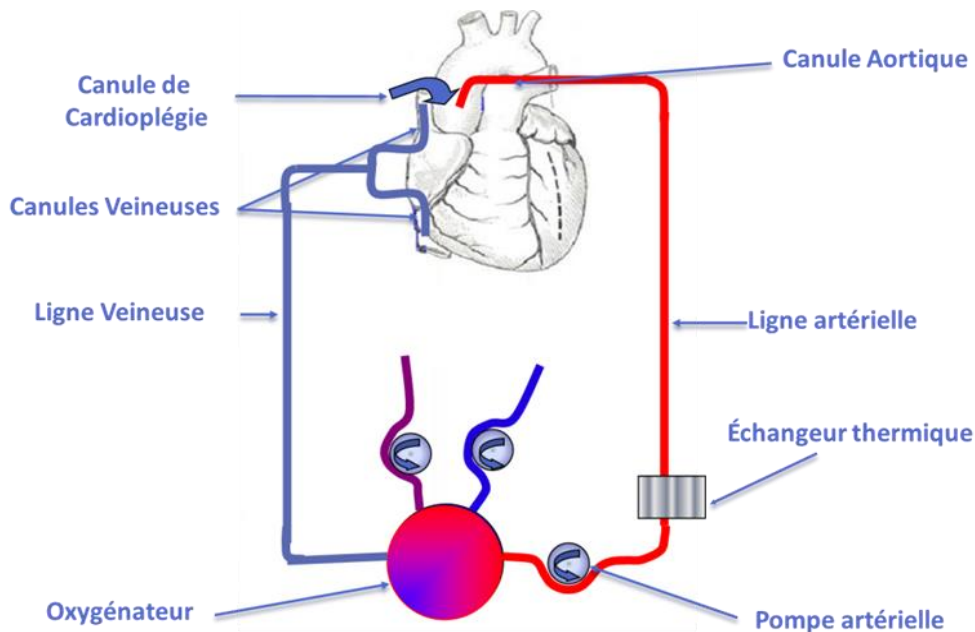


Figure 1. Principe général de la CEC

Plusieurs éléments complètent le circuit (Figure 2) :

- ❖ Un filtre artériel dont le rôle est à la fois de capter les particules dont la taille est supérieure à 40  $\mu\text{m}$  et de piéger les bulles d'air ;
- ❖ Deux circuits d'aspiration : celui de droite pour le sang aspiré dans le champ opératoire et celui de gauche pour le sang aspiré dans la circulation gauche ; les 2 circuits pouvant être complétés par une aspiration de cardiectomie ;
- ❖ Un système de contrôle de pression dans le circuit artériel qui asservit le débit de la pompe au-delà d'une limite fixée par le perfusionniste ;
- ❖ Un système de contrôle en ligne de la saturation en oxygène du sang veineux et du sang artériel ;
- ❖ Un système de contrôle du niveau du liquide dans le réservoir veineux qui asservit le débit de la pompe en deçà d'une limite fixée par le perfusionniste ;
- ❖ Un système de contrôle de la présence de bulles dans le circuit ;
- ❖ Un système de mesure de la température veineuse et artérielle.

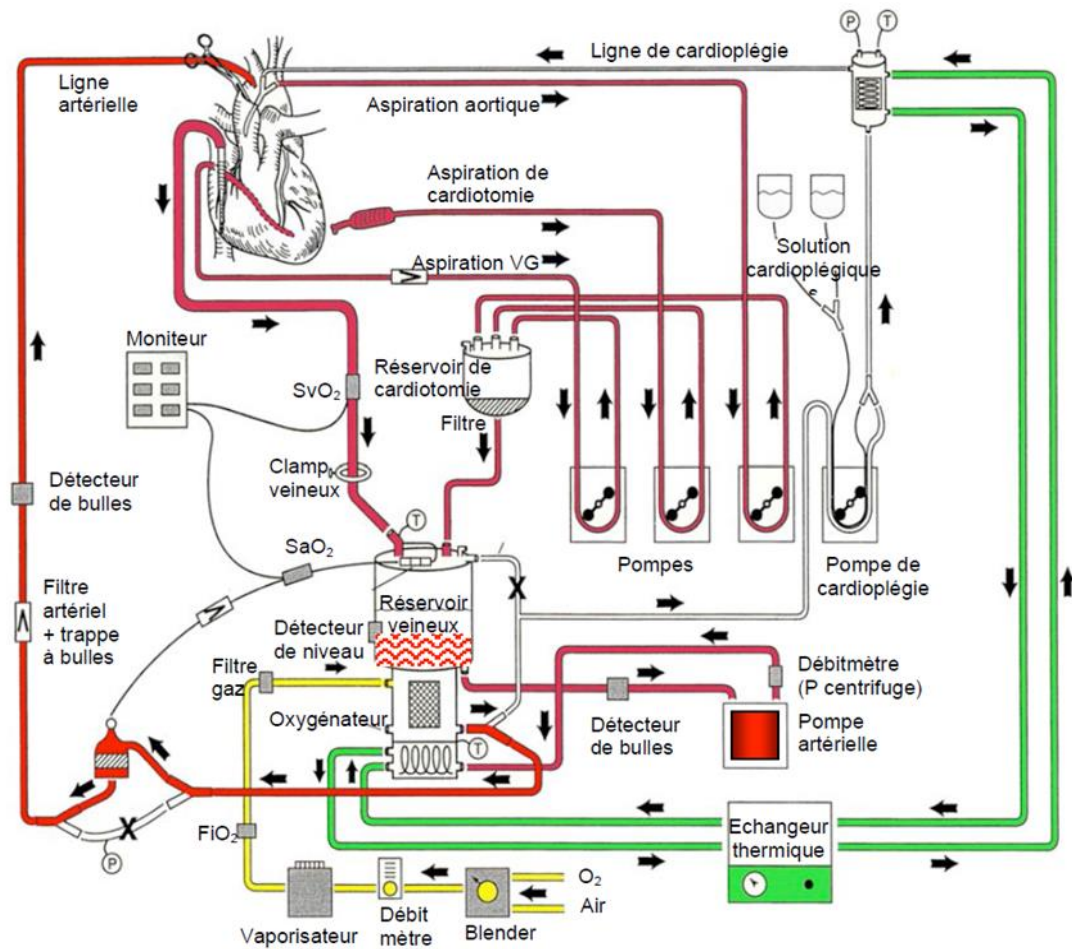


Figure 2. Représentation schématique d'un circuit de CEC complet. D'après: Gravlee GP, ed. Cardiopulmonary bypass: Principles and practice, 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2000, p 70.

Avant le démarrage de la CEC, le système est rempli d'une solution physiologique dont le volume correspond à environ un tiers du volume circulant du patient. Il s'agit du volume d'amorçage (priming), une solution hydro-électrolytique (Ringer lactate, Voluven®...) souvent additionnée d'un colloïde (gélatine ou hydroxyethylamidon) et éventuellement de sang allogène [8-10]. D'autres substances peuvent être ajoutées au cocktail : héparine, antifibrinolytiques, mannitol, stéroïdes. Ce volume est à l'origine d'une hémodilution nécessaire notamment pour freiner l'augmentation de la viscosité sanguine à basse température.

## II. Physiopathologie de la chirurgie cardiaque associée à la CEC

### A. Préambule

La CEC fait partie intégrante de nombreuses procédures cardio-thoraciques mais est aussi connue pour causer des réactions inflammatoires indésirables [11]. Dans la majorité des cas, la dysfonction d'organe résultante est transitoire et s'estompe d'elle-même grâce aux mécanismes de défenses homéostatiques capables de compenser ces réactions. Dans certaines situations, cependant, le patient peut présenter de sévères complications, prolongeant sa durée de séjour hospitalier et pouvant conduire à son décès. En effet, l'utilisation de la CEC dans les chirurgies cardiaques majeures initie une réponse inflammatoire aiguë complexe, imprévisible et peut être à l'origine de mortalités et morbidités significatives [12].

Les éléments suivants de la chirurgie cardiaque et de la CEC prédisposent le patient (surtout ceux présentant des comorbidités déjà installées) à une réponse inflammatoire indésirable et ces éléments peuvent, dans une certaine mesure, s'installer et demeurer : le traumatisme chirurgical, les fluctuations de la température corporelle, les lésions d'ischémie/reperfusion (I/R), les transfusions de produits sanguins, l'hémodilution et l'exposition du sang à des surfaces non-endothéliales.

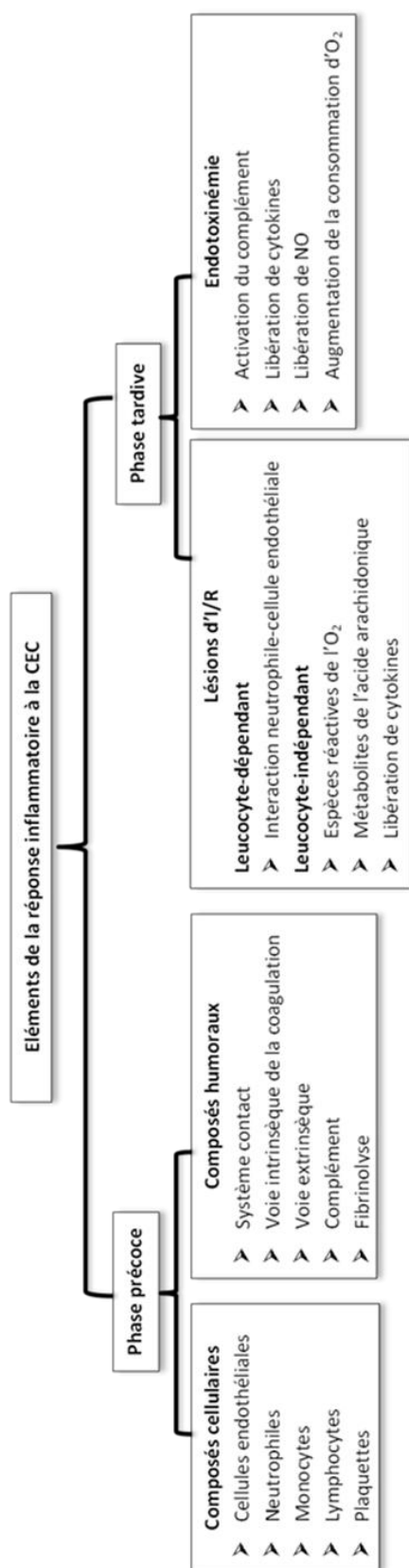
L'inflammation est la réponse initiale non-spécifique du tissu à une variété de lésions et représente une tentative de défense de l'organisme vis-à-vis d'agents agresseurs. Indépendamment de la nature de la cause, la réponse inflammatoire suit de façon qualitative les mêmes séquences d'activation, impliquant les voies inflammatoires humorales et cellulaires. Bien que l'objectif principal soit la protection, cette réponse inflammatoire peut devenir exagérée dans certaines circonstances, provoquant des dommages au sein de l'hôte qu'elle est censée protéger. La réponse inflammatoire observée en chirurgie cardiaque assistée par CEC suit une voie identique à ce schéma général. D'une part la chirurgie cardiaque représente un acte chirurgical majeur associé à une anesthésie prolongée qui est à l'origine d'une réponse inflammatoire forte. D'autre part, s'y ajoute la CEC, un processus intrinsèquement non-naturel, qui amplifie cette réaction. La pompe et l'oxygénateur fonctionnent tous les deux d'une façon non-physiologique, sans aucun rétrocontrôle des mécanismes normaux d'homéostasie. Ainsi, les pressions intravasculaires et la composition des gaz du sang peuvent se retrouver en dehors des intervalles physiologiques [11]. L'hémodilution significative (hématocrite : 25-30%) induit des

changements dans l'équilibre hydro-électrolytique entre les compartiments, des rétentions liquidiennes significatives et la dilution ainsi que la dénaturation des protéines plasmatiques [13-15]. Le sang est exposé à des surfaces non-endothéliales et à des contraintes de cisaillement (shear-stress) anormales, activant des réponses au sein des éléments figurés sanguins qui sont à l'origine de la production d'un certain nombre de médiateurs vasoactifs, responsables d'une altération de la perméabilité capillaire et associée à une hémolyse [16]. Simultanément, le système de coagulation, activé au cours de l'intervention, est également soumis à une perturbation de ses cascades. En résumé, les mécanismes homéostatiques de l'organisme sont complètement bouleversés, pouvant aboutir au déclenchement d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS). Dans la plupart des cas, la dysfonction des organes qui en résulte est transitoire et résolue progressivement grâce aux mécanismes de défense homéostatiques mis en jeu pour compenser ce phénomène. Cependant, dans certaines conditions, le patient peut être victime de complications majeures à l'origine d'une hospitalisation prolongée en réanimation et même conduire au décès.

## **B. La réponse inflammatoire**

La réponse inflammatoire à la CEC peut être décomposée en 2 phases clés : la phase précoce et la phase tardive. La phase précoce se déclenche suite au contact du sang avec des surfaces non-endothéliales, et la phase tardive est pilotée par les phénomènes d'I/R et l'endotoxémie. Ces 2 phases et les divers éléments impliqués sont résumés sur la Figure 3.

Figure 3. Acteurs de la réponse inflammatoire au cours de la CEC



## 1. **La phase précoce : activation du système contact**

La phase précoce de la réponse inflammatoire apparaît dès l'initiation de la CEC et est déclenchée par le contact des éléments du sang (cellulaires et humoraux) avec le matériel synthétique du circuit extracorporel. Dans les conditions normales, le sang n'entre en contact qu'avec le tapis de cellules endothéliales vasculaires constituant une surface dont le rôle important est de maintenir l'équilibre de la circulation. En produisant de façon équilibrée des substances pro- et anticoagulantes, les cellules endothéliales assurent la fluidité du sang, jusqu'au moment où une lésion apparaît et que la formation de caillot devient nécessaire. Les surfaces non-endothéliales de la machine de CEC déplacent cet équilibre vers un état pro-thrombotique ; ainsi, pour éviter ce phénomène, il est essentiel qu'une dose adéquate d'héparine soit administrée avant l'initiation de la CEC. Lorsque le sang héparinisé pénètre dans les tuyaux du circuit de CEC, les protéines plasmatiques sont instantanément adsorbées sur le circuit, formant une monocouche [11]. Certaines de ces protéines changent de conformation spatiale, exposant des récepteurs aux protéines et cellules sanguines circulantes. Ceci aboutit à l'activation de 5 systèmes de protéines plasmatiques (le système contact, les voies intrinsèques et extrinsèques de la coagulation, le système fibrinolytique et celui du complément) et de 5 groupes cellulaires (les cellules endothéliales, les lymphocytes, les monocytes, les neutrophiles et les plaquettes) [17]. Les rôles de ces 5 systèmes de protéines et de ces 5 groupes cellulaires sont interconnectés, complexes, et pas encore totalement élucidés ; cependant, les substances vasoactives, les enzymes et les micro-embolus produits par ces médiateurs activés sont à l'origine de l'initiation de la « réponse inflammatoire systémique » [13] et sont responsables de la majorité des complications associées à la CEC, à savoir les coagulopathies, les œdèmes tissulaires et les dysfonctions d'organes temporaires [17].

### *a) Les composés humoraux*

#### **Le système contact**

L'activation du système contact a été bien démontrée au cours de la CEC et des tentatives ont été entreprises afin de l'atténuer [18-20]. Lors de la CEC, le système contact active directement la voie intrinsèque de la coagulation ainsi que les neutrophiles. Cependant, il semble que d'autres éléments sont indirectement activés : les plaquettes, la fibrinolyse, le complément et les cellules endothéliales [11].

## Les systèmes intrinsèques et extrinsèques de la coagulation

- ❖ L'activation de la voie intrinsèque de la coagulation débute lors de l'activation du système contact, lorsque le sang se trouve exposé à une surface artificielle ou à du collagène au cours de lésions de la paroi vasculaire (Figure 4). La thrombine possède une richesse d'actions hémostatiques, néanmoins, les actions principales de la thrombine au cours de la CEC sont le clivage du fibrinogène en fibrine, l'activation du facteur XIII pour la réticulation de la fibrine, l'activation des plaquettes via les récepteurs spécifiques de la thrombine, et la stimulation des cellules pour produire le facteur von Willebrand (FvW) (participant ainsi à l'agrégation plaquettaire) [21]. L'ensemble de ces phénomènes conduit à la création d'une surface qui supporte la fixation des facteurs de la coagulation et ainsi facilite le « burst » total de la thrombine indispensable à l'hémostase. Cette voie est la voie prédominante empruntée par la coagulation au cours de toutes les phases de la CEC. Au-delà de son implication dans les mécanismes de coagulation, la thrombine présente un large éventail d'actions, et constitue entre autres l'un des médiateurs clés de l'inflammation, stimule la production d'une variété de facteurs de croissance, induisant dans les sites lésés la production de substances chimio-attractantes et vasoactives permettant l'adhésion des neutrophiles, l'attraction des macrophages et augmentant la perméabilité vasculaire [22].
- ❖ La voie extrinsèque est initiée par un traumatisme sur la paroi artérielle et constitue ainsi la voie prédominante dans l'hémostase des plaies (Figure 4). Bien que les 2 voies se chevauchent, la voie extrinsèque joue un rôle mineur dans le contexte de la CEC. Des travaux récents ont montré que l'interaction du facteur VIIa et du facteur tissulaire (FT) en conditions physiologiques n'est pas forcément vraie au cours de la réponse inflammatoire systémique observée dans les chirurgies cardiaques majeures avec support de CEC. Sous ces conditions, l'expression de FT est hautement improbable et restreinte au sous-endothélium. Plusieurs groupes d'investigateurs ont rapporté la présence physiologiquement active de FT hématogène dans les conditions pro-inflammatoires incluant la chirurgie cardiaque [23-25]. Plusieurs hypothèses ont été avancées : le FT hématogène semble être localisé dans les cellules sanguines (plaquettes essentiellement mais aussi hématies, leucocytes et granulocytes entre autres), se présentant sous la forme d'un cocktail de microparticules (0,1-1  $\mu\text{m}$ ) pro-coagulantes ou en tant que fragments solubles du FT pro-coagulant [26-28]. Les cytokines pro-



inflammatoires libérées au cours de la CEC pourraient également stimuler les neutrophiles et les monocytes à produire et à présenter à leur surface le FT [29, 30], alors que chez les patients en chirurgie cardiaque, le FT hématogène en combinaison avec les monocytes activés pourrait activer le facteur VII de façon plus importante que lorsqu'il est combiné aux plaquettes activées [31].

Quelle que soit la source du FT, dès la génération de facteur Xa, la thrombine est générée et les 2 voies de la coagulation suivent un chemin commun. La chirurgie utilisant la CEC aboutit à une activation étendue de ces 2 voies dans la cascade de la coagulation [32], nécessitant une héparinisation systémique afin de prévenir la formation de caillots au sein du circuit de CEC. L'héparine potentialise l'activité de l'Antithrombine III (ATIII) en causant un changement conformationnel qui expose son site actif et inhibe ainsi indirectement la formation de thrombine [33]. L'héparinisation systémique n'est cependant pas sans risque, l'activation plaquettaire peut conduire à une thrombocytopenie induite par l'héparine (TIH) [34] et à une possible (mais rare) hyperkaliémie secondaire à l'inhibition de l'aldostérone. Ces 2 effets indésirables sont bien décrits [35]. L'héparinisation permet d'inhiber la formation de thrombus mais son action ne s'exerce qu'au niveau de l'étape commune des voies intrinsèque et extrinsèque. En conséquence, malgré l'héparinisation systémique, la cascade de coagulation reste activée et continue de générer la formation de thrombine, ce qui se manifeste par des taux élevés de thrombine et d'ATIII pendant toute la durée de la CEC. Cette génération progressive de la thrombine, localisée de manière prédominante au sein de la plaie péricardique produit une coagulopathie consommatrice, responsable de nombreuses complications thromboemboliques et hémorragiques associées à ce type d'interventions [36]. Eventuellement, les inhibiteurs directs de la thrombine tels que la bivalirudine peuvent offrir la possibilité de supprimer totalement la formation de thrombine, remplaçant ainsi la domination depuis plus de 50 ans de l'héparine en chirurgie cardiaque ; cependant, leur utilisation clinique est actuellement très restreinte [37, 38].

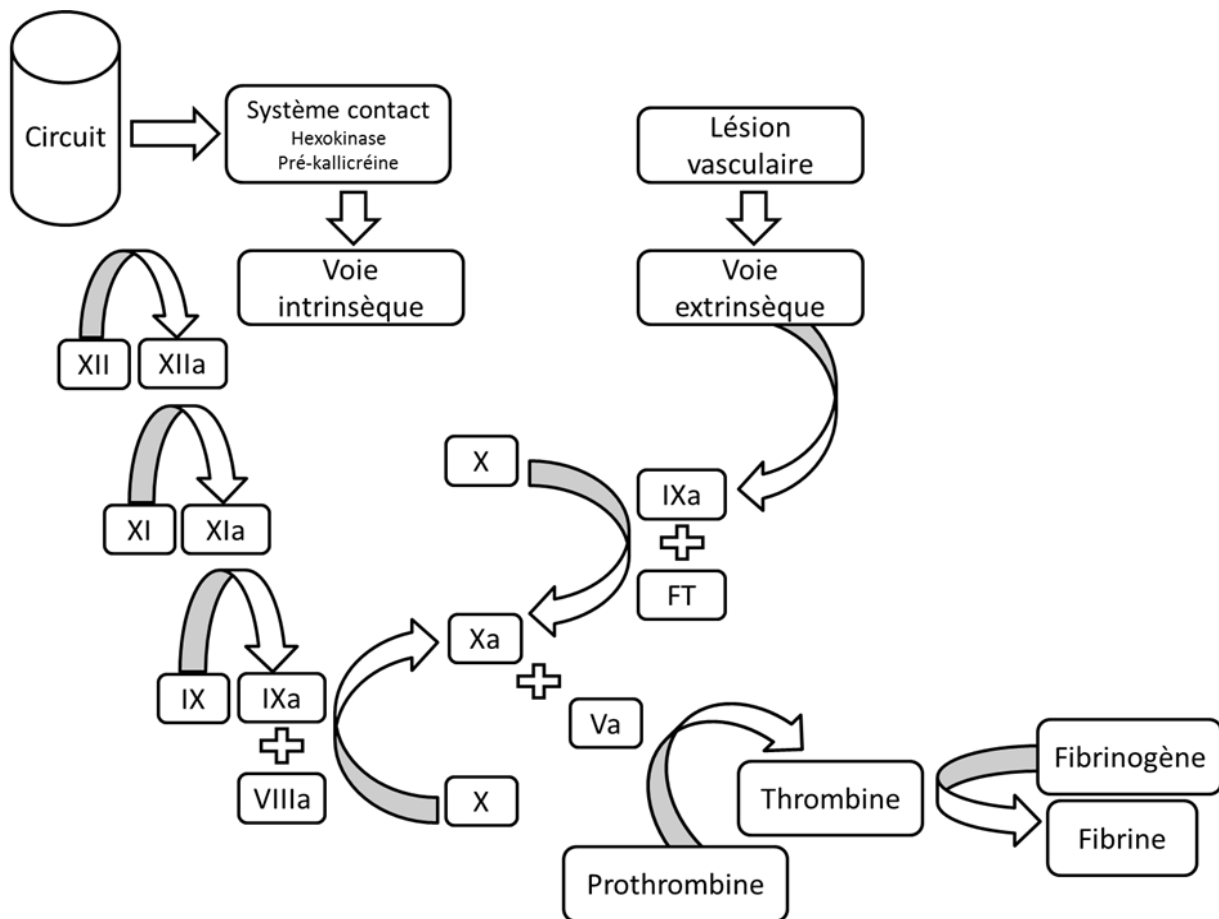


Figure 4. Voies de la coagulation mises en jeu lors de la chirurgie cardiaque associée à la CEC (Adapté de Harold R. Roberts et coll. *Current Concepts of Hemostasis Implications for Therapy. Anesthesiology* 2004; 100:722–30) [39]

## Le complément

La quatrième protéine plasmatique activée lors de la CEC est le système du complément : un système inné de défense immunitaire cytotoxique composé approximativement de 35 protéines plasmatiques ou membranaires interagissant entre-elles. Ce système initie et amplifie la réponse inflammatoire et agit comme un « complément » à l'immunité induite par les anticorps contre les infections microbiennes. Au sein de ce système, se retrouvent plusieurs facteurs solubles qui préviennent l'activation spontanée du complément ; il s'agit de protéines de régulation produites pour limiter l'action du complément contre l'hôte [40, 41].

L'activation du complément se produit via 3 voies majeures : la voie classique qui est dépendante du complexe immunitaire (anticorps lié à l'antigène) ; la voie alternative qui peut être activée uniquement par les cellules microbiennes ou les surfaces étrangères ; et la voie du

mannose-binding lectine (MBL) qui est activée par la lectine plasmatique qui transporte les résidus de mannose des agents microbiens [42].

La voie alternative est connue pour être la principale voie par laquelle la cascade du complément est activée au cours de la CEC. L'activation se produit immédiatement suite au contact du sang avec le matériel étranger synthétique du circuit [43]. La CEC active aussi le complément par la voie classique, pour laquelle il existe 3 déclencheurs : la formation de complexe protamine-héparine après la neutralisation de l'héparine suite à l'administration de protamine en fin de CEC [44], le relargage d'endotoxines par la flore intestinale au cours de l'I/R [43], et l'activation de C1 (une des trois protéines de la voie classique du complément) par le facteur XIIa produit par le système contact. Cette voie procède selon des étapes séquentielles, mais la voie alternative contient une boucle de rétro-activation qui sert à amplifier l'activation du complément. Ainsi, le système alternatif devient prédominant au cours de l'activation du complément induite par la CEC (11).

L'activation du complément au cours de la chirurgie cardiaque assistée par la CEC joue un rôle important dans le développement de lésions tissulaires peropératoires. Les fragments des protéines du complément C3a, C4a et C5a sont des anaphylatoxines (dont le C5a est le plus puissant) qui augmentent la perméabilité capillaire et perturbent le tonus vasomoteur avec contraction des muscles lisses des voies aériennes et hypotension [45]. L'activation du complément au cours de la CEC est associée à la génération de radicaux libres de l'oxygène (RLO) et à une morbidité significative [11, 13].

### La fibrinolyse

Le cinquième système de protéines plasmatiques activé au cours de la CEC est le système fibrinolytique (Figure 5). Si la coagulation est activée sans mécanismes régulateurs, la production continue résultante de thrombine réticulée pourrait causer une thrombose étendue. Le système fibrinolytique limite ce processus en localisant la formation de thrombus au site du tissu ou du vaisseau lésé, et prévient ainsi l'extension de l'occlusion thrombotique et secondairement l'ischémie tissulaire.

Le plasminogène est une protéine inactive, synthétisée par le foie et les cellules endothéliales. Bien qu'il soit incapable de cliver la fibrine, il possède une affinité pour cette dernière et est incorporé au sein des caillots formés. Le plasminogène est converti en sa forme active, la plasmine, principalement par l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA).

La plasmine est une sérine-protéase qui coupe à travers les brins de fibrine, produisant de nombreux produits de dégradation (dont le plus petit est le D-dimère) et peut éventuellement conduire à la solubilisation du caillot [46]. Dans les circonstances normales, le t-PA est lentement libéré par l'endothélium des vaisseaux endommagés de sorte que la dissolution du caillot peut prendre plusieurs jours sans aucune perturbation de la réparation du vaisseau atteint. L'activation de la plasmine et son inhibition sont ensuite régulées par une variété de protéines dont l'alpha2-antiplasmine, l'alpha2-macroglobuline et l'inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine.

La fibrinolyse se produit continuellement au cours de la chirurgie cardiaque particulièrement au niveau de la plaie péricardique [47, 48]. Ceci est aggravé par la CEC où la fibrinolyse se produit au sein du circuit [49] comme le montrent les taux de t-PA et de D-dimères qui s'élèvent progressivement tout au long de cette procédure [32]. Cette activation est causée par la stimulation par la thrombine des cellules endothéliales, qui produisent des taux élevés aussi bien de t-PA [50] que de XIIa et de kallikréine [42]. Cette extension de fibrinolyse (dont les taux de D-dimères sont le reflet) a été positivement corrélée avec l'augmentation des hémorragies peropératoires [51]. Enfin, l'activation de ce système est également à l'origine d'autres atteintes de l'hémostase telles que la réduction des capacités d'adhésion et d'agrégation plaquettaire en raison de la redistribution des récepteurs des glycoprotéines Ib et IIb/IIIa.

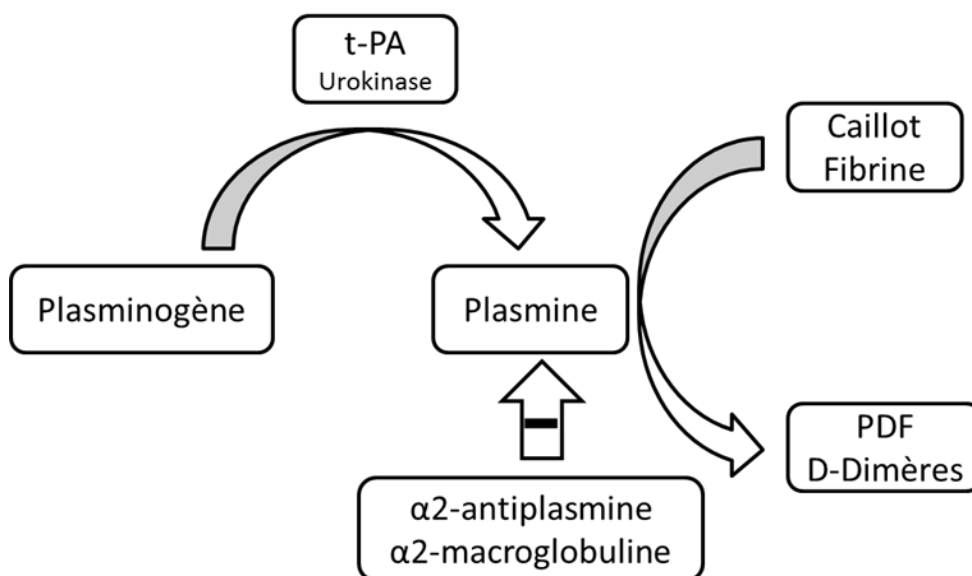


Figure 5. Les voies de la fibrinolyse

## *b) Composés cellulaires*

### **Les cellules endothéliales**

Bien que les cellules endothéliales ne rentrent pas directement en contact avec le circuit de CEC, elles sont en contact permanent avec le sang qui y circule. En interagissant avec une variété d'agonistes hématogènes (principalement la thrombine, le C5a et les cytokines IL1- $\beta$  et TNF $\alpha$ ) et en produisant ou en inactivant d'autres substances, ces cellules jouent des rôles nombreux dans la réponse inflammatoire à la CEC ; elles garantissent la fluidité de l'écoulement sanguin, influencent le tonus vasculaire, maintiennent l'intégrité du système vasculaire et sont impliquées dans l'adhésion et la transmigration (diapédèse) des leucocytes dans les tissus [52].

L'IL1- $\beta$  et le TNF $\alpha$  stimulent les cellules endothéliales à produire et à exprimer les molécules d'adhésion cellulaires E-selectine et P-selectine. Elles sont liées par une forte affinité à des ligands sur les leucocytes activés et permettent leur « rolling » [53]. Elles induisent également l'expression par les cellules endothéliales de la molécule d'adhésion intracellulaire ICAM-1 et de la molécule d'adhésion des cellules vasculaires VCAM-1, qui se lie fermement avec les intégrines présentes à la surface des neutrophiles et les monocytes et facilitent la migration leucocytaire à travers l'endothélium vers l'espace extravasculaire, aboutissant finalement à de multiples manifestations inflammatoires lors de la CEC.

Au cours de la CEC, les cellules endothéliales produisent une variété d'agents anticoagulants et hémostatiques [54] dont le sulfate d'héparine, l'AT, la thrombomoduline, la protéine S (qui catalyse l'activité anticoagulante de la protéine C), le t-PA et enfin l'inhibiteur de la voie du FT, un polypeptide monocaténaire qui inhibe de façon réversible le facteur Xa et inhibe indirectement le complexe FT-VIIa de la voie extrinsèque [53]. Ces substances influencent également le tonus vasomoteur par la production ou l'inactivation d'un certain nombre de composés chimiques tels que le NO (monoxyde d'azote), l'endothéline-1, l'histamine, la noradrénaline, et la bradykinine.

### **Les leucocytes**

Initialement, la numération leucocytaire est diminuée par la CEC, en raison de l'effet d'hémodilution du liquide d'amorçage du circuit de CEC. Cependant, les leucocytes augmentent par la suite, à la fois par leur nombre et leur activité, pendant et après la CEC

[17]. La CEC active 3 types de leucocytes : les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes.

#### ❖ *Les neutrophiles*

Les neutrophiles sont les effecteurs cellulaires clés de la réaction de défense de l'hôte et leur activation aboutit à la libération d'une grande quantité d'enzymes cytotoxiques à partir des granules intracellulaires, dont l'élastase, la myéloperoxydase (MPO) et de nombreux lysozymes. Grâce à « l'explosion respiratoire », les neutrophiles sont aussi capables de produire diverses espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et d'autres substances hautement cytotoxiques. Le relargage de ces différentes substances se produit au sein des vaisseaux ou directement dans les tissus.

La CEC active les neutrophiles comme le montrent les taux élevés d'élastase, de cytokines pro-inflammatoires et par la formation de conjugués leucocytes-plaquettes (56). De nombreux mécanismes sont impliqués, le plus prédominant étant l'activation des neutrophiles par les éléments des systèmes du complément et de contact, à savoir le C3a et C5a, mais aussi la kallikréine et le XII<sub>f</sub>. L'effet de l'activation du complément est particulièrement marqué, aboutissant à une activation des neutrophiles au bout de quelques secondes d'exposition (57). Cependant, d'autres médiateurs jouent leur rôle ; la thrombine, le TNF $\alpha$ , l'héparine, l'endotoxine, l'histamine et le peptide d'activation des neutrophiles 2 sont libérés par les plaquettes et participent à l'activation des neutrophiles au cours de la CEC [42, 43, 55]. Enfin, les neutrophiles sont activés par interaction directe avec les cellules endothéliales, comme précédemment décrit, et cette interaction neutrophiles-cellules endothéliales joue un rôle clé dans la phase tardive de la réponse inflammatoire.

Les étapes impliquées dans le chimiotactisme et l'activation des neutrophiles au site de lésion tissulaire sont bien décrites. Les cellules endothéliales sont activées par exposition aux facteurs de stress physiologiques tels que les cytokines pro-inflammatoires, le traumatisme, les lésions d'I/R et les bactéries. Suite à cette activation, les cellules endothéliales commencent à recruter les neutrophiles depuis le sang. Au départ, les neutrophiles roulent le long de la couche endothéliale du fait de l'augmentation de l'expression de L-selectine à la surface des neutrophiles et d'E- et P-selectine sur les cellules endothéliales. Elles créent des liens de faible affinité entre-elles mais pour que l'adhésion se fasse complètement et que la transmigration ait lieu, des liens de forte affinité sont nécessaires par l'intervention des

molécules d'adhésion cellulaires. Les neutrophiles expriment une intégrine, le récepteur MAC-1 (composé de sous-unités, CD18 et CD11b) surexprimé lors de la CEC, tandis que les cellules endothéliales expriment ICAM-1 et ICAM-2 ainsi que la molécule d'adhésion plaquettes-cellules endothéliale 1. L'interaction entre ces molécules d'adhésion garantit le lien ferme à la surface endothéliale. A ce niveau, les neutrophiles peuvent former un amas aboutissant à une occlusion micro-vasculaire et à une ischémie des territoires en aval. Une fois attachés, les neutrophiles changent de conformation spatiale pour faciliter leur transmigration dans le compartiment interstitiel à travers la couche endothéliale. Ceci est facilité par l'expression de molécules d'adhésion au niveau des jonctions des cellules endothéliales et la libération d'agents chimiotactiques dans l'espace sous-endothélial, créant ainsi un gradient de concentration. Une fois dans la matrice extracellulaire (MEC), les neutrophiles libèrent leur contenu cytotoxique depuis leurs granules intracellulaires résultant en une augmentation de la perméabilité micro-vasculaire, un œdème interstitiel, la formation de thrombus et la lésion des cellules parenchymateuses [56, 57]. Il a été démontré que ces phénomènes se produisent dans les poumons, le cœur mais aussi dans d'autres tissus et organes, pendant et après la CEC [58-61]. La plupart des investigateurs considèrent que les neutrophiles jouent un rôle central dans les atteintes organiques et tissulaires résultant de la CEC. Ainsi, les neutrophiles restent la cible majeure de plusieurs efforts thérapeutiques différents à la fois mécaniques et pharmacologiques [62].

#### ❖ *Les monocytes*

Les monocytes sont également activés au cours de la CEC, mais moins rapidement que d'autres systèmes tels que le complément et les neutrophiles, avec un pic d'activité apparaissant quelques heures après le début de la CEC [63]. Quand ils sont stimulés, les monocytes produisent des cytokines pro- et anti-inflammatoires incluant l'IL-1, IL-2, IL-3, IL-6 et l'IL-8. Les taux de ces médiateurs importants de la réponse inflammatoire réalisent un pic de concentration quelques heures après la CEC, suggérant que leur impact se situe essentiellement au cours de la période postopératoire précoce.

Les monocytes jouent un rôle de grande importance dans l'hémostase au cours de la chirurgie cardiaque, à la fois de façon indépendante des plaquettes mais également en collaboration avec celles-ci, formant un conjugué plaquettes-monocytes [64]. Quand ils sont

stimulés par les cytokines pro-inflammatoires, les monocytes produisent et présentent à leur surface le FT [29, 30], aussi bien dans la plaie péricardique que dans le circuit.

#### ❖ *Les lymphocytes*

La concentration totale de lymphocytes chute tout au long de la CEC, un effet reflété dans toutes les sous-populations spécifiques incluant les leucocytes, les cellules natural killer, les lymphocytes T-helper et les lymphocytes T suppresseurs. Cette diminution se maintient autour de 3 à 7 jours après la chirurgie [65]. La réduction en nombre est associée à une perturbation des capacités de phagocytose des globules blancs et à une inhibition des monocytes à présenter l'antigène et de synthèse d'IL-1, ce qui aboutit à un affaiblissement de la réponse immunitaire cellulaire et donc à une augmentation de la susceptibilité aux infections des patients en post-chirurgie [66].

#### **Les plaquettes**

La CEC active les plaquettes entraînant une diminution de leur nombre d'environ 30 à 50% et une altération de leur fonction, ce qui simultanément contribue à des coagulopathies post-opératoires. Le nombre des plaquettes diminue quasiment instantanément à cause de l'hémodilution causée par le liquide d'amorçage, mais ce mécanisme ne suffit pas à lui seul à expliquer la thrombocytopénie observée au cours de la CEC [67]. D'autres facteurs contribuent probablement à cette consommation de plaquettes dont : la destruction mécanique, l'adhésion à la surface du circuit, leur séquestration dans certains organes et la coagulopathie consommatrice [42]. L'activation plaquettaire est plurifactorielle, avec l'intervention de médiateurs tels que la présence de plaies chirurgicales, la concentration en héparine, l'hypothermie et le contact direct avec le circuit de CEC [68]. Une fois la chirurgie sous CEC initiée, des concentrations faibles en thrombine sont générées dans la plaie péricardique et au sein du circuit [69]. La thrombine en tant que puissant agrégant initie probablement l'activation plaquettes. Cependant, au fur-et-à-mesure que la chirurgie se poursuit, les plaquettes sont également activées par le complément activé (C5b-9), les leucotriènes, la plasmine, le facteur d'activation plaquettes, le contact de surface et les collagénases [70].

Une fois activées, les plaquettes adhèrent au fibrinogène adsorbé en surface, au facteur FvW et à la fibronectine sur les surfaces du circuit. Elles expriment le complexe de récepteur Gp



IIb/IIIa qui permet l'adhésion des plaquettes entre elles par l'établissement de ponts de fibrinogène. Elles expriment aussi la P-selectine, ce qui contribue à la formation de conjugués avec les monocytes et dans une moindre mesure avec les neutrophiles par liaison entre P-selectine et la glycoprotéine-1 [71]. L'expression de P-selectine stimule également l'expression de FT par les monocytes, contribuant ainsi à l'évolution de la formation du thrombus [72].

Certaines plaquettes, agrégées ou circulantes, libèrent tout ou partie de leurs granules contenant des agents chimioattractants, des protéines de la coagulation (kininogène de haut poids moléculaire HK et FvW) et des substances vasoactives (thromboxane A<sub>2</sub>). Les plaquettes contribuent également à la formation de micro-emboles, tels que des fragments dissociés se détachant des agrégats de plaquettes soit adsorbés en surface soit provenant de conjugués plaquettes-leucocyte ou d'emboles plaquettes-fibrine [73]. Dès que les fonctions et le nombre des plaquettes chutent, d'autres nouvelles plaquettes rejoignent la circulation depuis la moelle osseuse.

La CEC exerce ainsi un puissant effet sur la population plaquettaire et on retrouve en fin de CEC une grande hétérogénéité dans cette population de plaquettes. Cet effet varie en fonction des patients et des systèmes de perfusion [74], mais tous présentent des thrombocytopénies et des temps de saignement augmentés dans une certaine mesure. Les temps de saignement retournent en général aux valeurs normales en 4 à 12 heures [75] (Figure 6).

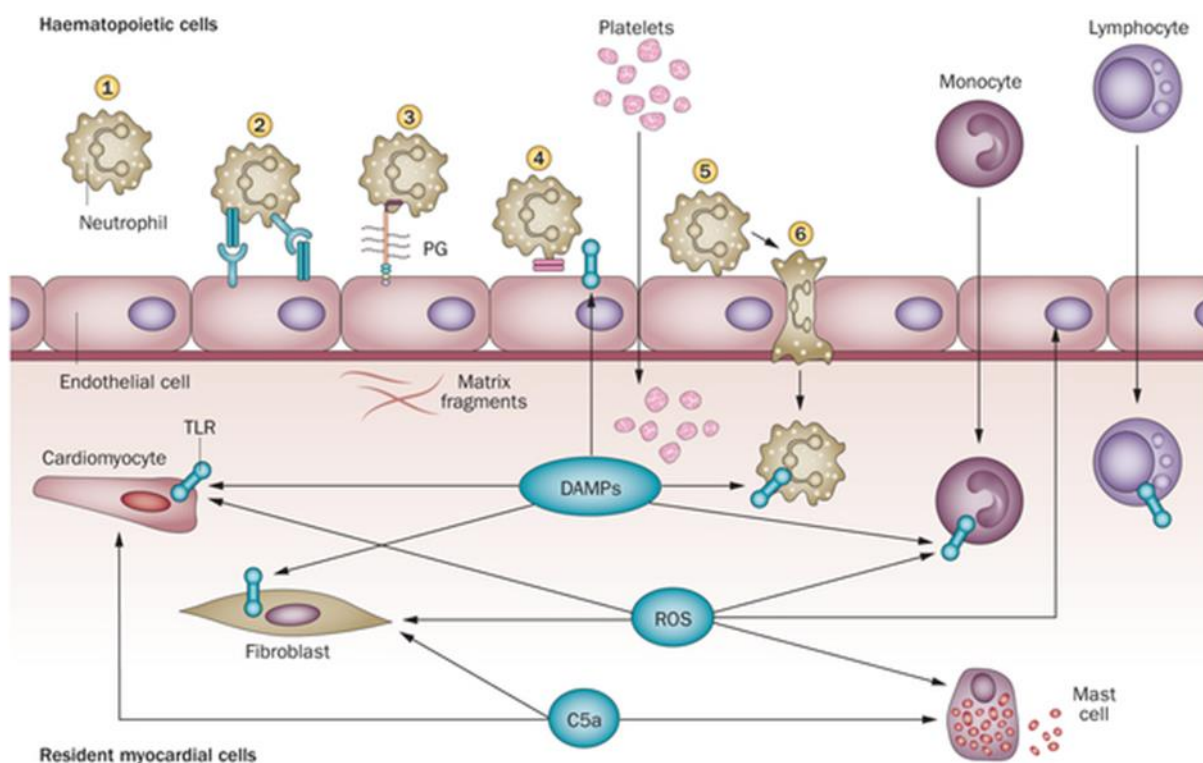


Figure 6. Schéma récapitulatif des différentes phases et acteurs intervenant au cours de la réponse inflammatoire (Tiré de Nikolaos G. Frangogiannis. *The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling*. *Nature Reviews Cardiology* 11, 255–265 (2014) [76]. DAMPS : damage-associated molecular patterns ; ROS : radical oxygen species ; TLR : Toll-like receptors.

## 2. La phase tardive

Au fur-et-à-mesure que le CEC se prolonge, l'activation des éléments cellulaires et humoraux décrite précédemment diminue. Ceci est supposé être le résultat d'un processus de « passivation » des sites de liaison sur les surfaces des biomatériaux du circuit qui se produit comme un résultat de l'adsorption au sein de la surface du circuit la rendant plus biocompatible. Cependant, une seconde phase dite tardive a été observée et est supposée être reliée aux lésions d'I/R pendant et après la CEC et à l'endotoxémie, probablement après la libération d'endotoxines à partir de la microflore intestinale [77].

Au cours de la chirurgie cardiaque, le clampage aortique supprime totalement l'approvisionnement en sang du cœur et en grande majorité des poumons (qui reçoivent du sang oxygéné depuis les artères bronchiques non-perturbées). En conséquence, le cœur et dans une moindre mesure les poumons deviennent ischémiques et sont reperfusés au moment du déclampage. Cette séquence d'évènement est à l'origine de lésions d'I/R auxquelles s'associe dans certaines circonstances une réaction inflammatoire supplémentaire aboutissant à d'un syndrome inflammatoire systémique ou SIRS (Systemic

Inflammatory Reaction Syndrome): augmentation de la perméabilité capillaire, accumulation de liquide au niveau interstitiel, leucocytose, coagulopathie et dysfonctions d'organes.

### C. Les lésions d'I/R

Les lésions d'I/R sont principalement induites par les interactions neutrophiles-endothélium telles que décrites précédemment. La phase ischémique est accompagnée de lésions endothéliales, aboutissant à l'activation et la séquestration des neutrophiles au moment de la reperfusion. Cependant, certains éléments sont indépendants des leucocytes et impliquent la production importante de RLO : le relargage de métabolites de l'acide arachidoniques (prostacycline), la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules ischémiques (TNF $\alpha$  et IL) et l'activation de systèmes de protéines humorales (complément et coagulation) telles que décrites plus haut [78, 79]. La réintroduction de l'O<sub>2</sub> au cours de la reperfusion initie une augmentation de la production de RLO au sein des cellules précédemment ischémiques, cette situation étant aggravée par la déplétion du stock énergétique (ATP) et l'effondrement des défenses antioxydantes au cours de la période ischémique. Les RLO affectent en particulier les cellules endothéliales de la microcirculation (d'autres cellules peuvent être atteintes par des dommages membranaires) et peuvent induire une dénaturation des protéines intracellulaires ou extracellulaires. Les RLO diffusent dans la circulation où leurs actions propagent la réponse inflammatoire aiguë [43] (Figure 7).

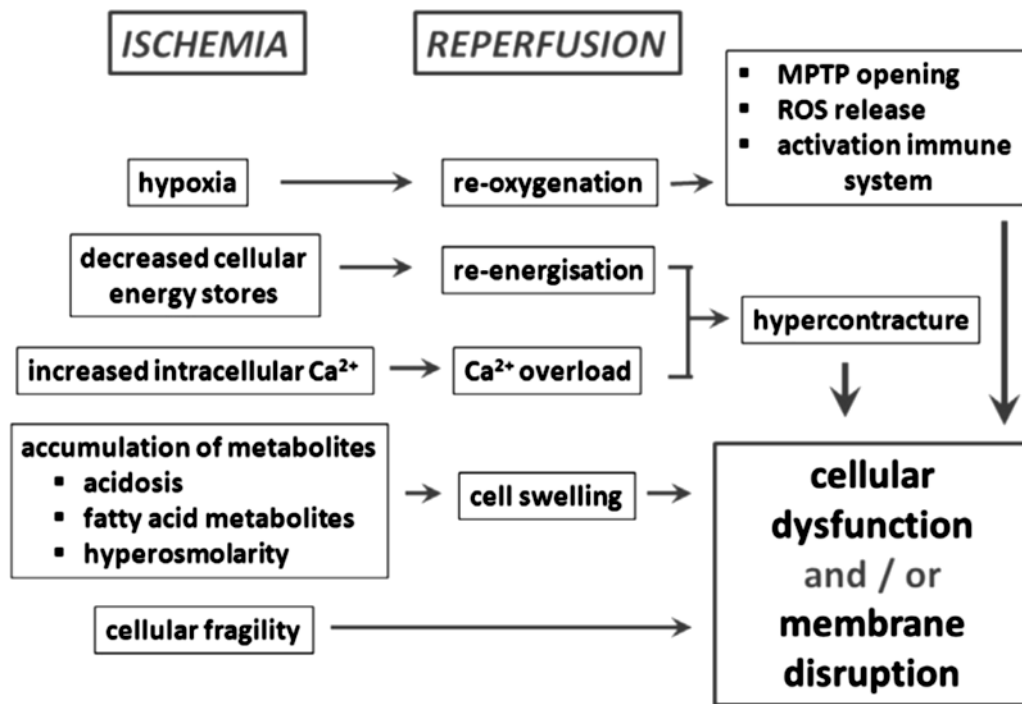


Figure 7. Représentation schématique des facteurs intervenant dans la dysfonction et/ou les lésions lors des phénomènes d'I/R (Tiré de : S. De Hert, A. Moerman. Myocardial injury and protection related to cardiopulmonary bypass. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 29 (2015) 137-149) [80]

#### D. L'endotoxine

L'endotoxine est un lipopolysaccharide (LPS) de la paroi cellulaire des bactéries Gram- et est reconnue pour être un stimulus majeur dans le développement de SIRS [81]. L'endotoxémie chez les patients en chirurgie cardiaque impliquant la CEC a été largement décrite (84), mais l'amplitude de l'élévation en endotoxine varie grandement selon les études [43]. La pathogénèse de ce phénomène n'est pas totalement élucidée, cependant, la translocation intestinale est traditionnellement perçue comme en étant la source primaire [82]. Au cours de la CEC, il se produit une vasoconstriction splanchnique qui conduit à une ischémie de la muqueuse intestinale perturbant l'efficacité de la barrière intestinale et favorisant la perméabilité vis-à-vis de la flore microbienne. Néanmoins, ces postulats restent très difficiles à observer *in vivo*, et plusieurs investigateurs peinent à démontrer une relation claire ou de causalité parmi ces variables clés, telles que la durée de la CEC, les taux de perméabilité intestinale et les niveaux d'endotoxines à la fin de la CEC [83-85]. Toutefois, des taux élevés d'endotoxine au cours de la CEC sont connus pour activer le complément par la

voie alternative, pour stimuler la libération des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ ) et de NO, et pour augmenter les taux post-opératoires de consommation en oxygène [86].

## E. Les stratégies visant à atténuer la réponse inflammatoire au cours de la CEC

Afin d'atténuer la réponse inflammatoire au cours de la CEC, différentes stratégies ont été envisagées, d'ordre pharmacologique, interventionnel ou technique (Figure 8).

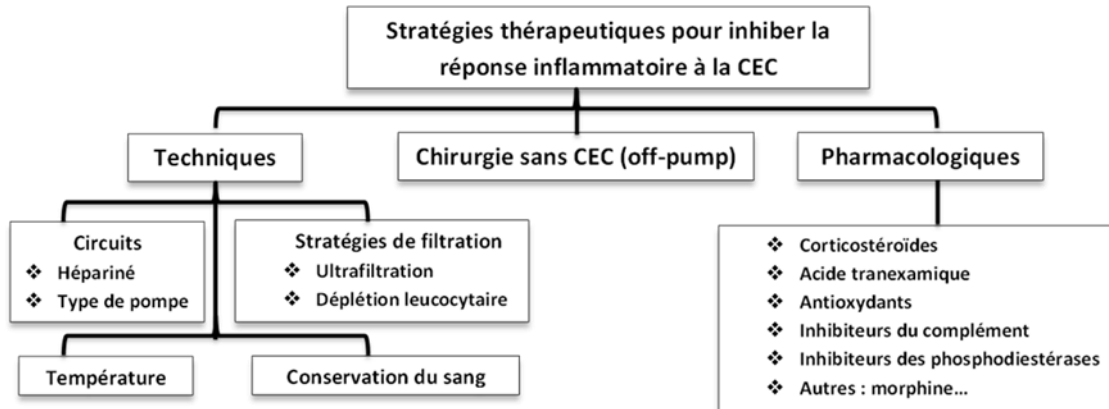


Figure 8. Résumé des différentes stratégies visant à atténuer la réponse inflammatoire au cours de la CEC

### 1. Les stratégies pharmacologiques

#### a) Les corticostéroïdes

Les corticostéroïdes sont utilisés en chirurgie cardiaque depuis presque 50 ans, cependant leur usage dans ce contexte reste controversé [87]. L'étude initiale concernant leurs potentiels bénéfiques était en partie justifiée par les résultats prometteurs de l'impact des corticostéroïdes dans les modèles de chocs septiques et hémorragiques, des conditions que les auteurs avaient reliées au SIRS [88]. Des études relativement plus récentes ont d'ailleurs confirmé que les stéroïdes sont efficaces pour l'amélioration de la survie dans ces conditions [89]. Une variété de mécanismes a été proposée pour expliquer leurs effets bénéfiques au cours de la CEC, notamment une potentielle action protectrice sur l'intégrité des cellules cardiaques et pulmonaires et la réduction des transferts de fluides [90]. D'autres études ont montré que les stéroïdes réduisaient l'expression des molécules d'adhésion endothéliales [91], limitant ainsi les lésions tissulaires induites par les neutrophiles, une étape clé au cours de la phase tardive de SIRS associée à la CEC. Enfin, une réduction de l'activation du

complément [92, 93] et du relargage de cytokines [94] a également été observée. Bien que plusieurs équipes aient décrit l'effet des stéroïdes dans l'atténuation de la réponse inflammatoire induite par la CEC [95, 96], d'autres études ont cependant rapporté des résultats mitigés vis-à-vis des événements cliniques. Ainsi, Toft et coll. [97] ont décrit une réduction de la fuite capillaire et une hyperthermie moindre dans le groupe traité mais sans aucune amélioration en termes de durée d'intubation postopératoire ou de durée de séjour en réanimation. Kawamura et coll. [98] ont observé une amélioration de l'index cardiaque et de la pression capillaire pulmonaire dans la cohorte traitée par stéroïdes mais sans différence dans l'utilisation de catécholamines. Fillinger et coll. [99] ont administré des stéroïdes avant et après la chirurgie et ont observé une réduction significative des taux d'IL-6 et d'IL-10 mais n'ont pas réussi à montrer d'amélioration dans les critères de jugements intermédiaires suivants : débit expiratoire maximal, gradient d'oxygène alvéolo-artériolaire, scores de douleur, utilisation d'antalgiques durée d'intubation postopératoire et durée de séjour en réanimation. De plus, une élévation de la glycémie a été mise en évidence au cours des 8 premières heures postopératoires [99].

Une étude conduite par Halonen et coll. [100] a montré une réduction significative de la fibrillation auriculaire (FA) postopératoire après administration postopératoire de dexaméthasone mais aucun commentaire n'a été émis sur la glycémie ou l'utilisation d'insuline, ces 2 facteurs étant connus pour affecter l'incidence de la FA [101]. Une excellente revue menée par Chaney en 2002 [102] a souligné que, lors de 3 études contrôlées contre placebo, prospectives, randomisées en double insu, le groupe traité a montré tous les effets indésirables des corticostéroïdes sur les performances hémodynamiques, les fonctions pulmonaires et la stabilité métabolique postopératoires. Plus récemment, Morariu et coll. [103] ont réalisé une étude approfondie de l'utilisation de la dexaméthasone chez les patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque pour PAC sous CEC, et ont découvert que tout en prévenant la survenue de SIRS, elle n'offrait aucune protection contre les atteintes peropératoires transitoires des organes du système digestif. De plus, son utilisation aboutissait chez plusieurs patients à une plus grande dysfonction pulmonaire postopératoire, des temps d'intubation prolongés et des hyperglycémies initiées en période postopératoire. La littérature concernant l'utilisation prophylactique de stéroïdes chez une population pédiatrique bénéficiant d'une chirurgie cardiaque sous CEC a été

révisée pour la base de données Cochrane en 2008, et a rapporté que les preuves existantes ne sont pas en faveur, ni ne soutiennent cette pratique chez ce type de patients [104].

Enfin, des recommandations récentes d'experts en chirurgie sous CEC, provenant de l'American Heart Association et de l'American College of Cardiology, ont établi que « l'administration de corticostéroïdes n'est pas coûteuse et semble réduire le risque de réponse inflammatoire systémique associée à la CEC avec un faible risque d'inconvénients. Les connaissances actuelles soutient que l'utilisation prophylactique est tolérée chez les patients bénéficiant de la CEC » [105]. Malgré des preuves d'efficacité contradictoires, les corticostéroïdes sont encore utilisés dans un nombre important d'établissements.

### *b) Les antifibrinolytiques*

L'aprotinine (Trasylol®) est un inhibiteur de sérine protéases non spécifique isolé à partir du tissu pulmonaire bovin et qui a été utilisé en clinique la première fois dans les années 1960 pour traiter les pancréatites aiguës [106]. La connaissance de sa capacité à inhiber la kallikréine, un des éléments clés du système contact, a conduit, dans les années 1980, à tester l'aprotinine comme agent anti-inflammatoire potentiel en CEC. Cependant, les découvertes majeures des premières études ont révélé que l'utilisation de l'aprotinine en chirurgie cardiaque était significativement associée à la réduction des hémorragies peropératoires [107, 108]. Ces résultats ont conduit à une large adoption de l'aprotinine dans le but de réduire les saignements postopératoires dans ce contexte. Néanmoins, les hypothèses initiales se sont révélées vraies ; l'aprotinine présente d'importantes propriétés anti-inflammatoires. Elle inhibe la trypsine, la chymotrypsine, la plasmine, l'élastase et la thrombine [42]. En inhibant la kallikréine et la plasmine, elle réduit les taux d'activation du système contact et limite la fibrinolyse. Elle prévient la protéolyse des récepteurs majeurs de la thrombine plaquettaire (protease activated receptor 1) [109], inhibant ainsi l'activation plaquettaire, d'où des effets simultanément pro- et anti-thrombotiques. L'aprotinine réduit l'activation du complément ; les taux circulants de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6, IL-8 et le TNF $\alpha$ ; et l'expression de MAC-1 [110-112]. Il a été démontré que l'aprotinine réduisait les marqueurs de lésions myocardiques (Troponine cardiaque T, Creatine Kinase-MB et Lactate Deshydrogenase) chez les patients en chirurgie cardiaque pour PAC [113], et une méta-analyse concluait même à une diminution de la mortalité toutes causes [114].

Cependant, au cours des deux dernières décennies, l'utilisation en routine de l'aprotinine a été remise en question. Une étude observationnelle menée par Mangano et coll. [115] a rapporté que les taux de complications cardiaques, rénales et cérébrales étaient plus que doublés chez les patients recevant l'aprotinine, contredisant ainsi les conclusions des précédentes méta-analyses [114, 116]. L'étude BART (Blood Conservation using Antifibrinolytic) qui comparait l'aprotinine à deux analogues de la lysine (acide tranexamique et acide aminocaproïque) chez les patients à haut risque en chirurgie cardiaque [117], publiée en mai 2008 a fourni des preuves modestes sur l'efficacité hémostatique supérieure de l'aprotinine ; les patients ayant reçu l'aprotinine présentaient des risques moins importants de saignements massifs postopératoires et un moindre recours à l'administration de produits sanguins [118]. Malgré cela, ces patients présentaient des risques de mortalité à 30 jours supérieurs de 50%, ce qui a conduit les investigateurs de l'étude à conclure que l'aprotinine ne devait plus être utilisée chez les patients devant bénéficier d'une chirurgie cardiaque à haut risque (38). Dès lors, l'aprotinine a été retirée du marché en 2007. La rapidité de ce retrait est d'autant plus surprenante que l'étude BART présentait de sérieuses faiblesses méthodologiques et que le poids des preuves dans la littérature penche en faveur de l'aprotinine dans les PAC et chez les malades sous anti-thrombotiques [119]. Bien que les autorités sanitaires européennes et canadiennes aient clairement indiqué que les bénéfices de l'aprotinine surpassent ses risques en chirurgie cardiaque, son utilisation n'a pas repris à ce jour. Toutefois, la substance pourrait revenir sur le marché, puisque l'agence européenne des médicaments (*European Medicines Agency, EMA*) en a levé l'interdiction.

Actuellement, l'acide tranexamique (Exacyl®) est l'antifibrinolytique le plus couramment utilisé en chirurgie cardiaque. Il fut utilisé initialement lors de saignements anormaux (hémorragies méningées, hémorragies digestives, ménorragies, épistaxis ainsi que dans l'hémophilie...). C'est vers la fin des années 1970 que les premiers travaux décrivant son utilisation pour diminuer le saignement postopératoire furent publiés, notamment dans l'amygdalectomie [120]. Son faible coût, et donc le faible soutien de l'industrie dont il bénéficia, freina son développement comme outil pharmacologique de réduction du saignement péri-opératoire face à l'aprotinine, fortement soutenue quant à elle par l'industrie. L'acide tranexamique est un antifibrinolytique de synthèse, analogue de la lysine qui bloque les récepteurs à la lysine du plasminogène, de la plasmine et de l'activateur



tissulaire du plasminogène. L'acide tranexamique inhibe ainsi la formation de plasmine, limite la dégradation de la fibrine et ainsi retarde la fibrinolyse naturelle et donc la dégradation du caillot. Toutefois, il s'est avéré après plusieurs années d'utilisation en chirurgie cardiovasculaire que l'acide tranexamique n'était pas dénué de complications dans les cas à risque élevé, où il semble au moins aussi dangereux que l'aprotinine [121]. Il est également associé à une insuffisance rénale postopératoire, particulièrement dans la chirurgie valvulaire [122]. Les hautes doses doublent l'incidence de convulsions postopératoires par rapport à l'aprotinine, particulièrement chez les personnes âgées [123-125]. Plusieurs leçons peuvent être retenues à partir de l'histoire de l'aprotinine et de l'acide tranexamique concernant l'évaluation de nouveaux produits pharmaceutiques dans leurs implications en pratiques cliniques [126]. Premièrement, il faudrait mettre moins l'accent sur les comparaisons entre nouvelles molécules et placebo mais plus sur des essais correctement élaborés avec une puissance suffisante cherchant à comparer ces nouveaux agents thérapeutiques avec ceux déjà disponibles [127]. Deuxièmement, bien que le risque d'hémorragies au cours de la chirurgie cardiaque soit un évènement clinique dont la prise en compte est indiscutable, ce risque ne possède qu'une partie des caractéristiques d'un critère de substitution et ne peut donc être considéré isolément. Par exemple, les autres classes thérapeutiques telles que les agents antidiabétiques, les AINS ou encore les antifibrinolytiques ne sont pas seulement évalués sur le critère de jugement principal.

### *c) Les antioxydants*

Une partie des dommages cellulaires observés au cours de l'I/R associée à la CEC est attribuée aux RLO libérés par les neutrophiles activés. Le stress oxydant qui en résulte est aggravé par la déplétion en piègeurs endogènes tels que les vitamines C et E. Les études expérimentales ont étudié l'efficacité d'antioxydants exogènes comme le mannitol, l'allopurinol et la N-acétyl-cystéine dans la prévention ou l'atténuation des dommages induits par les RLO [56, 128]. Des résultats encourageants ont été observés lors de l'utilisation de superoxyde dismutase et de catalase, deux enzymes puissamment antioxydantes, dans la reperfusion de greffe de cœur sur modèle de rat [129]. Chez l'Homme, la reperfusion du cœur avec une solution de cardioplégie au sang, au lieu de cristalloïdes, réduit les lésions d'I/R grâce aux piègeurs endogènes de RLO présents dans les hématies [130]. L'amélioration de la fonction myocardique et la réduction de la morbidité peropératoire ont été mises en évidence chez les patients en chirurgie de PAC ayant reçu

l'administration *per os* préopératoire de vitamine E, seule [131] ou en association avec la vitamine C et l'allopurinol [132]. Malgré des résultats prometteurs, la plupart des études chez l'Homme n'ont pas montré de bénéfices nettement significatifs et par conséquent la thérapie antioxydante ne peut être recommandée en tant qu'option thérapeutique standard.

#### *d) Les inhibiteurs du complément*

L'activation du complément joue un rôle clé au cours de la phase précoce de la réponse inflammatoire à la CEC. Les inhibiteurs du complément tels que le Pexelizumab, un fragment d'anticorps recombinant qui se lie au C5, bloquant la génération de C5a et C5b-9, suscitent le plus grand intérêt. Des essais randomisés et des analyses rétrospectives de sous-groupes suggèrent une possible réduction du risque d'infarctus myocardique et de décès au cours des 30 premiers jours suivants la chirurgie [133-136]. Ces bénéfices peuvent être particulièrement marqués pour des risques élevés de lésions d'I/R, lorsque les temps de clampage aortique sont prolongés [134, 135]. Bien qu'il n'existe pas assez de données à l'heure actuelle pour recommander l'incorporation en pratique clinique de routine, il semblerait que les inhibiteurs du complément possèdent un futur rôle potentiel dans l'arsenal thérapeutique anti-inflammatoire.

#### *e) Les inhibiteurs des phosphodiésterases*

Les inhibiteurs des phosphodiésterases (PDE) augmentent les taux d'AMPC intracellulaire, augmentant ainsi l'inotropisme myocardique et diminuant les résistances vasculaires systémiques par vasodilatation périphérique. Ils ont montré également un effet anti-inflammatoire, certainement par le même mécanisme. La Milrinone (Corotrope®), un inhibiteur spécifique de la PDE-III, réduit la production d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  et peut augmenter la perfusion gastro-intestinale et réduire l'endotoxémie lorsqu'il est administré aux patients bénéficiant d'une chirurgie de PAC sous CEC [137, 138].

#### *f) Les autres agents pharmacologiques*

Le nitroprussiate de sodium, un donneur de NO, a été étudié comme un potentiel agent anti-inflammatoire. Les mécanismes sous-jacents ne sont pas bien clairs mais il semble réduire l'activation du complément et diminuer les taux de certaines cytokines pro-inflammatoires [139]. L'héparine et d'autres glycosaminoglycanes peuvent aussi présenter des effets anti-inflammatoires en plus de leurs propriétés anticoagulantes. Cependant, la nature ubiquitaire

de leur utilisation en CEC rend difficile à l'évaluation de leurs rôles exacts. D'autres substances pharmacologiques telles que la dopexamine, un antagoniste H<sub>2</sub>, et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion ont, dans certaines occasions, démontré un potentiel anti-inflammatoire et demeurent en évaluation [68, 140]. La morphine semble supprimer plusieurs composés de la réponse inflammatoire à la CEC comparée à d'autres analgésiques opioïdes [140]. Enfin une nouvelle molécule dénommée sCR1sLe<sup>X</sup>, qui inhibe l'activation du complément et l'adhésion leucocytaire à l'endothélium, a été étudiée comme une voie thérapeutique potentielle de réduction des lésions d'I/R [141], mais pour l'instant la plupart des tests sont réalisés sur des modèles animaux.

## 2. Les stratégies techniques

### a) Les circuits pré-héparinés

L'idée d'envelopper les surfaces artificielles du circuit de CEC par de l'héparine a été initialement suggérée à la fin des années 1960 [142], principalement en raison de ses propriétés anti-thrombotiques [143]. Depuis lors, il a été prouvé que cette stratégie améliorait la biocompatibilité, incluant l'inhibition du système contact, du complément et de l'activation des neutrophiles [144, 145], la réduction du relargage de cytokines pro-inflammatoires [146], et l'amélioration de la fonction plaquettaire [147]. De plus, ce type de circuit adsorbe les lipoprotéines, créant ainsi une surface qui mime les membranes cellulaires. De nombreux travaux ont été réalisés pour évaluer les bénéfices potentiels de l'utilisation de circuits pré-héparinés, mais des controverses demeurent. Le circuit pré-hépariné a permis de réduire : le recours aux transfusions [148], les lésions pulmonaires [149], les dysfonctions neurocognitives [150] et les marqueurs d'atteintes myocardiques [151] chez les patients sous CEC. Un essai à grande échelle multicentrique a étudié les circuits pré-héparinés chez les patients à risque élevé bénéficiant d'une CEC et a montré une diminution des temps d'hospitalisation et de séjour en réanimation ainsi qu'une réduction des dysfonctions post-opératoires rénales et pulmonaires [152]. Cependant, selon les événements étudiés, d'autres études n'ont rapporté aucune différence entre les circuits pré-héparinés et les circuits standards [153, 154]. En 2007, Mangoush et coll. ont réalisé une méta-analyse sur 41 essais randomisés incluant 3 434 patients et ont trouvé des réductions significatives en termes de durée de ventilation, d'incidence de transfusion postopératoire,

de taux de ré-intervention avec sternotomie, de durée de séjour en réanimation et de durée d'hospitalisation. Dans cette méta-analyse, les circuits pré-héparinés ne présentaient aucun effet sur les autres événements indésirables étudiés. Cependant, la plupart de ces effets positifs étaient marginaux et de signification clinique modeste. De plus, la majorité des essais réalisés dans cette aire était relativement de faible puissance pour explorer de façon adéquate les événements clés cliniquement pertinents, les groupes de patients inclus étaient hétérogènes, et nombre des circuits pré-héparinés étudiés était différent [155].

#### **b) La chirurgie sans support de circulation extracorporelle**

Enfin, l'une des stratégies pour réduire la réponse inflammatoire au cours de la CEC est de s'en passer totalement. Bien que cette hypothèse ne soit pas envisageable pour toutes les procédures à cause de la nécessité d'ouvrir les cavités cardiaques, la chirurgie de PAC sans support de circulation extracorporelle (*off-pump*) épargne des effets délétères de la CEC et de la cardioplégie. Cependant, au-delà de son efficacité, il existe de significatives controverses. Au cours de ces 10 dernières années, plusieurs essais randomisés contrôlés et méta-analyses ont rapporté que la chirurgie *off-pump* réduisait les recours à la transfusion, les lésions myocardiques, les complications neurologiques, la durée de séjour hospitalier ainsi que les coûts associés [156-161]. Ces bénéfices ont conduit de nombreux centres hospitaliers à travers le monde à réaliser la chirurgie *off-pump* en pratique standard [42]. Néanmoins, ces bénéfices aux patients sont-ils le résultat de la diminution de l'inflammation ou existent-ils d'autres facteurs confondants ? Raja et Berg [162] ont révisé 19 essais contrôlés randomisés étudiant l'impact de la chirurgie *off-pump* sur tous les aspects de l'inflammation. De façon indiscutable, les taux de stress oxydant [163], de relargage de cytokines [164, 165] et du complément [164, 166], de neutrophiles [167] et de l'activation endothéliale [168] étaient significativement plus faibles dans la chirurgie *off-pump* comparés aux PAC sous CEC. Cependant, seuls 5 des essais inclus ont tenté de corrélérer cette diminution des marqueurs de l'inflammation avec une évolution clinique plus favorable, mais ces essais n'étaient pas assez puissants et excluaient les patients à haut risque.

## **F. Conclusion**

Malgré les progrès des interventions en chirurgie cardiovasculaire, la chirurgie *off-pump*, la chirurgie robotique et l'amélioration des traitements médicaux, la CEC demeure

indispensable dans plusieurs procédures. La nature plurifactorielle interdépendante de la réponse inflammatoire systémique à la CEC suggère qu'une seule intervention pharmacologique ou technique n'est pas suffisante pour inhiber ou prévenir les complications cliniques auxquelles elle est associée. La plupart de ces interventions partagent des caractéristiques communes : bien qu'elles inhibent les facteurs de l'inflammation, les bénéfices cliniques réels pour les patients demeurent difficiles à montrer, et elles présentent toutes le risque de survenue d'effets indésirables. De plus, comme déjà évoqué (53), des études cliniques portant sur un même type d'intervention ont parfois abouti à des résultats contradictoires. Ceci peut s'expliquer par l'hétérogénéité des patients (à la fois entre les études et au sein de chaque étude) mais cela suggère aussi des variations possibles parmi les différents patients dans leur réponse à la CEC. Enfin, la plupart de ces interventions a été étudiée isolément, et il se peut que pour être véritablement efficace, des méthodes associant des stratégies pharmacologiques et mécaniques soient nécessaires pour inhiber les différentes voies de signalisation par lesquelles la réponse inflammatoire est déclenchée et propagée. Il ne s'agit pas simplement d'une simple réflexion sur la morbidité préopératoire, des travaux plus poussés sont donc nécessaires pour établir les méthodes d'identification des patients les plus à risque. Les progrès dans la découverte de nouveaux biomarqueurs permettront l'élaboration de nouvelles méthodes diagnostiques de prédiction de risque et de dépistage des patients susceptibles de développer des complications postopératoires.

### **III. LES COMPLICATIONS POST-OPERATOIRES CARDIAQUES ET RENALES**

#### **A. Généralités**

La chirurgie cardiaque reste une intervention associée à de nombreuses complications, et ce malgré les progrès techniques et scientifiques et la mise en place de stratégies de réduction des effets pro-inflammatoires de la CEC. En termes de mortalité, celle-ci est en moyenne de 2% pour les PAC, de 3 à 7% pour les remplacements valvulaires (RV), et de 5 à 11% pour les chirurgies combinées (PAC et RV) [169]. Malgré le faible taux de mortalité, la prise en charge de cas de plus en plus sévères, les multiples comorbidités ainsi que la complexité croissante des procédures chirurgicales sont à l'origine d'une augmentation du taux des complications postopératoires, dont les atteintes cardiaques et rénales sont parmi les plus fréquentes. Les origines de ces complications sont plurifactorielles et certains facteurs étiologiques sont déjà présents avant l'intervention. Grâce à l'accumulation de connaissances sur la pathogenèse de ces complications, de nombreux travaux se sont intéressés à développer des mesures thérapeutiques prophylactiques visant à prévenir leur survenue.

#### **B. Les complications myocardiques**

##### **1. Epidémiologie**

La chirurgie cardiaque associée ou non à la CEC porte transitoirement atteinte à la fonction myocardique. Les dysfonctions se présentent sous différentes formes et leur sévérité sera fonction de la performance myocardique préopératoire ainsi que des caractéristiques mêmes de l'intervention chirurgicale. Dès les années 1990, environ 10% des patients ayant bénéficié de PAC avaient développé une dysfonction ventriculaire gauche au cours des phases postopératoires à court et moyen terme [170-172]. L'incidence des fibrillations atriales postopératoires est en moyenne de 25 à 40% lors de PAC et peut atteindre 69% dans les cas de chirurgie combinée (PAC et RV) [173]. Enfin, l'incidence des infarctus myocardiques est en moyenne de 2,4 à 3,4%. Dans ce dernier cas, la mortalité s'élève jusqu'à 15% [169].

##### **2. Physiopathologie**

Outre le traumatisme chirurgical, la CEC et le clampage aortique constituent les déclencheurs majeurs de la lésion myocardique. Comme nous l'avons déjà évoqué la CEC

provoque une puissante réponse inflammatoire systémique, induite par l'exposition des éléments du sang à des surfaces non-physiologiques, aboutissant entre-autres à des atteintes myocardiques. De plus, en excluant le myocarde de la circulation systémique, la CEC participe à l'instauration d'une ischémie et, dès la reperfusion, une dysfonction myocardique post-ischémique peut survenir. Les deux mécanismes centraux dans la pathogenèse des lésions ischémiques myocardiques sont la déplétion des réserves d'ATP et la perturbation de l'homéostasie calcique intracellulaire [174] (voir chapitre précédent, Figure 7). Suite à cette période d'ischémie myocardique, dont la durée est variable, la reperfusion peut conduire à son tour à des lésions supplémentaires, au-delà de celles générées par la période ischémique. Ces lésions de reperfusion peuvent se manifester sous forme d'arythmies, de dysfonctions contractiles réversibles (sidération myocardique), de dysfonctions endothéliales et *in fine* conduire à des lésions irréversibles avec mort cellulaire des cardiomyocytes [56]. Les atteintes de la cellule peuvent s'étendre jusqu'aux mitochondries, dont le degré d'ouverture du pore de transition membranaire mitochondrial (mPTP) peut être perturbé [175, 176]. Par conséquent, la prévention et le traitement de l'ischémie myocardique liée à la CEC ne doivent pas seulement se pencher vers la diminution de la consommation énergétique et la protection cellulaire au cours de la période d'ischémie mais doivent aussi inclure des mesures pour prévenir l'extension des lésions de reperfusion.

### 3. Les stratégies thérapeutiques de cardioprotection au cours de la CEC

#### a) Préparation du myocarde à la CEC

Ce concept universellement accepté repose sur l'idée de préparer le myocarde le mieux possible vis-à-vis de la période d'ischémie myocardique au cours du clampage aortique. Pendant des années, diverses stratégies ont été explorées, parmi celles-ci certaines semblent très logiques et simples à mettre en œuvre telles que le maintien d'une stabilité hémodynamique, en évitant les tachycardies et les hypo- ou hypertensions.

#### b) Modulation de la réponse inflammatoire

Comme nous l'avons déjà décrit précédemment, l'utilisation de la CEC est associée à l'induction d'une réponse inflammatoire systémique, qui peut aboutir à des atteintes et à des dysfonctions, non seulement au niveau cardiaque mais également sur l'ensemble des autres organes. Pendant des années, plusieurs stratégies ont été envisagées dans le but de moduler et de réduire les effets délétères de la réponse inflammatoire (voir chapitre

précédent). Celles-ci incluent entre autres des interventions pharmacologiques, une meilleure conception des composants du circuit extracorporel et celle de circuits de CEC miniaturisés [177-180].

### *c) Modulation de la consommation d'oxygène par le myocarde*

Une des approches traditionnelles pour minimiser la dysfonction myocardique après la CEC repose sur la modulation des facteurs affectant sa consommation énergétique. Les déterminants de la consommation en oxygène du myocarde sont déjà bien identifiés [181].

La première étape de protection vis-à-vis de l'ischémie myocardique au cours de la CEC passe par la réduction des 3 principaux déterminants de l'utilisation de l'oxygène du cœur : la fréquence cardiaque, la contractilité et le développement de la tension intramyocardique. Un cœur dont les cavités sont vides et au repos (non-fibrillant), facilite non seulement la procédure chirurgicale mais réduit également la consommation d'oxygène myocardique à l'état basal. Dès la fin des années 1970, il fut déjà démontré que l'arrêt cardiaque hypothermique réduisait la demande en oxygène myocardique de 90% [182], ce qui peut être rapidement obtenu par l'administration de solutions de cardioplégie. Les premières décennies de recherche se sont intéressées à la mise au point de la composition exacte des solutions afin de correspondre aux critères optimaux suivants : induire un arrêt métabolique rapide et maintenir un environnement favorable sans induire de toxicité cellulaire, prévenir les œdèmes interstitiels et intracellulaires, restreindre la perte de métabolites cellulaires, maintenir une balance acide-base appropriée, fournir le myocarde en substrats métaboliques, principalement en l'oxygène et en glucose mais aussi en d'autres composés. De nombreuses études ont été publiées, comparant différentes compositions de solutions cardioplégiques et/ou incluant l'addition de différents substrats métaboliques, d'agents piègeurs, de mannitol, etc. [183-185] . L'utilisation de cardioplégie au sang (CP1B ou liquide de Fabiani) a également été évaluée dans le but de réduire davantage les atteintes post-ischémiques. Enfin, diverses techniques d'administration (unique vs. intermittente vs. continue ; antérograde vs. rétrograde ou combinée) ont été évaluées [185, 186].

Malgré tous ces progrès, les dysfonctions myocardiques ischémiques post-CEC continuent à apparaître, soulignant ainsi la complexité des phénomènes régissant ces complications qui ne peuvent être simplement prévenues par la modulation du métabolisme myocardique ou par l'adaptation de la composition des solutions cardioplégiques.



## d) *Le conditionnement du myocarde*

### Principes de base

Au cours des précédentes décennies, il est apparu de plus en plus évident que les atteintes cellulaires les plus importantes apparaissaient lors de la reperfusion post-ischémique. L'étendue des lésions d'I/R semble être modulée par un mécanisme de défense intrinsèque qui conditionne l'organe. En 1986, Murry et coll. ont réalisé, sur des modèles *in vivo* de chien, des cycles de 4 occlusions de 5 minutes de l'artère coronaire circonflexe, chacune séparée par 5 minutes de reperfusion, et suivies par 40 minutes d'occlusion : ils observaient que cette méthode était associée à une diminution de 25% de la taille de l'infarctus par rapport à ce qui était observé dans le groupe témoin sur lequel seule une occlusion de 40 minutes avait été opérée [187]. Ce phénomène a été nommé « préconditionnement ischémique ». Cette étude a constitué un point de départ d'une recherche approfondie, aussi bien expérimentale que clinique, dans le but de mettre en évidence les mécanismes sous-jacents ainsi que sa potentielle pertinence clinique.

C'est seulement en 2003 que Zhao et coll. ont introduit le concept de « post-conditionnement ischémique ». Sur un modèle de chien à cœur ouvert, 3 cycles de 30 secondes de ré-occlusions ont été appliqués au début de la reperfusion après 60 minutes d'occlusion de l'artère coronaire interventriculaire antérieure [188]. Comparé au groupe contrôle sans ré-occlusion, une réduction de la taille de la zone infarctée était observée de façon similaire à celle du préconditionnement ischémique. Ce mécanisme protecteur a depuis été largement étudié dans le but de déterminer à la fois les voies de signalisation impliquées et ses éventuelles applications chez l'Homme.

Ce concept de cardioprotection endogène a été raffiné par la suite, notamment par l'observation surprenante qu'il était possible d'obtenir un niveau de cardioprotection similaire en appliquant de brefs épisodes d'ischémie non-létale et de reperfusion sur un autre organe ou tissu, à distance du cœur. Le muscle squelettique s'est révélé être le site à distance le plus approprié pour la génération d'une telle cardioprotection. Dans les études expérimentales, il a été démontré que l'application d'un stimulus ischémique au muscle squelettique à la fois avant (préconditionnement ischémique à distance) et immédiatement après (post-conditionnement ischémique à distance) l'ischémie myocardique pouvait induire des effets cardioprotecteurs [189, 190].

Les mécanismes sous-jacents impliqués dans les pré- et post-conditionnements ischémiques ont été le sujet d'intenses recherches ces dernières années.

### **Application clinique du conditionnement en chirurgie cardiaque**

#### **❖ *Le conditionnement ischémique***

Le concept de conditionnement ischémique, initialement décrit chez l'animal, a été mis en application dans un contexte clinique, mais son usage dans le domaine de la chirurgie cardiaque est limité seulement à un petit nombre d'études. Bien que les protocoles de préconditionnement [191-193] et post-conditionnement ischémiques [194] aient été associés à de moindres atteintes myocardiques et à de meilleures évolutions après la chirurgie, ces protocoles n'ont pas été introduits en pratique clinique de routine. Cela est probablement lié au fait qu'aucun clinicien n'est encore prêt à faire subir un « fardeau ischémique » supplémentaire à un organe qui a spécifiquement besoin d'être traité pour une ischémie. A noter qu'une étude a rapporté que la CEC elle-même peut être à l'origine de l'activation d'une des voies impliquées dans les mécanismes protecteurs du préconditionnement ischémique [195]. Cependant, cette observation non plus n'a pas été traduite en stratégie clinique.

Au-delà du conditionnement ischémique direct, le concept de conditionnement ischémique à distance peut constituer une stratégie de protection séduisante dans la réduction de l'étendue des lésions d'I/R dans le contexte de la chirurgie cardiaque. Plusieurs études ont montré qu'un tel protocole était associé à une moindre libération de cTn T [196, 197], mais toutes les études ne concluent pas à un effet protecteur de manière univoque [198]. Ce concept demeure cependant intéressant, et des essais cliniques sont en cours dans l'objectif d'identifier clairement les effets des protocoles de pré- et de post-conditionnement ischémiques à distance sur l'évolution postopératoire après chirurgie cardiaque [199].

#### **❖ *Le conditionnement pharmacologique***

Bien que plusieurs études aient indiqué que le conditionnement ischémique pouvait conférer des effets cardioprotecteurs pertinents, son utilisation à large échelle en clinique est entravée par le simple fait qu'il peut être hasardeux d'appliquer des lésions ischémiques supplémentaires à un organe déjà en péril.

L'alternative est donc de mimer les effets du conditionnement ischémique en utilisant des agents pharmacologiques qui modulent une ou plusieurs des différentes étapes impliquées dans le pré- et le post-conditionnement. Pendant des années, divers composés pharmacologiques ont été testés, afin soit d'inhiber soit d'activer les différentes voies impliquées dans le conditionnement ischémique, telles que : les agonistes des récepteurs de l'adénosine, les agents d'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants, les activateurs des protéines kinases dont la protéine kinase C, les protéines kinases activées par les mitogènes p38 et les tyrosine-kinases, et les piègeurs de RLO. Cependant, à l'exception du nicorandil, activateur des canaux potassiques ATP-dépendants [200, 201], aucun des autres composés n'est entré dans les pratiques cliniques jusqu'à présent, soit à cause de l'apparition d'effets indésirables importants, soit à cause d'un défaut de bénéfices cliniques.

#### ❖ *Le conditionnement anesthésique*

Dans l'environnement expérimental en laboratoire, il a été largement démontré que les anesthésiques volatils possèdent à la fois des effets de pré- et de post-conditionnement et qu'ils sont capables de réduire de façon substantielle les effets délétères des lésions myocardiques d'I/R. De nombreux articles expérimentaux ont depuis été publiés, caractérisant ce phénomène de cardioprotection anesthésique et ses mécanismes sous-jacents. Il devient évident que de nombreuses voies de signalisation sont communes aux pré- et post-conditionnement ischémique et par les anesthésiques [175, 202-206].

#### *Le préconditionnement anesthésique*

L'application d'un protocole de préconditionnement anesthésique conduit à des résultats mitigés ; certaines études montrant des effets protecteurs importants avec moins d'atteintes myocardiques et une meilleure préservation myocardique post-CEC, alors que d'autres études ne confirment pas ces effets [204, 206]. Il semble en outre que les propriétés cardioprotectrices d'un protocole de préconditionnement anesthésique, qui semble très simple dans un contexte expérimental, soient moins évidentes lorsqu'elles doivent être appliquées dans le contexte clinique de la chirurgie cardiaque.

Nader et coll. ont administré un mélange de cardioplégie additionné de 2% de sévoflurane et d'oxygène chez des patients en chirurgie coronaire et ont observé une diminution de la réponse inflammatoire après la CEC, accompagnée d'une meilleure fonction ventriculaire

gauche et de taux postopératoires de cTnI plus faibles [207, 208]. Kortekaas et coll. ont observé, chez les patients opérés pour remplacement de la valve mitrale, que l'administration sélective de sévoflurane au niveau myocardique au cours du clampage aortique atténuait de façon plus puissante la réponse inflammatoire par rapport à une administration systémique, sans réduction cependant des marqueurs postopératoires d'atteintes cellulaires myocardiques [209]. De façon similaire, la perfusion de sufentanil dans la crosse aortique, 5 minutes avant le déclampage aortique, atténue les lésions d'I/R myocardiques chez ces patients [210]. Xia et coll. ont rapporté qu'une dose élevée de propofol au cours de la CEC était associée à un effet cardioprotecteur. Dans le groupe ayant reçu du propofol à doses élevées, les cTnI étaient plus basses 24 heures après la CEC et l'index cardiaque moyen était plus haut par rapport aux 2 autres groupes [211]. Les effets bénéfiques potentiels de l'addition de propofol lorsqu'il est administré au cours du clampage aortique sont actuellement étudiés et des données ultérieures pourront aider à identifier le rôle exact de cette substance dans la modulation de l'extension des lésions d'I/R après CEC [212].

#### ***Le post-conditionnement anesthésique***

Les données cliniques sur les effets potentiellement cardioprotecteurs des agents anesthésiques volatiles administrés au cours de la période de reperfusion sont peu abondantes. Dans une étude chez les patients en chirurgie des coronaires, De Hert et coll. ont observé que l'administration de sévoflurane (0,5-1 MAC) lors de la phase précoce de la reperfusion et jusqu'à la fin de l'opération ne réduisait pas significativement les taux postopératoires de cTnI circulantes. Cependant, la récupération de la fonction ventriculaire après CEC apparaissait plus précocement dans le groupe post-conditionnement au sévoflurane par rapport au groupe témoin [213]. Huang et coll. ont observé qu'une combinaison de préconditionnement à l'isoflurane et de post-conditionnement au propofol diminuait les taux circulants postopératoires de CKMB et de cTnI et facilitait la récupération fonctionnelle myocardique postopératoire comparée à celle du groupe témoin anesthésié au fentanyl et midazolam [214].

L'absence d'un effet protecteur clinique indiscutable dans les protocoles de pré- et post-conditionnement pose la question de l'importance et du choix du traitement anesthésique pour améliorer la fonction cardiaque et l'évolution postopératoires.

Cette question a été posée initialement par De Hert et coll. qui ont comparé les effets du sévoflurane et du propofol sur la fonction cardiaque pendant et après la chirurgie coronaire [215]. Avant la CEC, toutes les variables hémodynamiques étaient comparables entre les 2 groupes. Après la CEC, les patients ayant reçu un traitement par anesthésique volatil avaient préservé leur performance cardiaque, reflétée par un volume de remplissage et un dP/dtmax préservés, et par le maintien de la régulation de la fonction myocardique. De plus, le recours à un support inotrope dans la période postopératoire précoce était significativement moindre avec les anesthésiques volatiles, et les concentrations plasmatiques postopératoires des cTnI étaient beaucoup plus basses par rapport à celles des patients ayant reçu un traitement anesthésique IV général.

Bien que la majorité des observations cliniques indique que le protocole par anesthésique volatile tout au long de la procédure confère une protection myocardique au cours de la chirurgie coronaire, l'impact de ce phénomène sur la morbidité postopératoire et la récupération clinique reste à établir.

Les données de suivi à long terme après chirurgie cardiaque et l'influence possible du choix de protocole anesthésique sont rares. Dans une étude de suivi d'un essai randomisé sur des patients en chirurgie coronaire comparant un protocole de préconditionnement au sévoflurane à un protocole d'anesthésie générale [216], Garcia et coll. ont observé une incidence de nouveaux événements cardiovasculaires significativement plus faibles [217]. Les auteurs ont émis l'hypothèse que le préconditionnement au sévoflurane pouvait directement modifier l'interaction plaquettes-neutrophiles-endothélium en perturbant la synthèse d'une variété de protéines protectrices et anti-protectrices et par la même de prévenir le développement d'une dysfonction endothéliale coronaire. Une étude multicentrique a observé une mortalité à 1 an plus faible chez les patients en chirurgie coronaire traités avec un protocole d'anesthésique volatile comparé à ceux traités par anesthésie générale [218].

Cependant, toutes les études n'arrivent pas à la même conclusion [219-221] et il semble qu'actuellement l'issue des lésions d'I/R représente un phénomène bien trop complexe pour être la cible d'une seule intervention telle que le choix du protocole anesthésique.

### e) *Le Glucose-Insuline-Potassium*

Le « glucose-insuline-potassium » ou GIK est le premier cocktail métabolique utilisé en 1962 dans le traitement de l'infarctus du myocarde [222]. Dans ce traitement, l'insuline agit bien plus qu'une simple hormone. En effet, l'insuline est impliquée comme médiateur-clé de la survie cellulaire aussi bien au niveau des cellules endothéliales que des cardiomyocytes. La stratégie combinant insuline et apport de glucose vise à maximaliser le flux glycolytique myocardique, pour augmenter la synthèse d'ATP capable de maintenir en activité les pompes membranaires et protéger ainsi les cellules. Le bénéfice théorique du GIK se situe à la fois :

- Avant l'ischémie, par préservation/reformation du stock de glycogène ;
- Durant l'ischémie, avec production d'ATP par la glycolyse anaérobie ;
- En phase de reperfusion, grâce à l'utilisation du glucose, à l'anaplérose des intermédiaires du cycle de Krebs et à l'inhibition du métabolisme toxique des acides gras libres circulants [223].

En effet, l'utilisation préférentielle du glucose durant l'ischémie limitera les effets toxiques des dérivés oxydés des lipides, tout en augmentant la production d'ATP pour une moindre consommation d'oxygène, protégeant ainsi le myocarde ischémique ou décompensé.

En chirurgie cardiaque, l'utilisation de GIK a permis de démontrer un bénéfice clinique en termes de récupération fonctionnelle post-opératoire avec amélioration des paramètres hémodynamiques (index cardiaque, index de charge de travail ventriculaires) [224], une diminution des incidences de bas débit [223] et un effet anti-arythmique avec diminution de l'incidence de fibrillation atriale [225]. Une méta-analyse incluant 33 études randomisées portant sur l'utilisation de GIK chez les patients en chirurgie cardiaque (PAC et/ou RV) a démontré que le GIK présentait les bénéfices suivants [226] :

- Infarctus peropératoire plus faible de 37% ;
- Réduction des agents inotropes de 34% ;
- Amélioration de l'index cardiaque ;
- Taux d'incidence de fibrillation atriale identiques sauf dans les études incluant des diabétiques où ce taux est diminué ;
- Séjour en réanimation plus court.

Cette méta-analyse n'a cependant pas mis en évidence de différence en termes de mortalité. Cette absence d'effet de l'utilisation de GIK sur la mortalité fut également retrouvée lors d'une autre méta-analyse qui avait inclut 20 essais randomisés portant uniquement sur l'administration de GIK chez les patients candidats à une chirurgie pour PAC [227]. L'une des raisons pouvant expliquer ces résultats mitigés est probablement l'hétérogénéité des protocoles de perfusion utilisés par les différentes équipes. Avant de pouvoir conclure sur la présence ou l'absence d'effet du GIK sur la mortalité, il sera nécessaire de s'accorder sur un protocole d'administration unique ainsi qu'une composition identique de la solution. Récemment, des études expérimentales et cliniques se sont focalisées sur l'effet du GIK dans les voies de cardioprotection nouvellement découvertes [223, 228]. Les conclusions de ces études pourront permettre de construire à l'avenir un protocole de perfusion de GIK plus rationnel, basé sur des mécanismes pharmacologiques bien définis, mais pourront également participer à l'élaboration de nouvelles alternatives thérapeutiques.

## C. Les complications rénales

### 1. Épidémiologie

Globalement, les atteintes rénales concernent entre 4 et 40% des patients selon le type de chirurgie cardiaque [229]. La détérioration postopératoire de la fonction rénale a été décrite comme étant un important prédicteur de morbidité et de mortalité [230]. Parmi ces atteintes, l'insuffisance rénale aiguë (IRA) associée à la chirurgie cardiaque (IRA-ACC) est une complication post-opératoire grave et fréquente de la chirurgie cardiaque employant la CEC, et il s'agit de la seconde cause d'IRA dans les services de réanimation et soins intensifs [231]. La définition d'IRA utilisée par les investigateurs influence non seulement l'incidence de l'IRA-ACC décrite, mais également l'identification des variables de risques [232]. Le manque d'uniformité et de consensus dans la définition de l'IRA a compliqué la recherche dans ce domaine et rend difficile l'interprétation des résultats. Ces dernières années, les études épidémiologiques d'IRA-ACC ont été basées sur un nouveau système de diagnostic consensuel : Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage Renal Disease (RIFLE) et Acute Kidney Injury Network (AKIN). Du fait de la différence dans les caractéristiques initiales des patients et du type de chirurgie, l'intervalle de l'incidence se situe entre 8,9 et 39% [233-236] selon que l'on se base sur les critères du RIFLE ou de l'AKIN. La chirurgie pour PAC seule possède la plus

faible incidence d'apparition d'IRA, suivie de la chirurgie de RV et de la chirurgie combinée PAC et RV [237]. Le développement de l'IRA-ACC aboutit à un traitement de remplacement rénal dans 1 à 5% des cas [238]. Les investigateurs ont étudié la précision ou l'exactitude des 2 définitions dans le diagnostic de l'IRA-ACC, et ont démontré que l'AKIN, appliqué aux patients en chirurgie cardiaque sans aucune correction de la créatininémie par la balance liquidienne, aboutit à un sur-diagnostic d'IRA (valeur prédictive positive faible). En comparant les limites des 2 définitions de l'IRA, l'application des critères du RIFLE chez les patients bénéficiant de chirurgie cardiaque est préférable [235].

L'IRA est un facteur indépendant de mortalité après chirurgie cardiaque [233, 239]. Les critères de l'AKIN et du RIFLE constituent ainsi des prédicteurs précoces précis de mortalité [235, 236]. En appliquant les critères de l'AKIN et du RIFLE, le taux de mortalité (à la sortie de l'hôpital ou à 30 jours) s'échelonne entre 3,8 et 54,4% chez les patients ayant développé une IRA-ACC, et augmente progressivement avec le degré d'atteinte rénale. Des études relativement récentes ont décrit qu'une élévation, même modérée, de la créatininémie suite à la chirurgie cardiaque est associée à des effets significatifs sur la mortalité [239, 240]. De plus, la survie à long terme est significativement différente en fonction de la durée de l'IRA [241], et une récupération rapide de la fonction rénale est associée à une amélioration de la survie après IRA-ACC [242].

## 2. **Physiopathologie de l'IRA-ACC**

L'IRA-ACC est caractérisée par une détérioration brutale de la fonction rénale suite à une chirurgie cardiaque, mise en évidence par une réduction du débit de filtration glomérulaire (DFG). La pathogenèse de l'IRA-ACC est complexe et dépendante de nombreux facteurs. Ceux-ci incluent les multiples mécanismes mis en jeu au cours de la CEC : les phénomènes inflammatoires, le stress oxydant, l'I/R, l'endotoxémie ainsi que l'état hémodynamique du patient [243] (Figure 9). Les facteurs de risque associés au développement de l'IRA-ACC ont été largement étudiés, validés et bien établis. Les facteurs de risque préopératoires incluent l'âge, le sexe féminin, une faible fonction VG ou une IC congestive, un diabète, une bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), des urgences chirurgicales et des taux plasmatiques élevés de créatinine [244].



Néanmoins, à l'instar des lésions cardiaques, le développement des atteintes rénales est le résultat d'une altération fonctionnelle préexistante souvent infraclinique (artériopathies périphériques, hypertension artérielle, sténose de l'artère rénale...) ou d'origine pharmacologique (produits de contraste iodés-PCI, médicaments néphrotoxiques) à l'origine d'une susceptibilité accrue du parenchyme rénal aux effets de la CEC [245].

A l'aide de la classification de l'insuffisance rénale chronique (IRC), certaines études ont démontré que le degré d'atteinte rénale augmentait proportionnellement avec le risque d'IRA-ACC et le recours à l'EER [246]. En situation préopératoire, la première précaution est d'évaluer la probabilité d'un risque d'IRA-ACC sur une IRC préexistante. Une autre précaution est de détecter les IRA silencieuses ou subcliniques précédant la chirurgie. Lorsque le cathétérisme (qui implique l'administration de PCI) et la chirurgie cardiaque surviennent lors de la même hospitalisation, il existe une augmentation du risque de développer une IRA post-opératoire. Ceci est probablement dû au temps nécessaire à la récupération des cellules rénales [247]. Egalement, au cours de la période peropératoire, le statut volumique des patients est d'importance. La baisse du débit cardiaque au cours des périodes per- et postopératoires constitue l'une des causes majeures de la survenue d'IRA. En effet, la baisse du débit cardiaque conduit à une hyperactivité réflexe du système nerveux autonome sympathique ainsi qu'à une activation réflexe du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), augmentant ainsi la vasoconstriction rénale [243].

De manière plus controversée mais potentiellement importante, les facteurs de risque modifiables sont spécialement ceux liés à la performance de la CEC : technique CEC contre technique *off-pump*, régime pulsatile contre non-pulsatile, CEC en normothermie contre hypothermie, l'hémodilution et la durée de la CEC [248].

# Inflammation in CPB

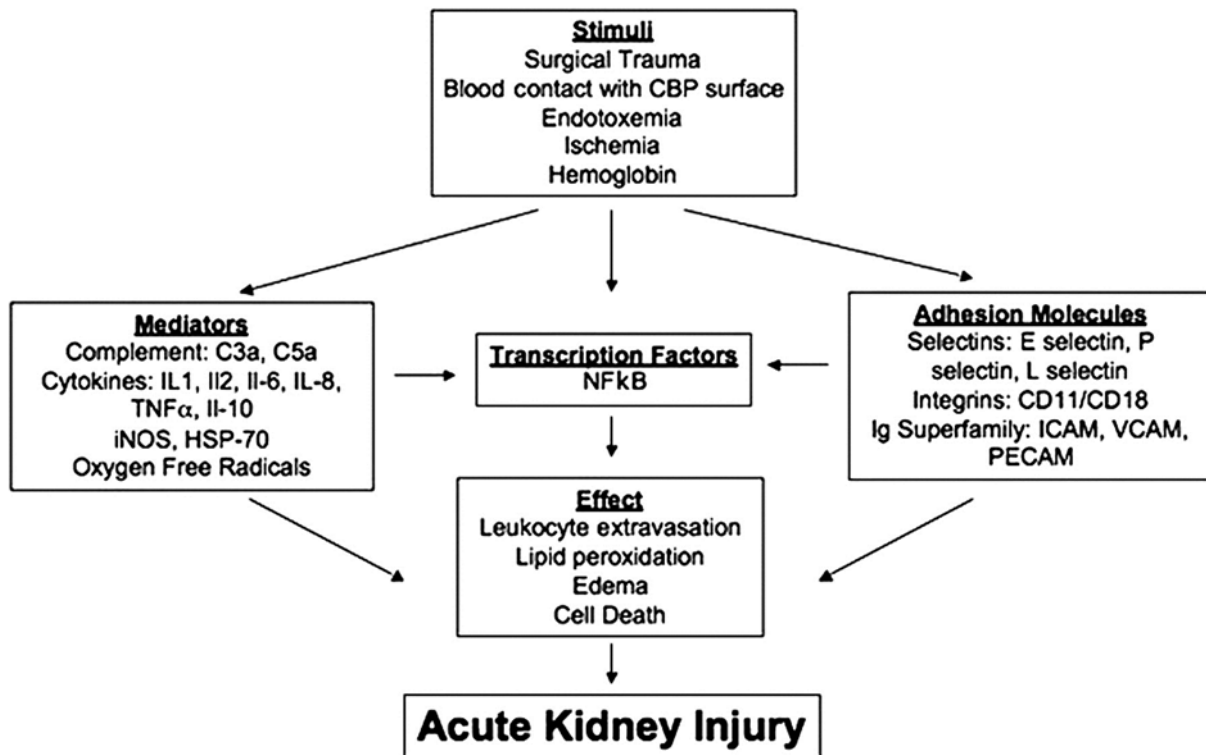


Figure 9. Mécanismes physiopathologiques de l'IRA au cours de la CEC (Tiré de Mitchell H. Rosner, et Mark D. Okusa. *Acute Kidney Injury Associated with Cardiac Surgery. Clin J Am Soc Nephrol, 2006*) [249]

### 3. Stratégies de néphroprotection au cours de la chirurgie cardiaque associée à la CEC

Plusieurs molécules ont été évaluées afin d'apprécier leurs effets néphroprotecteurs chez les patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque, mais les résultats restent contradictoires. De plus, les données de certaines molécules incluant le furosémide et la dopamine suggèrent même des effets nocifs.

#### a) Les IEC et les ARA-II

Il est habituel chez les patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque de recevoir un traitement au long cours comprenant un inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) et/ou un inhibiteur des récepteurs à l'angiotensine 2 (ARA-2). Certaines études ont montré que l'administration préopératoire d'IEC/ARA-2 était associée avec un risque plus élevé d'IRA postopératoires et que leur arrêt avant la chirurgie pouvait réduire l'incidence de l'IRA [250]. Cependant, d'autres études ont montré que l'administration préopératoire d'IEC réduit, ou tout du moins n'augmente pas, l'incidence d'IRA post-opératoire [251].

### *b) Le bicarbonate de sodium*

L'alcalinisation urinaire peut protéger des atteintes rénales induites par le stress oxydant, les phénomènes oxydatifs impliquant le fer, l'activation du complément, et des néphropathies pigmentaires induites par l'hémoglobine ou la formation d'amas hémoglobiniques tubulaires [252]. Haase et coll. [253] ont montré que le traitement par bicarbonate de sodium était associé à une réduction absolue de l'IRA de l'ordre de 20% et à une atténuation significative de l'augmentation postopératoire de l'urée plasmatique, du NGAL urinaire et du ratio des taux urinaires NGAL /créatinine. Cependant, une autre étude prospective observationnelle sur une plus large population de patients en chirurgie cardiaque concluait que l'administration en routine de bicarbonate n'améliorait pas la fonction rénale post-opératoire [254]. Compte tenu de l'innocuité du bicarbonate de sodium, de sa facilité d'administration et de son faible coût, il serait raisonnable de s'y intéresser comme une mesure prophylactique pour les patients à haut risque d'IRA-ACC.

### *c) Les statines*

En plus de leurs propriétés hypolipémiantes, les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase ou statines, possèdent des effets pléiotropes, antioxydants et anti-inflammatoires, qui leur confèrent des propriétés protectrices vis-à-vis de l'IRA-ACC. Certaines études ont découvert que l'utilisation de statines était associée à une récupération plus rapide des lésions rénales après chirurgie vasculaire et améliorait les événements à long-terme [255]. De plus, l'utilisation précoce de statines en postopératoire a été associée à une incidence plus faible de l'IRA [256]. Cependant, d'autres investigations incluant de plus larges cohortes ou certains essais randomisés contrôlés en double aveugle n'ont pas réussi à faire valider le traitement par statine en tant que moyen de réduction de l'incidence de l'IRA-ACC, d'épuration extra-rénale (EER) ou de mortalité hospitalière [257, 258].

### *d) Le fenoldopam*

Le fenoldopam, un dérivé de benzazépine, a été le premier agoniste sélectif des récepteurs D1 de la dopamine autorisé pour un usage hospitalier (non commercialisé en France). Le fenoldopam provoque la relaxation des muscles lisses, la vasodilatation et l'inhibition de la réabsorption tubulaire de sodium par le rein. On pourrait s'attendre à un effet néphroprotecteur grâce à ses effets natriurétiques et vasodilatateurs sélectifs du niveau rénal. En administration IV, le fenoldopam augmente significativement le flux sanguin rénal et diminue les résistances périphériques chez les volontaires sains et les patients

hypertendus. Dans le contexte de la chirurgie cardiaque, le fenoldopam a montré des effets bénéfiques en terme de protection rénale lorsqu'il est administré pendant au moins 24 h à un débit supérieur à 0,1 mg/kg/min [259]. Récemment, une méta-analyse incluant un total de 440 patients issus de 6 essais randomisés contrôlés contre placebo a montré que le fenoldopam réduisait systématiquement et significativement le risque d'IRA. Cependant, il a été mis en évidence un taux élevé d'épisodes d'hypotension et/ou l'utilisation de vasopresseurs sans aucun impact sur le recours à l'EER, la survie ou sur la durée de séjour en réanimation ou hospitalier [260]. Il est important de noter que lors de l'utilisation de fenoldopam, un ajustement précis de dose est nécessaire afin de réduire des effets indésirables potentiels.

#### *e) Le mannitol*

Le mannitol, un diurétique osmotique, est largement utilisé dans le liquide d'amorçage en CEC afin de réduire l'incidence des dysfonctions rénales, mais les études sont loin d'être concluantes. Des patients présentant des taux préopératoires de créatininémie inférieures à 130  $\mu$ M ou entre 130 et 250  $\mu$ M ont été randomisés pour recevoir une dose de 0,5 g/kg de mannitol ou de son équivalent en volume de solution d'Hartmann dans le liquide d'amorçage de la pompe. Il n'apparaît aucune différence entre les groupes dans les taux de créatininémie par rapport aux taux initiaux, ni dans la diurèse, ni dans les protéines transporteuse du rétinol urinaire et ni de la microalbuminurie au cours de la période postopératoire précoce [261, 262]. Dans une étude récente sur le traitement de l'IRA par le mannitol, l'administration de cette substance augmentait le débit urinaire, le débit sanguin rénal et le ratio débit rénal/débit cardiaque, et diminuait les résistances vasculaires rénales. Le mannitol n'altérait pas la fraction de filtration, ni la balance consommation/besoin en oxygène [263]. Le mannitol est un fluide d'amorçage probablement non nocif utilisé en routine en chirurgie cardiaque, en cas de dysfonction rénale modérée ou non. Le rôle thérapeutique du mannitol vis-à-vis de l'IRA-ACC doit être encore étudié.

#### *f) Le Peptide Atrial Natriurétique (ANP) et le Brain Natriuretic Peptide (BNP)*

Le profil physiologique des peptides natriurétiques suggère que l'administration d'ANP ou de BNP pourrait jouer un rôle important dans la prévention ou le traitement de l'IRA-ACC. L'ANP et le BNP bloquent le SRAA et induisent une vasodilatation artérielle rénale, ce qui pourrait les rendre utiles pour favoriser la diurèse chez les patients en chirurgie cardiaque

avec surcharge volumique, et permettrait d'éviter l'utilisation de hautes doses de diurétiques tels que le furosémide. L'ANP et le BNP sont des hormones sécrétées principalement par le cœur. Les actions diurétiques et natriurétiques de l'ANP et du BNP s'exercent de manière directe au niveau vasculaire et tubulaire. L'ANP augmente la pression de filtration transcapsulaire glomérulaire ainsi que le débit sanguin dans les vasa recta médullaires. L'activité biologique de l'ANP endogène diminue au cours de la CEC. L'administration en continu de faibles doses d'ANP inhibe le SRAA, diminue les résistances vasculaires systémiques, et compense les effets indésirables de la CEC [264]. Quasiment toutes les études en lien avec le sujet ont montré un effet néphroprotecteur de l'ANP chez les patients en chirurgie cardiaque, avec augmentation de la clairance de la créatinine et du volume urinaire, et réduction de l'utilisation de diurétiques conventionnels, que la fonction rénale préopératoire soit normale ou altérée.

En administrant un analogue de BNP chez les patients sous CEC, les taux plasmatiques de GMPc sont augmentés tandis que les taux d'ANP diminuent. Dans le même temps, les élévations de taux de créatininémie et de Cystatine C (CyC) sont atténuées, la clairance de la créatinine maintenue, la diurèse augmentée et l'incidence de l'IRA diminuée [265]. Une méta-analyse a montré que l'administration d'analogue du BNP réduisait significativement la durée de séjour en réanimation et hospitalier, mais ne diminuait pas l'incidence de l'EER, ni la mortalité [266]. Dans une revue systématique, le BNP permet une réduction de 10% de l'incidence d'IRA [267]. L'innocuité ainsi que les bénéfices potentiels du nesiritide, l'un des analogue humain du BNP, chez les patients bénéficiant d'un PAC ont été documentés dans l'étude prospective randomisée NAPA [268]. Dans un autre essai prospectif randomisé chez des patients en chirurgie cardiaque à haut risque, le nesiritide ne prévenait pas le recours à la dialyse ou la mortalité toute-cause ; cependant, il existait une réduction de l'incidence d'IRA comparée aux contrôles [269].

#### *g) La N-acétylcystéine*

Lors de cathétérisme ou de chirurgie cardiaque, les patients sont souvent exposés aux produits de contraste qui sont impliqués dans l'incidence de l'IRA-ACC. Plusieurs études ont montré que la N-acétylcystéine (NAC) possédait des effets protecteurs vis-à-vis de l'IRA induite par les angioplasties coronaires percutanées (percutaneous coronary intervention, PCI) (IRA-PCI) lorsque l'administration avait lieu avant le déclenchement de l'agression rénale [270]. Un essai prospectif a conclu, chez des patients avec une IRC de stade III-IV

bénéficiant d'un cathétérisme cardiaque, que l'administration *per os* de NAC n'est pas plus efficace qu'une hydratation à l'aide de bicarbonate ou de du chlorure de sodium [271]. Une autre étude qui réalisait une comparaison randomisée de 2 stratégies préventives a montré que chez 320 patients présentant une IR et programmés pour un cathétérisme, la NAC n'avait pas d'influence sur la survenue de l'IRA-PCI dans le groupe bicarbonate de sodium et dans le groupe solution saline [272]. Une méta-analyse a conclu que la combinaison associant NAC et bicarbonate de sodium réduisait de façon substantielle l'occurrence d'IRA-PCI de 35% et qu'elle pourrait être fortement recommandée chez tous les patients à haut risque [273]. Bien que l'on se base sur des preuves existantes, le bénéfice total de la NAC n'est ni régulier, ni dominant. En 2012, Kidney Disease : Improving Global Outcomes (KDIGO) suggère l'utilisation de NAC *per os* avec administration IV de cristalloïdes isotoniques chez les patients à risque élevé d'IRA-PCI (grade 2D) [274]. Néanmoins, il n'existe pas de preuves solides pour démontrer qu'il existe un réel bénéfice de l'administration de NAC en prophylaxie pour prévenir l'IRA ou réduire la mortalité suite à la chirurgie cardiaque [275].

Dans l'ensemble, aucun agent seul n'a montré de capacité à prévenir l'IRA-ACC et aucune stratégie pharmacologique n'a démontré d'efficacité claire dans la prévention de l'IRA-ACC précoce [276]. Certaines des nouvelles molécules, telles que le nesiritide et le fenoldopam ont fait preuve de réelles capacités de néphroprotection mais il est encore nécessaire de réaliser des études de qualité avec une population large pour tester ces molécules seules ou en association, afin de détecter des différences cliniques pertinentes dans la survenue d'évènements ou de complications. Des études ultérieures s'intéressant à la prévention pharmacologique de l'IRA-ACC pourront utiliser des critères d'évaluation incluant le recours à l'EER, la durée d'hospitalisation et la mortalité.

#### **D. Conclusion**

La chirurgie cardiaque est source de multiples complications en périodes per- et postopératoires. Bien que de nombreuses solutions thérapeutiques préventives et/ou curatives soient mises à la disposition des cliniciens, il demeure que ces interventions ne peuvent être réellement efficaces que si des indices permettent de dépister et de stratifier avant l'intervention les patients à risque de développer telle ou telle complication. D'où la

nécessité de développer des modèles de prédiction dont l'objectif est d'adapter la prise en charge thérapeutique et l'intervention chirurgicale selon le profil de risque du patient.

## IV. Modèles de prédiction et biomarqueurs

### A. Score et stratification du risque

#### 1. Définition

En chirurgie cardiaque, les scores de risque ont pour objectifs de prédire la probabilité de survenue de complications post-opératoires à l'aide de variables disponibles avant le déclenchement de ces événements. Leur utilisation participe à l'optimisation de la prise en charge du patient et à l'évaluation des stratégies et performances thérapeutiques entre différents unités ou établissements de soins [277]. Le critère de jugement le plus utilisé par les différents scores de risque en chirurgie cardiaque est la mortalité (hospitalière ou à 30 jours) [278-280]. Il s'agit d'un critère de jugement robuste mais qui ne peut constituer seul l'objectif d'une prise en charge thérapeutique. En effet, tel que décrit plus haut, de nombreuses complications associées ou non à un risque de mortalité peuvent se déclarer. Ainsi, en complément du score de risque de mortalité, il s'agit de définir le score de risque de morbidité ou de morbi-mortalité. L'une des priorités de la recherche en chirurgie cardiaque est la création de tels scores, basés sur des définitions consensuelles et cliniquement pertinentes de ces complications, dans le but de mieux prévenir leur survenue. L'utilisation de ces scores doit également inclure la chronologie de la prédiction notamment lorsqu'il s'agit d'évaluer l'amélioration d'un score à l'aide de nouveaux biomarqueurs en période périopératoire.

En pratique clinique, les scores multifactoriels sont issus d'outils statistiques assez performants tels que les régressions logistiques. Néanmoins, en chirurgie cardiaque, la plupart des scores présentent de nombreux biais dans la méthodologie de la détermination des modèles statistiques [281, 282].

#### 2. Méthodes d'évaluation

L'évaluation d'un score comporte plusieurs étapes [283] :

- Premièrement l'évaluation du score au sein même de la cohorte à partir de laquelle il fut développé ;
- Une seconde étape de validation externe sur des cohortes différentes et réalisée par des équipes indépendantes ;
- Enfin, une étude d'impact dont l'objectif est d'évaluer la performance pronostique du score.



Au cours de ces différentes étapes successives, les méthodes pour évaluer ces scores sont de 2 types [284] :

- La discrimination est déterminée à l'aide d'une courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) représentant les variations de la spécificité et de la sensibilité (pour un évènement donné) en fonction des valeurs du score et dont le calcul de l'aire sous courbe (ASC) nous renseigne sur la performance de discrimination du modèle.
- La calibration compare les incidences des évènements observés avec celles prédites (calculées) dans des strates de risque croissant, et se réalise à l'aide de la statistique de Hosmer-Lemeshow.

## **B. Modèles de prédiction actuels**

Actuellement en chirurgie cardiaque, seuls 2 scores sont principalement utilisés pour la prédiction du risque de mortalité à 30 jours : l'EuroSCORE et le score de la Society of Thoracic Surgeons (STS) [285]. Bien que ces scores soient des outils efficaces permettant de comparer les populations et ainsi de confronter des groupes de patients, tous présentent des défauts de calibration à l'origine d'une apparente bonne discrimination. Ces limites ont ainsi été prises en compte dans le développement de nouveaux scores ou de leur version améliorée. Depuis, l'EuroSCORE II présente l'avantage d'être plus précis dans l'évaluation de la fonction rénale et prend en compte d'autres comorbidités telles que le diabète insulino-dépendant par exemple [286]. La question qui se pose concerne l'intérêt de ces scores lorsqu'il s'agit d'évaluer individuellement le risque des patients, notamment pour le choix de l'indication thérapeutique. Ainsi, le risque de fonction rénale, bien que pris en compte par l'EuroSCORE II et prédit par le score STS, est également estimé par un autre score, le Simplified Renal Index (SRI). L'identification, avant la chirurgie, des patients à haut risque de développer l'IRA-ACC pourrait permettre une application plus efficace des mesures prophylactiques et thérapeutiques. En 1997, Chertow et coll. [287] ont publié une étude de référence basée sur des données d'une large population, afin de stratifier le risque rénal préopératoire. Depuis, 3 modèles prédictifs de risque, dont le SRI, ont été développés pour prédire le recours à une EER après chirurgie cardiaque. Cependant, il n'existe aucune recommandation pour l'utilisation spécifique d'un modèle de prédiction d'IRA-ACC.

## C. Place des biomarqueurs dans la stratification du risque

### 1. Préambule

Ces quinze dernières ont fait l'objet de nombreuses études dans l'élaboration de scores cliniques multifactoriels dans le but d'établir un pronostic afin de prédire l'évolution de ces patients suite à l'intervention chirurgicale. Ces derniers s'avèrent difficile à manipuler par les cliniciens et leurs résultats sont parfois décevants. En effet, ces modèles ou scores basés pour l'essentiel sur des caractéristiques cliniques ne semblent pas assez performants, conduisant ainsi à une variabilité inter-observateur dans l'évaluation du risque. Ces faiblesses sont notamment dues à l'évolution et à l'amélioration des pratiques professionnelles mais surtout à l'évaluation subjective de certaines caractéristiques cliniques (*G. Lebreton et Coll. Chirurgie Thoracique Cardio-Vasculaire - 2010 ; 15 : 88-92 ; [http://www.sfctcv.net/ftp/journal/jo\\_2010\\_2\\_07.pdf](http://www.sfctcv.net/ftp/journal/jo_2010_2_07.pdf)*). Dans le même temps, de nombreux biomarqueurs ont émergé et ont suscité un engouement particulier de la part de la communauté médicale dans un contexte où la recherche médicale tend vers une personnalisation du diagnostic et de la prise en charge thérapeutique. Cela est justifié par les avantages que présentent les biomarqueurs : simplicité de dosage, rapidité des résultats et fiabilité, avec de plus grandes spécificités et sensibilités des lésions tissulaires et des dysfonctions d'organes. Le caractère objectif et précis de la décision diagnostique, thérapeutique et pronostique est rendu possible grâce à l'identification de biomarqueurs. En effet, selon la définition du National Institute of Health, un biomarqueur est une caractéristique mesurée objectivement avec une précision et une reproductibilité suffisantes, évaluée comme indicateur ou marqueur d'un processus biologique, physiologique ou pathologique, ou de la réponse pharmacologique à un traitement [288]. Ainsi, à l'instar des spécialités médicales pour lesquelles l'usage des biomarqueurs a permis d'améliorer la prédiction dans l'évolution clinique des patients, plusieurs études en chirurgie cardiaque ont mis en évidence de nombreuses applications des biomarqueurs dont la prédiction du risque postopératoire. Ces études se réfèrent aux différents acteurs impliqués dans les processus physiopathologiques déclenchés par la chirurgie cardiaque et la CEC décrits lors des chapitres précédents. Il s'agit essentiellement des biomarqueurs sériques liés:

- à l'atteinte myocardique (cTnI et T, CK-MB, BNP et Nt-proBNP) [289-292];

- à l'inflammation avec d'une part les molécules d'adhésion (E-selectine ou CD62E) [293] et d'autre part les cytokines telles que les interleukines (IL-1, 6 et 8) et le TNF $\alpha$  [294, 295];
- et enfin aux phénomènes de l'hémostase/coagulation (vWF, FT, FVII) [21, 31, 36].

Cependant, l'utilisation de ces biomarqueurs seuls ou en association représente un surcoût dans les dépenses liées à la prise en charge, ce qui implique que leur place dans la pratique clinique doit être rationnelle et s'appuyer sur données pertinentes, factuelles et robustes.

## 2. Méthodologie

Afin d'être considérés en tant que critères d'utilité clinique, les domaines de diagnostic, de pronostic et de stratification de risque doivent au préalable subir une succession d'étapes de validation (démonstration, évaluation, comparaison) [296] :

- Le biomarqueur doit être modifié de façon significative chez les patients présentant la pathologie étudiée ;
- Les propriétés diagnostiques du biomarqueur doivent faire l'objet d'une évaluation précise ;
- Les propriétés diagnostiques doivent être comparées à celles des tests existants ;
- Les propriétés diagnostiques augmentent la capacité de décision médicale des praticiens ;
- L'analyse du coût, du caractère plus ou moins invasif de l'obtention du biomarqueur, les difficultés techniques potentielles engendrées par sa mesure, sa rapidité d'obtention, et l'analyse du service médical rendu font l'objet d'évaluations ;
- L'établissement d'études interventionnelles doit être réalisé afin d'amener la preuve que les dosages du biomarqueur modifient la prise en charge et le suivi du patient.

Récemment, l'American Heart Association (AHA) [297] a proposé dans le domaine de l'évaluation du risque et du pronostic que les critères d'utilité clinique comportent obligatoirement :

- la validation prospective d'une valeur pronostique additionnelle par rapport aux modèles prédictifs déjà connus,
- un impact évident sur la prise en charge clinique des patients,

- une amélioration du pronostic sur la base des modifications apportées dans la prise en charge et
- une analyse coût/bénéfice.

### 3. Evaluation

L'évaluation de la performance diagnostique d'un biomarqueur est évaluée par le couple sensibilité/spécificité. Afin d'être plus facilement exploitable en clinique, les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) sont ajoutées bien que celles-ci soient dépendantes de la prévalence de la maladie ou de la complication étudiée. De plus, il existe un indice global qui permet de renseigner sur la proportion de patients correctement classés par le dosage du biomarqueur, il s'agit de la fiabilité. Compte-tenu de la dépendance de la fiabilité à la prévalence conduisant ici aussi à un jugement insuffisant de la performance diagnostique du test, on y ajoute l'index de Youden. Cet index représente la performance diagnostique du dosage et la meilleure performance diagnostique possible [298]. Afin de s'abstraire complètement de la prévalence, une autre approche, basée sur le calcul des rapports de vraisemblance positif et négatif, est considérée comme une mesure globale fiable des propriétés diagnostiques d'un test biologique [296].

Les performances diagnostiques d'un biomarqueur sont habituellement représentées par une courbe ROC dont le calcul de l'ASC est une mesure de la discrimination du test biologique. L'ASC de la courbe ROC représente la probabilité que la valeur du biomarqueur soit plus élevée pour un patient malade ou présentant la complication étudiée que pour un patient sain ou ne présentant pas cette complication. La comparaison par des tests statistiques appropriés des différentes ASC permet de comparer entre eux plusieurs tests diagnostiques. Les courbes ROC sont également utilisées pour définir les valeurs seuils du biomarqueur permettant de distinguer en pratique les patients à risque. Pour une estimation plus pertinente du risque encouru par les malades et en complément de l'analyse des courbes ROC, de nouvelles approches méthodologiques sont donc suggérées. Dans la quête d'une amélioration de la stratification du risque par les nouveaux biomarqueurs ces nouvelles approches font appel aux tables de reclassification [299].

### 4. Pré-analyse et analyse

La validation technique d'une méthode de dosage d'un biomarqueur doit être réalisée selon des recommandations. En France, la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) propose

un protocole détaillant les différentes évaluations à mettre en œuvre. Celles-ci incluent plusieurs étapes qui débutent par la détermination des conditions pré-analytiques et se poursuivent diverses évaluations purement techniques (Vassault GDA, Naudin C, Dumont G, Azzedine MC, Bailly M, les membres de la commission « Validation de techniques » de la SFBC. Protocole de validation de techniques (document B). Ann Biol Clin 1986;44:686—745). La détermination pré-analytique consiste à déterminer la nature de l'échantillon à tester (sérum, plasma, urine...). Elle se réalise sur plusieurs types et conditions de prélèvement (tube citraté, tube hépariné, tube EDTA, tube sec...). Cette étape est suivie de tests consistant à évaluer plusieurs modes de conservation des échantillons (durée, température, cycles congélation/décongélation). A l'issue de cette étape pré-analytique, les informations obtenues permettent d'évaluer la stabilité du biomarqueur selon la nature du prélèvement et définir les conditions optimales de sa conservation. Le processus se poursuit par la réalisation d'une suite d'évaluations résumées dans le tableau I.

Tableau I. Evaluation des performances analytiques pour le dosage d'un biomarqueur

Domaine d'analyse	Définit les limites haute et basse de la relation linéaire existant entre la concentration de l'analyse observée et la dilution effectuée
Limite de détection	Plus petite quantité ou concentration qui peut être distinguée de la valeur d'un blanc de la réaction
Répétabilité	Evalue la dispersion des résultats obtenus d'un même échantillon dans une même série d'analyse
Reproductibilité	Evalue la dispersion des résultats obtenus à partir d'un même échantillon dans différentes séries d'analyse
Justesse	Permet de mettre en évidence les erreurs systématiques dépendantes ou non de la concentration de l'analyte à doser, indépendamment de l'erreur aléatoire de reproductibilité
Interférences	Evalue la présence ou l'absence de réaction croisée entre l'analyte à doser et d'autres substances apparentées
Effet crochet	Evalue l'effet de saturation en présence de concentrations élevées de l'analyte à doser

Bien que ces étapes de validation soient réalisées par l'ensemble des firmes commercialisant les tests, la présence sur le marché de plusieurs kits de dosage pour un même biomarqueur rend difficile l'interprétation et la comparaison des études utilisant des kits différents. En effet, compte-tenu des méthodes de mesures employées dans le processus de validation chaque fabricant fournit des résultats hétérogènes notamment dans la détermination des seuils de détection et des seuils de positivité. D'où la nécessité d'établir de véritables normes de standardisation internationale dans le développement des kits de dosage commercialisés afin d'établir des valeurs normatives universelles.

## 5. Exemple d'identification de l'IRA associée à la chirurgie cardiaque

### Modèle de prédiction

En 2005, Thakar et coll. [300] ont publié le score Cleveland Clinic avec un haut degré de précision dans le calcul de l'incidence de l'IRA-EER. Cependant, Heise et coll. [301] ont rapporté que ce score n'était pas approprié pour estimer la réelle incidence avec suffisamment de précision dans leur population de patients, bien que cela pourrait permettre de discriminer entre les patients à haut risque et ceux à faible risque d'EER. En 2006, Mehta et coll. [302] ont proposé un outil « au lit du patient » (Mehta score) pour prédire le risque basé sur 8 variables préopératoires chez 86 009 patients. En 2007, Wijeyesundera et coll. [303] établissent le modèle SRI. Des études de validation externes ont été réalisées [304, 305], il en résulte que le score de Cleveland Clinic offre une meilleure valeur discriminative pour l'EER postopératoire. Néanmoins, avant d'utiliser un modèle d'estimation des probabilités de risque dans un centre spécifique, une calibration peut être nécessaire. Parolari et coll. [306] ont proposé que les modèles de prédiction puissent être améliorés par l'ajout de variables de management peropératoires.

### Les biomarqueurs

D'autres modèles ont été développés pour prédire l'IRA ne nécessitant pas de dialyse. Cependant, les différentes définitions de l'IRA peuvent affecter la généralisation de ces modèles de risque. Les biomarqueurs, IL-18 urinaire et NGAL plasmatique, peuvent améliorer fortement la prédiction du risque de 25% et 18% respectivement, lorsqu'ils sont associés aux modèles cliniques utilisant des variables pré- et peropératoires [307]. Des consensus dans les définitions de l'IRA incluant les biomarqueurs sont nécessaires pour développer et valider ces scores de prédiction des IRA débutantes et modérées.

Les variations de la créatininémie apparaissent tardivement dans le développement de l'IRA-ACC, typiquement 48 heures après l'initiation de l'évènement [308], en raison de l'hémodilution. Il en résulte un retard dans le diagnostic d'IRA-ACC alors que les lésions tubulaires sont déjà installées et continuent de progresser. Ainsi, une des raisons majeures d'absence de succès des tentatives de traitement de l'IRA-ACC est que ces interventions sont initiées trop tardivement, la nécrose tubulaire aigue étant déjà bien établie.

L'avènement de nouveaux biomarqueurs des lésions rénales a ouvert une nouvelle voie dans la détection précoce et la prédiction du pronostic lors d'IRA-ACC. Ces biomarqueurs ont amélioré le suivi, l'instauration précoce de mesures thérapeutiques, et ont amélioré l'orientation thérapeutique des patients [309]. Les études ASSESS-AKI (Assessment, Serial, Evaluation, and Subsequent Sequelae of Acute Kidney Injury) et TRIBE-AKI (Translational Research Investigating Biomarkers Endpoints in AKI) ont évalué l'utilité des nouveaux biomarqueurs dans la redéfinition du diagnostic et du pronostic de l'IRA [310]. Trois biomarqueurs de l'IRA les plus prometteurs et les plus fréquemment étudiés à ce jour sont le Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), la Cystatine C et l'IL-18.

- ❖ Il a été démontré que le NGAL était un prédicteur hautement spécifique et sensible de l'IRA-ACC [311]. Le NGAL urinaire a été démontré comme un biomarqueur précoce de l'IRA post-CEC, augmentant de l'ordre de 25 fois dans les 2 h et diminuant 6 h après la chirurgie [308], ce qui a promu le dosage du NGAL urinaire comme indicateur prédictif d'IRA-ACC subclinique. Une analyse multicentrique regroupant des études prospectives a montré qu'en l'absence d'augmentation de la créatininémie, le NGAL permet de détecter les patients présentant une probable IRA subclinique, et sont donc à risque élevé de développer des complications [312]. Par conséquent, il a été suggéré d'inclure le NGAL plasmatique dans la classification de la sévérité de l'IRA et dans la prédiction de la nécessité d'une EER après chirurgie cardiaque [313]. Haase et coll. [314] ont également rapporté que le taux de NGAL plasmatique à l'arrivée en réanimation après chirurgie cardiaque était corrélé avec la survenue d'une IRA ultérieure plus longue, plus sévère et à une durée de séjour plus longue. Cependant, une autre étude a décrit que le NGAL plasmatique n'était pas un prédicteur utile de l'IRA au cours des 6 premières heures après la chirurgie cardiaque, mais que son taux urinaire était supérieur aux biomarqueurs conventionnels et à son taux plasmatique dans le diagnostic précoce de l'IRA –ACC [315].

- ❖ La performance de l'IL-18 urinaire, telle que démontrée par l'ASC ROC, dans le diagnostic de l'IRA à 4, 12 et 24 h après la CEC est respectivement de 61, 75 et 73 % [316]. De plus, une étude prospective, à cohorte multicentrique impliquant 1 219 patients a confirmé qu'IL-18 et NGAL plasmatiques ont leur pic 6 h après la chirurgie cardiaque, bien avant l'augmentation de la créatininémie ; ces deux biomarqueurs montrent des associations de plus en plus étroites avec l'importance des événements cliniques : durées de séjour hospitalier et en réanimation prolongées, risque accru de recours à la dialyse et risque de décès [317].
- ❖ Récemment, le consortium TRIBE-AKI a publié d'importantes découvertes dans ce domaine. Il a été décrit que les taux sériques de Cystatine C (CyC) sont moins sensibles pour la détection de l'IRA que la créatininémie chez les patients adultes à haut risque bénéficiant d'une chirurgie cardiaque. Néanmoins, le recours au taux de CyC permettrait d'identifier un sous-groupe de patients IRA avec un risque substantiellement élevé d'évènements indésirables [318].
- ❖ Le BNP préopératoire apparaît également comme un puissant prédicteur indépendant de l'IRA-ACC modérée et sévère [319].

La combinaison de biomarqueurs semble améliorer la sensibilité de la détection précoce de l'IRA-ACC comparée aux biomarqueurs pris séparément [309]. En se basant sur ces récentes études, il est clair que les combinaisons de biomarqueurs et de paramètres cliniques vont émerger comme des outils pour la prédiction précoce et la stratification du risque d'IRA-ACC. Les études expliquent aussi comment les différences entre études cliniques (les différentes techniques et les temps de mesures, les valeurs seuil des taux plasmatiques/sériques ou urinaires, la définition de l'IRA employée) peuvent à leur tour expliquer au moins en partie les différences rapportées dans les performances diagnostiques et l'importance de ces biomarqueurs. Des études ultérieures seront nécessaires pour déterminer comment ces biomarqueurs d'IRA peuvent être utilisés au mieux pour guider le choix dans la stratification du risque, dans l'intervention thérapeutique et dans la pronostication de l'IRA-ACC, en supplément ou à la place des mesures cliniques actuelles.



## Implications des biomarqueurs dans la prise en charge des patients en chirurgie cardiovasculaire

Devant la complexité des processus mis en jeu au cours de la chirurgie cardiaque et la multiplication des biomarqueurs respectifs, les récents travaux se sont orientés vers l'identification de nouveaux biomarqueurs qui pourraient intégrer de nombreuses voies et processus impliqués dans la physiopathologie cardiovasculaire. En effet, l'utilisation conjointe de plusieurs biomarqueurs illustrant différents types de mécanismes physiopathologiques et possédant des risques relatifs également différents pour des composantes individuelles de critères composites de morbi-mortalité pourrait apporter un bénéfice supplémentaire pour l'identification et la stratification des malades chirurgicaux à haut risque. Le caractère plurifactoriel des dommages organiques péri-opératoires observé en chirurgie cardiaque plaide en ce sens.

L'objectif est de développer une approche systémique de l'état biologique des patients grâce à l'interprétation des résultats obtenus à partir d'un biomarqueur qui constituerait le signal intégrateur à la fois des processus inflammatoires, du statut nitro-oxydant et des lésions ischémiques, dans l'espoir d'améliorer la performance prédictive du risque cardiovasculaire.

**Un de ces biomarqueurs prometteurs est le GDF-15.** En effet, ses taux plasmatiques ont été positivement et significativement associés à des caractéristiques aussi bien cliniques (l'âge, le sexe masculin, le tabagisme actif, l'IC symptomatique), que biologiques (taux sériques de BNP et de CRP) [320-322].

Compte-tenu du profil des patients candidats à la chirurgie cardiaque et des phénomènes physiopathologiques inhérents à ce type d'intervention, **l'étude du GDF-15 dans le contexte chirurgical constitue une étape supplémentaire dans le processus de développement et de validation de ce biomarqueur.**

## V. LE GROWTH/DIFFERENTIATION FACTOR-15

La superfamille du Transforming Growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) est constituée d'un grand nombre de protéines qui jouent le rôle de facteurs de différenciation et de croissance, apparentés selon leur structure et leur fonction, et jouant des rôles majeurs dans la conformation tissulaire au cours de l'embryogenèse ainsi que dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et la réparation des lésions chez l'adulte [323-330]. Le GDF-15 a fait l'objet d'une attention toute particulière du fait de ses remarquables rôles plurifonctionnels dans le contrôle de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Figure 10). Egalement dénommé Prostate-Derived factor (PDF), Placental TGF- $\beta$  (PTGF- $\beta$ ), Placental Bone Morphogenetic protein (PLAB), Non-steroidal Anti-inflammatory drug-activated Gene-1 (NAG-1) ou encore Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1), le GDF-15 participe à la régulation de l'expression de gènes cibles spécifiques en réponse à divers stimuli externes et atteintes tissulaires [331-338]. Les fonctions médiées par le GDF-15 sécrété incluent le contrôle du développement embryonnaire, ostéogénique et hématopoïétique, ainsi que l'implantation de l'embryon au cours de la grossesse [334, 339, 340]. Le GDF-15 joue également un rôle majeur dans la régulation du stress cellulaire et dans la réponse immunitaire, la formation des cartilages et des os, et enfin dans la fonction du tissu adipeux [339, 341]. Le GDF-15 possède une activité anti-inflammatoire en inhibant l'activation macrophagique, la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques et en participant à la réparation des tissus sévèrement lésés tels que le cerveau, le tissu osseux, le cœur, le foie, les poumons et les reins [323, 331, 333, 334, 337, 342, 343]. De plus, le GDF-15 peut agir comme un puissant facteur de survie cellulaire, anti-apoptotique, présentant des fonctions protectrices au cours du développement fœtal et dans divers types de cellules telles que les neurones dopaminergiques et sérotoninergiques et les cardiomyocytes [323, 334-336, 338, 342, 344]. Ainsi, la modulation des fonctions du GDF-15 et de son expression peut représenter une stratégie thérapeutique potentielle dans le traitement de divers désordres chez l'Homme, tels que l'obésité, les fausses-couches, les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires. Cependant, la surexpression du GDF-15, peut conduire à une augmentation du risque de développer différentes pathologies, telles que les thalassémies et autres anémies dysérythropoïétiques congénitales [345, 346]. Enfin, l'élévation des taux de GDF-15 semble

également contribuer à la progression du cancer et à la perte de poids qui lui est associée [347-350].

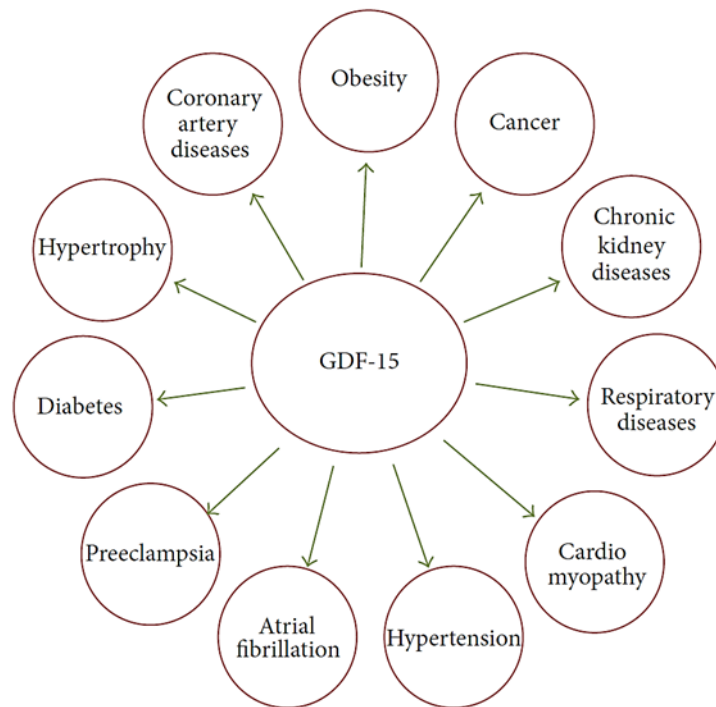


Figure 10. Implications de GDF-15 dans diverses situations pathologiques. L'expression de GDF15 semble constituer un signal intégrateur en jouant des rôles majeurs au niveau métabolique, cardiovasculaire, dans l'obésité, le cancer et dans les pathologies chroniques (Tiré de : Ramu Adela and Sanjay K. Banerjee. GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. Journal of Diabetes Research.2015)[351]

### A. Structure, processus et sécrétion

Le gène humain *GDF-15* est localisé au sein du chromosome 19, dans la région p13.1-13.2, et consiste en une séquence d'ADN de 2 746 paires de bases contenant 2 exons séparés par un seul intron. Le GDF-15 est synthétisé sous la forme d'un précurseur protéique de 308 acides aminés, composé d'un peptide signal de 29 acides aminés, d'un propeptide de 167 acides aminés et d'une région mature de 112 acides aminés (Figures 11 et 12) [331, 352]. L'extrémité N-terminale de 28 acides aminés du propeptide semble être impliquée dans la dégradation par le protéasome du monomère proGDF-15 dont la conformation spatiale n'est pas correcte. Au cours du processus de protéolyse, la séquence N-terminale hydrophobe du peptide signal est éliminée à partir du précurseur proGDF-15. Suite à la dimérisation par l'établissement de ponts disulfures et à sa fixation dans le réticulum endoplasmique, le précurseur dimérique proGDF-15 est à nouveau clivé au niveau du site spécifique RRAR

furin-like en position 196 par une convertase de proprotéine. Ce clivage génère un propeptide N-terminal et un fragment polypeptidique C-terminal constituant la portion mature et biologiquement active de la molécule qui sera sécrétée dans la matrice extracellulaire [331, 347, 352]. Contrairement aux autres membres de la superfamille TGF- $\beta$ , le propeptide n'est pas indispensable à la bonne conformation spatiale et à la sécrétion de la forme mature du dimère GDF-15 [353]. Au cours du processus de sécrétion, le propeptide du proGDF-15 peut être N-glycosylé. Le GDF-15 mature contient 7 résidus cystéine formant un nœud cystéine, une marque de structure hautement conservée au sein des membres de la superfamille TGF- $\beta$ . Cependant, bien que le polypeptide mature GDF-15 soit sécrété sous forme d'homodimère relié par des ponts disulfures, le proGDF-15 non-fonctionnel est également sécrété et s'associe aux composants de la matrice extracellulaire grâce à des interactions avec le propeptide [347] (Figure 11). Il semble que l'association du précurseur proGDF-15 avec la matrice extracellulaire contribue au stockage dans le stroma et participe ainsi à moduler la biodisponibilité locale, les fonctions cellulaires et les concentrations sériques de GDF-15 [347]. La présence de convertases de proprotéine au sein de la matrice extracellulaire à la surface des cellules pourrait contribuer au processus extracellulaire du précurseur proGDF-15 sous certaines conditions [347, 354].

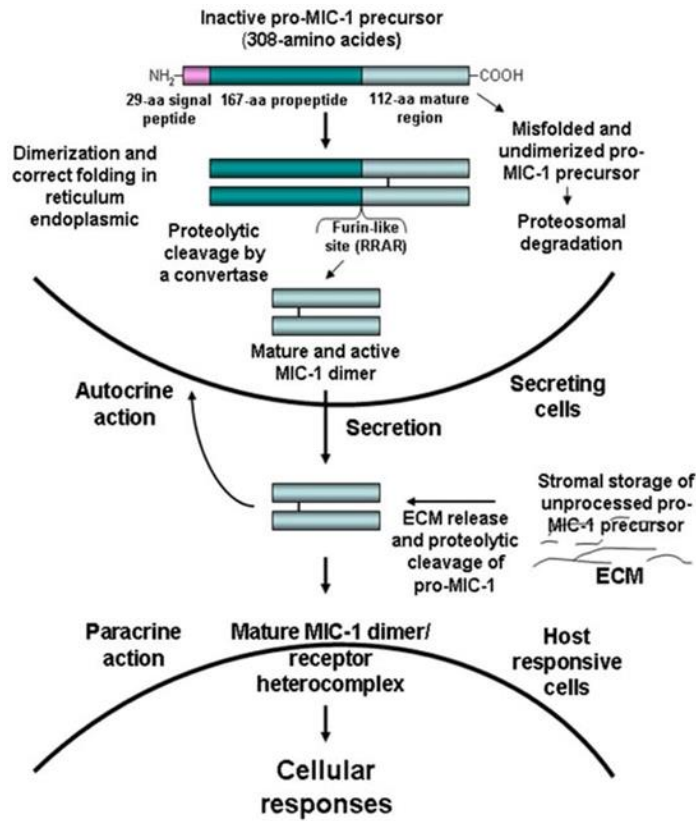


Figure 11. Mécanismes moléculaires associés à la synthèse, à la sécrétion, au stockage et aux actions autocrines et paracrines du GDF-15 (Tiré de : Murielle Mimeault et Surinder K. Batra. *Divergent Molecular Mechanisms Underlying the Pleiotropic Functions of Macrophage Inhibitory Cytokine-1 in Cancer*. *J. Cell. Physiol.* 2010) [355]

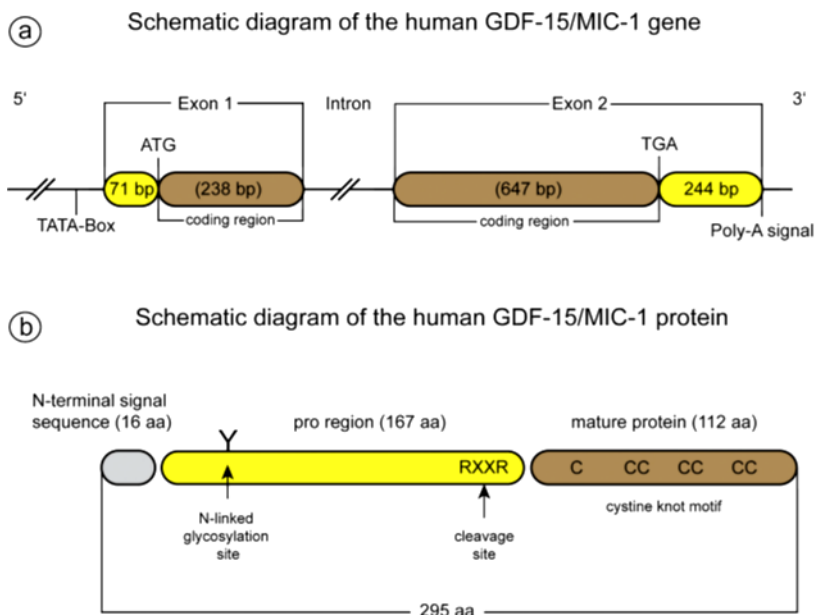


Figure 12. Structure du gène et de la protéine GDF-15 (Tiré de : Klaus Unsicker et coll. *The multiple facets of the TGF- $\beta$  family cytokine growth/ differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2013) [356]

## B. Schéma d'expression et mécanismes de régulation

Diverses voies de signalisation contribuent à la régulation de l'expression endogène, de la sécrétion et du stockage stromal de GDF-15, modulant ainsi ses fonctions dans les conditions physiologiques et pathologiques. Le niveau d'expression de GDF-15 est habituellement très bas dans les cellules à l'état basal, mais il s'élève de manière substantielle au cours de réactions adaptatives, suite à divers signaux de stress cellulaires tels que l'hypoxie ou l'anoxie, l'inflammation, l'exposition aux rayons de courtes longueurs d'onde, les lésions tissulaires aiguës ou lors de la progression des cancers [337, 341, 357, 358]. L'induction de l'expression d'ARNm de GDF-15 dans les macrophages activés par les cytokines pro-inflammatoires sécrétées telles que le Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) et le TGF- $\beta$ , suggère que le GDF-15 pourrait agir à travers une boucle de rétrocontrôle autocrine au cours des réponses inflammatoires, comme un facteur inhibiteur dans les phases tardives de l'activation macrophagique [331, 353] (Figure 13). De plus, des résultats issus d'hybridation *in situ* ont révélé que le GDF-15 et son équivalent orthologue murin présentent des niveaux d'expression comparables dans les tissus adultes en condition physiologique [333, 353]. Le GDF-15 est exprimé à un niveau élevé dans le placenta, et à un niveau moindre dans les cellules épithéliales des glandes mammaires et de la prostate, dans les poumons, dans le tractus gastro-intestinal, dans le pancréas ainsi que dans les reins [332, 333, 339, 353, 359-362]. L'épithélium des plexus choroïdes des ventricules cérébraux et de l'épendyme du cerveau adulte exprime également le GDF-15 qui est sécrété dans le liquide céphalorachidien [335, 360]. Une augmentation significative de la concentration plasmatique en GDF-15 a été retrouvée par technique ELISA chez les femmes enceintes [334, 363]. Inversement, de faibles taux plasmatiques ont été détectés juste avant les fausses-couches, suggérant un potentiel prédictif de ces taux bas dans les complications au cours de la grossesse [344].

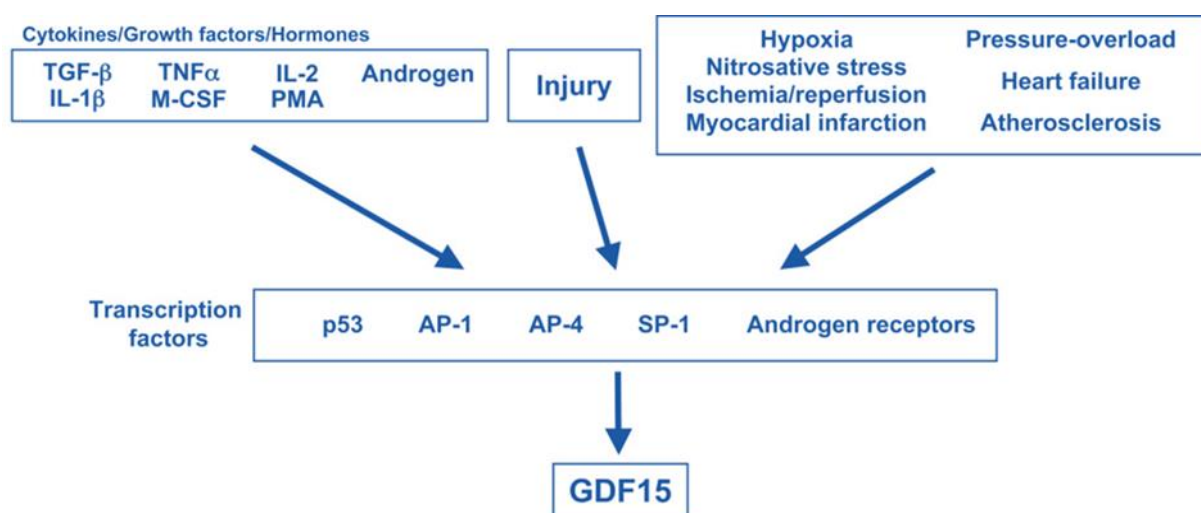


Figure 13. Situations et signaux stimulateurs de l'expression de GDF-15 (Tiré de Tetsuro Ago and Junichi Sadoshima GDF15, a Cardioprotective TGF- $\beta$  Superfamily Protein. *Circulation Research* 2006)[338]

En fonction du contexte et de l'environnement physiopathologique, le GDF-15 agit comme un médiateur de communication intercellulaire, capable d'inhiber la croissance cellulaire et/ou de réguler l'apoptose induite par des lésions de l'ADN ou par l'activation de la voie p53/p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [357, 359, 364, 365]. Le promoteur du gène *GDF-15*, présentant 2 sites de liaison pour la protéine suppresseur de tumeur p53, est activé par cette dernière sous sa forme native uniquement [359, 366]. De plus, plusieurs anti-inflammatoires non stéroïdiens, ligands du Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), les rétinoïdes et le resveratrol, ainsi que des molécules cytotoxiques dont l'étoposide et la doxorubicine, ont démontré leur capacité à induire une augmentation des niveaux d'expression de GDF-15 de manière dépendante et indépendante de p53 dans les cellules *in vitro* ainsi que dans les modèles de xénogreffes chez la souris *in vivo* [359, 366-368].

### C. Analogies entre les mécanismes du signal de transduction du GDF-15 et des autres membres de la superfamille du TGF- $\beta$

Des progrès majeurs ont été réalisés au cours de ces dernières années dans la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des effets autocrines et paracrines observés parmi les différents membres de la famille du TGF- $\beta$  [325-327, 369]. En règle générale, ces membres, incluant TGF- $\beta$ 1, 2 et 3, les GDFs, les Bone Morphogenetic Proteins

(BMPs), les activines, le nodal, les inhibines, les myostatines et l'hormone antimüllérienne (AMH), réalisent leurs effets biologiques au moins en partie par activation d'un complexe de récepteur transmembranaire hétérodimérique composé de 2 types de récepteurs serine/thréonine kinases (type I et II) et d'effecteurs intracellulaires en aval : les protéines Smad pour Small Mothers Against Decapentaplegic [326, 327, 369]. La spécificité et la versatilité des effets biologiques médiées par chaque ligand appartenant aux TGF- $\beta$  peuvent être réalisées par l'activation de différentes combinaisons des serine/thréonine kinases de type I et II à la surface des cellules et à la formation intracellulaire de différents complexes de protéines Smad ou d'autres effecteurs. Plus spécifiquement, 7 types de récepteurs kinases ont été identifiés chez les mammifères et appelés les Activin-Like receptors (ALKs). Ces derniers forment des complexes spécifiques avec 5 types de récepteurs de type II différents tels que TGF- $\beta$ R-II, ActR-II, ActR-IIB, Bone Morphogenetic Proteins Receptor-II (BMPR-II) et anti-Müllerian hormone receptor-II (AMHR-II) [326, 369-372]. Il existe 2 principales voies de signalisation Smad : les récepteurs de type I activés ALK-1, 2, 3 et 6 phosphorylent les Smads 1, 5 et 8 tandis que les Smads 2 et 3 sont les substrats des ALKs 4, 5 et 7. Bien que les récepteurs spécifiques activés par le GDF-15 sécrété n'aient pas été précisément identifiés, il a été suggéré que cette cytokine, à l'instar des autres membres TGF- $\beta$ , pouvait réguler certaines réponses cellulaires par l'activation des récepteurs de type I et II des TGF- $\beta$  et des complexes de protéines de transduction de signal Smad (Figure 13) [342, 350, 365, 373]. L'expression de GDF-15 dans les cardiomyocytes néonataux en culture induit une réponse anti-hypertrophique par l'activation des voies impliquant Smad2/3 tandis qu'une surexpression des protéines inhibitrices Smad6/7 aboutit à l'effet inverse [342].

Ainsi, par analogie avec les autres membres de la famille TGF- $\beta$ , une vue simplifiée des mécanismes de signaux de transduction potentiels du GDF-15 implique la liaison du ligand à un récepteur kinase de type II actif qui va recruter et phosphoryler un récepteur de type I qui à son tour phosphoryle les effecteurs du signal en aval désignés comme les récepteurs régulés par les Smads (R-Smads), capables de se lier au partenaire co-Smad commun, la protéine Smad4. Les complexes activés R-Smad/Smad4 réalisent une translocation depuis le cytoplasme vers le noyau où ils agissent tels des facteurs de transcription, en interagissant avec la séquence de reconnaissance d'ADN, CAGAC, retrouvée dans la région des éléments régulateurs des gènes cibles [325]. D'autres co-facteurs nucléaires de liaison à l'ADN peuvent aussi coopérer avec les protéines Smad dans la régulation de l'expression de nombreux



gènes cibles. De plus, les complexes nucléaires Smad aux sous-unités multiples peuvent recruter d'autres facteurs de transcription, agissant comme co-activateurs ou co-répresseurs, et peuvent influencer la réponse spécifique cellulaire médiée par le complexe hétérodimérique dans un type cellulaire donné. Le GDF-15 sécrété, tout comme les autres membres TGF- $\beta$ , peut aussi stimuler d'autres éléments de signalisation intracellulaire, telles que les voies de signalisation Ras/MAPKs et PI<sub>3</sub>K/Akt/mTOR [325]. Diverses molécules de régulation peuvent interférer avec l'expression, la localisation subcellulaire, la sécrétion, le stockage et la stabilité du GDF-15 et/ou avec les activités de ses récepteurs et éléments de signalisation intracellulaire et ainsi influencer le contrôle de ses fonctions. Les interactions entre la signalisation du GDF-15 et les cascades des autres facteurs de croissance ne sont pas encore bien établies ; une meilleure compréhension de leur réseau permettrait de promouvoir ou d'atténuer les réponses dépendantes ou indépendantes de la voie Smad [325]. L'activation de la voie du GDF-15 et son intégration au sein du réseau de signalisation intracellulaire détermineront l'objectif final de l'expression et de la réponse des gènes cibles dans un type cellulaire donné.

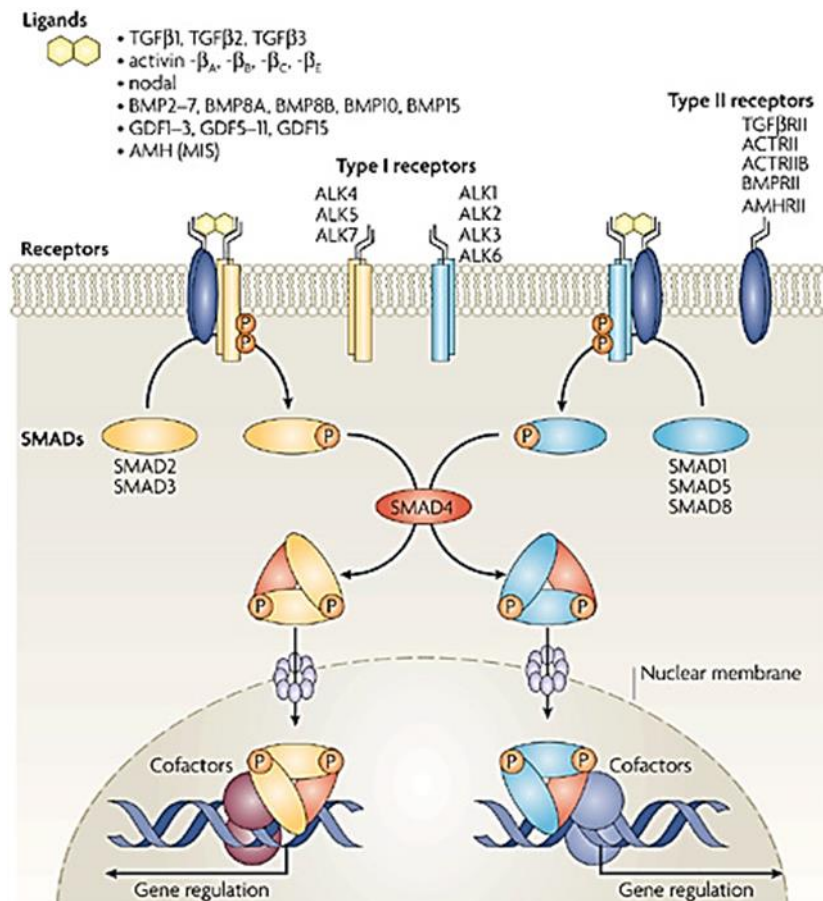


Figure 14. Mécanismes de transduction du signal potentiels impliquant la régulation des réponses cellulaires induites par le GDF-15 (Tiré de : Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. Nat Rev MolCell Biol 2007 [374].

De nombreuses études réalisées sur des cultures cellulaires et des modèles animaux ont révélé que les voies de signalisation et les réponses cellulaires induites par le GDF-15, sécrété au cours du développement tissulaire, pendant le développement embryonnaire et foetal aussi bien que ses effets pléiotropes sur les cellules normales et cancéreuses au cours de la vie adulte, sont grandement dépendants du type cellulaire et du contexte [331-334, 336, 337, 339, 341-343, 373]. Le GDF-15 participe à certains effets biologiques en modulant différentes cascades de signalisation, initiées par des facteurs de croissance distincts sur des récepteurs apparentés (Figure 14). L'identification des récepteurs du GDF-15 n'ayant pas encore abouti à ce jour, les mécanismes moléculaires à l'origine des effets physiologiques et cellulaires observés du GDF-15 aussi bien que ses implications dans le développement de diverses pathologies humaines restent à déterminer de façon plus précise.

De nombreux éléments de preuve, obtenus à partir de sujets humains, de modèles de souris transgéniques dans lesquelles l'expression de GDF-15 a été manipulée ou chez lesquelles le

recombinant pur de GDF-15 était administré, démontrent que cette cytokine sécrétée contrôle différents processus physiologiques, ainsi que l'homéostasie tissulaire et les réparations au cours de la vie chez l'adulte.

Au niveau cardiaque, bien que la forme sécrétée de GDF-15 ne soit pas exprimée de manière importante dans le cœur chez l'adulte, celui-ci peut être induit en réponse à divers stimuli physiopathologiques tels que l'hypertension artérielle (HTA), les pathologies ischémiques cardiaques favorisant la croissance hypertrophique du cœur, les cardiomyopathies dilatées et l'insuffisance cardiaque (IC) [336, 342, 373]. En réalité, le GDF-15 peut présenter des effets cardioprotecteurs et agir comme un facteur régulateur anti-hypertrophique au niveau cardiaque : cette cytokine aurait la capacité d'antagoniser la réponse hypertrophique et d'améliorer la performance ventriculaire [336, 342, 373]. Il a été démontré que des souris transgéniques surexprimant spécifiquement le GDF-15 au niveau cardiaque demeurent saines et présentent de plus une résistance partielle à l'hypertrophie ventriculaire induite par l'HTA [342]. Sur des cardiomyocytes en culture, l'induction de l'expression de GDF-15 par transfection adénovirale inhibe l'hypertrophie induite par la phényléphrine et l'angiotensine II. L'administration IV de GDF-15 transporté par un adénovirus ou l'injection de sa protéine recombinante atténuent également la dilatation ventriculaire et l'IC dans le modèle murin décrit par Xu et coll. [342]. A l'inverse, les souris homozygotes déficientes pour le GDF-15 demeurent viables mais présentent une augmentation des taux cardiaques en facteurs hypertrophiques ainsi qu'une baisse prononcée de la performance ventriculaire suite à la stimulation hypertensive [342].

#### **D. Fonctions physiologiques et pathologiques du GDF-15 dans le domaine cardiovasculaire**

Les pathologies cardiovasculaires dont l'athérosclérose, l'HTA, l'hypertrophie cardiaque ou l'IC, l'infarctus du myocarde (IDM), les coronaropathies ou encore les accidents vasculaires cérébraux (AVC), sont les maladies dont les prévalences sont les plus élevées et représentent les principales causes de mortalité à travers le monde (World Health Organization, *World Health Statistics 2012*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2012). L'âge, le diabète et d'autres facteurs de risque accélèrent la progression de la maladie, en induisant une dysfonction endothéliale, une HTA et une hypertrophie du ventricule gauche (HVG) [375]. Le GDF-15 joue un rôle cardioprotecteur dans le cœur adulte par l'activation de la voie

des Smad2 et 3 et ALK4/5/7 [338]. Comme décrit précédemment, le GDF-15 n'est quasiment pas exprimé dans le cœur sain mais son expression augmente rapidement en réponse aux atteintes cardiovasculaires telles que l'HTA, les phénomènes d'I/R et d'athérosclérose [336, 342].

Au niveau cardiaque, le GDF-15 active Smad1 et réduit la mort cellulaire par apoptose en stimulant la surexpression de Bcl-xL et de la  $\beta$ -caténine. De la même manière, le BMP-2 exerce un effet anti-apoptotique en activant Smad1. GDF-15 et BMP-2 montrent des similitudes dans leur structure primaire et dans l'activation de la voie des Smads. D'ailleurs, le GDF-15 est plus proche de la famille BMP-2 que de la sous-famille des TGF- $\beta$ . Le BMP-2 active la voie ALK 2/3/6 et phosphoryle les Smad 1/5 [338]. Toutes ces voies de signalisation régulées par le GDF-15 sont à l'origine de la cardioprotection (Figure 15).

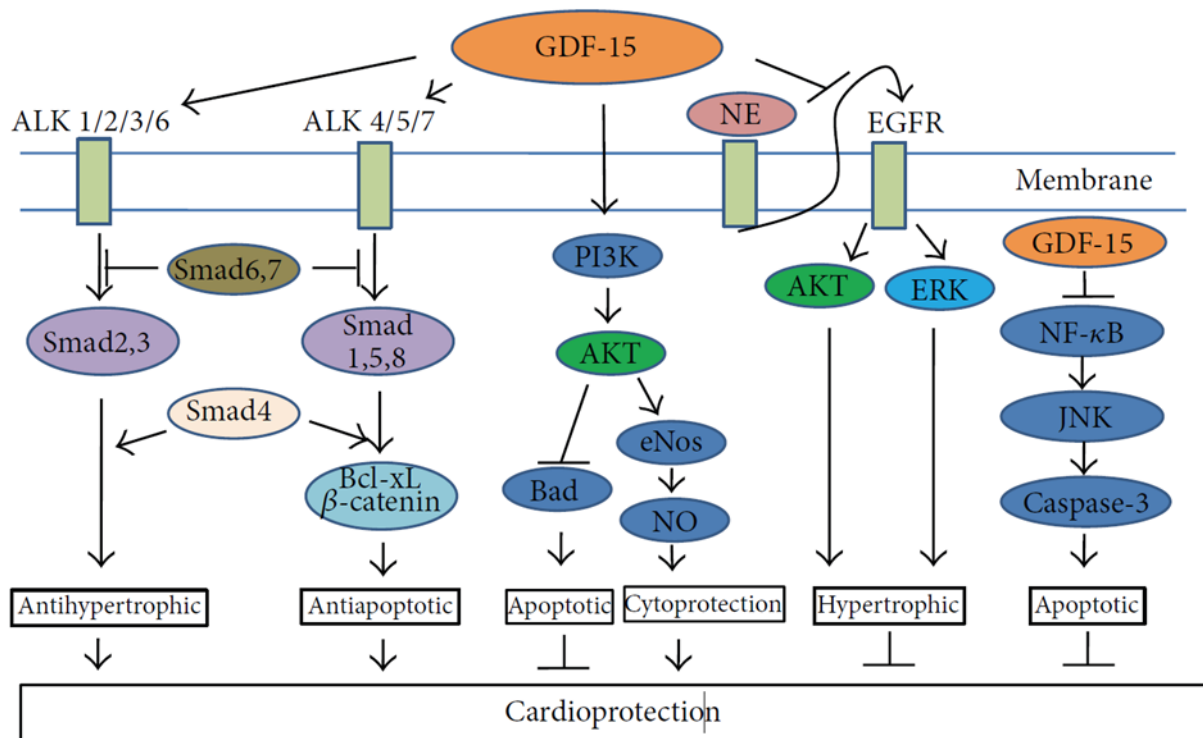


Figure 15. Voies de signalisation de cardioprotection par GDF-15 (Tiré de : Ramu Adela and Sanjay K. Banerjee. GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. Journal of Diabetes Research.2015)[351]

Le GDF-15 prédit les événements indésirables chez les patients présentant des douleurs angineuses ou un IDM [322, 376-378]. Le GDF-15 est un biomarqueur émergent du fait de ses taux s'élevant dans les stades précoces infra-cliniques, ce qui lui confère une valeur pronostique dans les événements cardiovasculaires et la mortalité [379]. De récentes études

montrent que les taux de GDF-15 sont associés à une faible fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG), une mauvaise fonction diastolique, une plus grande sensibilité à l'ischémie et une faible capacité d'exercice. Le GDF-15 est aussi corrélé avec le NT-proBNP, la masse du ventricule gauche, l'HVG concentrique, les coronaropathies et l'IC [320, 379].

En amont de l'expression et de la sécrétion du GDF-15, une autre cytokine spécifiquement cardiaque a récemment été identifiée. La follistatin-like 1 (FSTL-1) est une glycoprotéine sécrétée de 308 acides aminés appartenant à la famille des follistatines. Elle agit en tant que ligand pour un récepteur de surface des membres de la superfamille des TGF- $\beta$  [380]. La FSTL-1 est une cardiokine (cytokine spécifiquement d'origine cardiaque) dont le taux d'expression est augmenté au cours d'hypertrophie cardiaque ou lors d'infarctus myocardique [381]. De récentes études ont démontré que les actions de la FSTL-1 étaient associées à la suppression à la fois de l'inflammation et de l'apoptose au cours des phénomènes d'ischémie myocardique, se traduisant par une réduction des lésions et des dysfonctions myocardiques [382]. De plus, des taux élevés de FSTL-1 ont été mis en évidence chez des patients victimes de SCA et ont été associés à la survenue d'IC systolique chez cette même population, suggérant son utilisation potentielle en tant que biomarqueur dans les maladies cardiovasculaires [383, 384]. De manière intéressante, il a été également démontré que l'expression de FSTL-1 était à la fois suffisante et nécessaires pour la production du GDF-15 [385]. L'équipe à l'origine de cette découverte avait émis l'hypothèse que l'activité du promoteur du gène *GDF-15* pouvait être utile dans l'identification d'autres gènes induits par le stress et donc potentiellement de nouveaux biomarqueurs pronostics de SCA. Etant donné que la production cardiaque de GDF-15 atteint son maximum 4 jours après une ischémie expérimentale sur des modèles murins d'infarctus myocardique [336, 386] et en présumant que les activateurs du gène *GDF-15* sont exprimés avant cette échéance, Widera et coll. ont identifié FSTL-1 comme un inducteur potentiel de la région promotrice de *GDF-15*. Ces résultats ont encouragé les travaux visant à développer des biomarqueurs précoces et spécifiques du risque cardiovasculaire notamment dans la discrimination de l'origine de l'élévation des taux de GDF-15 chez des patients présentant de multiples comorbidités.

## 1. GDF-15 et athérosclérose

Le développement et la progression des plaques d'athérosclérose sont initiées par la dysfonction endothéliale, le dépôt des LDL oxydés dans l'espace sous-endothélial, le recrutement de monocytes dans la paroi artérielle, leur différenciation en macrophages activés puis leur transformation en cellules spumeuses dans l'espace sous-endothélial [387]. Le GDF-15 semble inhiber la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*. Une étude récente a démontré que le GDF-15 à haute concentration (50 ng/mL) inhibait la prolifération des cellules endothéliales alors qu'à faible concentration (5 ng/mL), le GDF-15 induisait leur prolifération et présenterait des effets pro-angiogéniques [341, 388, 389].

Les membres de la famille TGF- $\beta$  sont impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques, et notamment dans les pathologies vasculaires. Ils agissent tels des marqueurs de l'inflammation dans les stades avancés de l'athérosclérose et jouent un rôle dans sa pathogénèse, en activant le mécanisme protéolytique des macrophages activés [390, 391]. Dans les conditions de plaque riche en lipides, ces macrophages activés s'orientent vers l'apoptose, phénomène qui peut participer aux aspects de thrombogénicité de la plaque [392]. L'activation de la caspase-3, l'induction de la Manganese SuperOxide Dismutase (MnSOD) et l'augmentation de l'expression de p53 ont été mises en évidence dans les plaques d'athérosclérose chez l'Homme [393-396]. Schlittenhardt et coll. ont trouvé que le GDF-15 est exprimé par les macrophages après stimulation par de nombreux médiateurs biologiques, dont le TNF $\alpha$ , l'IL-1, les LDL oxydées, la MnSOD, la caspase-3 et p53. Le GDF-15 est supposé contribuer à la modulation de l'apoptose et des processus inflammatoires des macrophages activés. Toutes ces données suggèrent que la surexpression de GDF-15 est associée au développement et à la progression des plaques d'athérosclérose, possiblement par la régulation des processus apoptotiques [397]. Pour appuyer les précédentes assertions, une autre étude a démontré que la déficience en GDF-15 atténuait l'athérogenèse précoce et améliorait la stabilité de la plaque par atténuation du chimiotactisme des macrophages, médié par les récepteurs CCR2. De plus, la déficience en GDF-15 dans les leucocytes améliore la stabilité de la plaque d'athérosclérose par perturbation de la migration des macrophages et en stimulant le dépôt de collagène. Une autre fonction nouvellement découverte du GDF-15 est de réguler le chimiotactisme CCR2-dépendant des macrophages, via les récepteurs de type II des TGF- $\beta$  et ses effecteurs en aval [398]. Le GDF-15 contrôle

aussi le processus inflammatoire des cellules. La déficience en GDF-15 atténue l'athérosclérose par régulation de la réponse inflammatoire dépendante de l'IL-6. Chez la souris, cette déficience a pour résultat l'inhibition de l'athérosclérose, et une augmentation de la densité cellulaire dans les lésions athérosclérotiques. Ces données impliquent ainsi que l'inhibition de l'apoptose agirait comme un processus anti-athérogénique. La régulation de l'apoptose par le GDF-15 peut représenter une stratégie thérapeutique dans le contrôle de l'athérosclérose et de la progression de la plaque [387]. Finalement, d'une part les taux de GDF-15 sont augmentés chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires [399] chez qui des taux élevés de GDF-15 aggravent le risque d'athérosclérose ; et d'autre part, la déficience en GDF-15 dans les leucocytes protège vis-à-vis de l'athérosclérose [398].

## **2. GDF-15 dans les maladies coronariennes et l'infarctus du myocarde**

La pathologie coronarienne est une pathologie chronique, incluant différents syndromes cliniques tels l'angor stable et les syndromes coronaires aigus (SCA). Les taux circulants de GDF-15 sont élevés chez les patients admis à l'hôpital pour un SCA, ce qui a été mis en évidence chez les patients SCA ST- (sans surélévation du segment ST) de l'essai GUSTO-4 [400]. Les individus présentant des taux élevés de GDF-15 (>1 800 ng/L) ont un risque de mortalité élevé à un an [399]. Cependant, les taux de GDF-15 élevés jouent un rôle bénéfique au cours de la procédure invasive telle que l'angioplastie coronaire transluminale percutanée. Dans l'essai FRISC-II, seuls les patients avec des taux de GDF-15 supérieurs à 1 200 ng/L, plus particulièrement ceux avec des taux supérieurs à 1 800 ng/L, bénéficiaient d'une réduction significative du risque dans le critère combiné de mort ou IDM avec la même stratégie invasive [401].

L'étude « *Dallas Heart Study* » a suggéré que les taux élevés de GDF-15 sont associés au degré de calcification des artères coronaires et à la mortalité cardiovasculaire. Les individus présentant des taux supérieurs ou égaux à 1 800 ng/L sont plus à risque de décès d'origine cardiovasculaire ou de toute-cause, comparés aux patients dont les taux sont inférieurs à 1 200 ng/L. Les taux élevés sont associés avec l'âge avancé, le diabète, la dysfonction rénale et les marqueurs inflammatoires. Ces taux sont également plus élevés chez les patients de peau de couleur noire et sont associés au tabagisme, et à l'HTA. Les taux de NT-proBNP sont faiblement associés avec les taux de GDF-15 et il n'existe aucune association ni avec l'IMC ni avec le sexe [402].

Récemment, il a été mis en évidence que les taux élevés de GDF-15 circulant, mesurés chez les sujets avec IDM aigu, sont bien corrélés avec les biomarqueurs de l'inflammation, suggérant ainsi un lien entre GDF-15 et inflammation dans ce contexte [322, 401].

Sur un modèle murin d'IDM, de récentes études ont démontré que le GDF-15 protégeait des ruptures cardiaques fatales. L'induction locale de GDF-15 dans la zone infarctée réduisait la rupture cardiaque par action anti-inflammatoire et en réprimant le recrutement de cellules myéloïdes dans cette zone [386]. Le GDF-15 inhibait aussi l'activation des intégrines- $\beta$ 2 déclenchée par les chimiokines dans les cellules myéloïdes. Ainsi, le GDF-15 serait un inhibiteur de l'intégrine leucocytaire qui constitue l'un des composants essentiels dans l'induction de lésions cellulaires et de fragilité de la paroi après IDM.

### 3. GDF-15 dans l'hypertrophie cardiaque

L'hypertrophie cardiaque est typiquement caractérisée par un élargissement de la taille cœur associé à une augmentation de celle des cardiomyocytes en réponse à des stimuli physiologiques, tels que l'exercice, mais aussi pathologiques comme l'HTA, les cardiomyopathies ischémiques, l'insuffisance valvulaire, les agents infectieux ou encore les mutations géniques codant pour les protéines du sarcomère [342]. Les patients hypertendus sont plus susceptibles de développer une HVG [403]. L'HVG augmente le risque d'AVC, de pathologies coronariennes, d'IC congestive, d'arythmies, tous ces événements étant associés à la morbi-mortalité cardiovasculaire comme à la mortalité toute cause [404, 405]. Chez les patients hypertendus, les taux sériques de GDF-15 sont significativement plus élevés que chez les individus sains et sont corrélés positivement avec l'épaisseur de la paroi postérieure du ventricule gauche, du septum interventriculaire et de la masse du ventricule gauche [406]. Les taux plasmatiques de GDF-15 sont en outre plus élevés chez les hypertendus avec HVG comparés à ceux sans HVG. Il existe une corrélation positive entre ces taux et l'HVG chez les hypertendus, ce qui conduit à penser que le GDF-15 peut être impliqué dans le développement de l'HVG chez ces patients [406]. Hanatani et coll. ont montré que le GDF-15 pourrait constituer un biomarqueur dans la discrimination entre les cardiomyopathies hypertrophiques et l'HVG hypertensive, le GDF-15 semblant être un prédicteur de l'HVG hypertensive [407]. Une des études menées par Xu et coll. montre que le GDF-15 serait un facteur autocrine/paracrine qui agirait en atténuant l'hypertrophie sur des modèles expérimentaux via les voies de signalisation Smad et des kinases (PI3K et ERK) [342].



Comme décrit plus haut, les voies de signalisation des membres de la famille TGF- $\beta$  se répartissent selon qu'elles sont dépendantes ou indépendantes de Smad. Le GDF-15 active les récepteurs de type 1 (ALK 1-7) et phosphoryle les Smad 2/3 et les Smad 1/5/8, lesquels réalisent une translocation dans le noyau sous la forme d'un complexe hétéromérique avec Smad4 [338]. Smad4 est un médiateur transcriptionnel commun à la voie de signalisation dépendante de Smad. Wang et coll. rapportent que la délétion spécifique de *smad4*<sup>-/-</sup> sur des souris conduit à une hypertrophie cardiaque plus importante et une IC [408]. Xu et coll. suggèrent que la voie dépendante de Smad peut inhiber l'apoptose et apporter une protection contre l'hypertrophie et la fibrose [406]. Le mécanisme protecteur du GDF-15 vis-à-vis de l'hypertrophie cardiaque et de la mort cellulaire se réalise grâce à l'activation des protéines Smad2/3. Alors que la surexpression de Smad2 montre des effets bénéfiques similaires à ceux du GDF-15, la surexpression de Smad6 ou de Smad7 inverse ces effets anti-hypertrophiques [406]. Le traitement par du GDF-15 active aussi de manière transitoire les signaux Akt et ERK1/2 [342]. L'activation d'Akt régule la viabilité des cardiomyocytes [409] tandis que les signaux ERK1/2 contrôlent la survie cellulaire [410]. Ces 2 voies de signalisation sont cardioprotectrices par nature ; ainsi, la plupart de ces données confirment que le GDF-15 est un nouveau facteur aussi bien anti-hypertrophique que cardioprotecteur [342, 376]. De plus, Xu et coll. ont mis en évidence que le GDF-15 exerçait des effets inhibiteurs de l'hypertrophie via des mécanismes indépendants de Smad [342] dont les voies MAPKs, TAK-1 et PI3K/Akt [411]. Enfin, le GDF-15 inhiberait aussi l'hypertrophie myocardique en inhibant la transactivation de l'EGFR et la phosphorylation des kinases en aval, Akt et ERK (Figure 15) [406]. Par contre, lorsque le GDF-15 emprunte la voie Smad1, il en résulte un effet pro-hypertrophique [412].

Récemment, il a été observé que le GDF-15 constituait un nouveau biomarqueur prometteur dans l'IC à fraction d'éjection normale. On retrouve des taux élevés de GDF-15 chez les sujets avec une dysfonction diastolique ventriculaire gauche légère ou modérée à sévère, en présence ou non de coronaropathies ou d'autres facteurs de risque associés [413]. Lok et coll. ont rapporté que les taux élevés de GDF-15 peuvent s'inverser dans une certaine mesure après intervention avec mise en place d'un dispositif d'assistance du VG chez les patients en IC (stade New York Heart Association (NYHA) IV), non-ischémiques et non-valvulaires. Le GDF-15 baisse graduellement après l'implantation, ce qui suggère qu'il peut

représenter un marqueur pronostic permettant de mesurer la réponse à une intervention thérapeutique potentiellement vitale telle que l'implantation de dispositifs d'assistance circulatoire [414]. D'autres études, indiquent que les taux élevés de GDF-15 sont associés à plusieurs processus pathologiques liés à la sévérité et à la progression de l'IC, incluant l'activation neurohormonale, l'inflammation, la mort cardiomyocytaire et la dysfonction rénale. Ces taux élevés sont également reliés à des complications, indépendamment des facteurs de risque clinique et biochimiques établis [375, 415]. Récemment, Chen et coll. ont démontré que l'olmesartan prévient la rupture cardiaque dans un modèle murin d'IDM, par inhibition de l'apoptose et de l'inflammation, et qu'il est associé à une sous-régulation de l'activité de p53 et à une sur-régulation du GDF-15 myocardique [416]. En outre, l'irbesartan induit l'expression cardiomyocytaire du GDF-15 [417]. Ces études indiquent que les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine-II sont susceptibles de réguler l'expression de GDF-15, tout du moins dans des modèles animaux. Cependant, il est nécessaire de mettre en œuvre plus d'études d'intervention thérapeutique dans le but de mieux comprendre l'utilité du GDF-15 en tant que marqueur pronostic au cours de divers désordres cardiovasculaires.

En résumé, le GDF-15 est un marqueur pronostic très prometteur pour les formes légères à modérées de l'IC avec FEVG conservée ou en l'absence de coronaropathies. Cependant, davantage d'études sont nécessaires pour distinguer entre les différentes formes d'IC à l'aide de GDF-15. Les taux élevés de GDF-15 peuvent prédire la mortalité des patients coronariens. Certaines études ont également montré le potentiel d'utilisation du GDF-15 en tant que marqueur pronostic de l'intervention thérapeutique pour divers désordres cardiovasculaire.

Bien que la place du GDF-15 en tant que biomarqueur dans les pathologies cardiovasculaires soit bien établie, son utilisation thérapeutique potentielle fait encore l'objet de débats. Alors que le GDF-15 montre exerce des effets protecteurs contre l'hypertrophie cardiaque, l'augmentation de son expression est néanmoins associée au développement et à la progression des plaques d'athérosclérose. Là aussi, davantage d'investigations seront nécessaires avant de considérer le GDF-15 en tant qu'agent thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires.

## E. GDF-15 et néphropathies

Il existe un lien fort entre pathologies cardiovasculaires et rénales, et des dommages myocardiques sont souvent associés au développement de la protéinurie et de la glomérulosclérose [418]. Ainsi, une élévation des troponines circulantes est communément observée chez les patients en insuffisance rénale chronique (IRC), elle est reliée à l'atteinte cardiaque et est associée à la progression de la maladie rénale et au décès [419]. Les taux élevés de GDF-15 plasmatique sont associés à des cas d'IRC et semblent refléter le rapide déclin de la fonction rénale [420]. Ces taux élevés sont également prédictifs de la détérioration de la fonction rénale [421]. Les études menées pour explorer les lésions rénales sur des modèles animaux suggèrent au moins deux raisons possibles de l'augmentation du GDF-15 au cours des néphropathies : soit le GDF-15 voit son élimination urinaire diminuée, soit sa synthèse est augmentée; la combinaison des deux phénomènes n'étant pas exclue [343, 422]. Dans les néphropathies diabétiques, l'augmentation du GDF-15 urinaire est associée aux lésions du tubule proximal [423], remettant en cause l'hypothèse d'une clairance rénale du GDF-15 abaissée. L'expression rénale apparaît aussi être sur-régulée en réponse à l'acidose métabolique et aux lésions rénales [343]. Dans cette même étude, Van Huyen et coll. ont mis en évidence que les taux élevés de GDF-15 constituent un marqueur prédictif de la mortalité cardiovasculaire chez les patients atteints de néphropathies diabétiques en plus des facteurs de risque cardiovasculaires connus que sont le NT-proBNP et le DFG. Les taux plasmatiques de GDF-15 sont aussi augmentés avec le stade de Mogensen [424] (classification anatomo-fonctionnelle dans les néphropathies du diabète de type 2) et ils constituent ainsi un facteur de risque indépendant de la micro-albuminurie. Etant donné que les taux de GDF-15 présentent une corrélation significative avec la micro-albuminurie et le DFG, le dosage de ce biomarqueur pourrait être utile dans le diagnostic précoce, l'évaluation et la prédiction des complications des néphropathies du diabète de type 2 [425]. Bien que certaines études aient été réalisées dans le but de mettre en évidence une corrélation entre le GDF-15 plasmatique, urinaire et la pathologie rénale, aucune étude à ce jour n'a cependant évalué son potentiel en tant que biomarqueur pronostic de la pathologie rénale après intervention chirurgicale.

# ***HYPOTHESE GENERALE ET OBJECTIFS***

L'utilisation de la CEC distingue la chirurgie cardiaque des autres types de chirurgie. Elle est à l'origine d'un certain nombre de complications postopératoires, notamment des dysfonctions d'organes au niveau cérébral, myocardique, rénal, pulmonaire et d'épisodes infectieux, résultant en une augmentation significative de la morbi-mortalité. La prévention et le contrôle de ces complications sont des points critiques dans l'évolution de la chirurgie cardiaque et dans l'amélioration des événements postopératoires. La détection précoce de ces complications est très importante d'un point de vue clinique, car aujourd'hui de nombreuses interventions thérapeutiques sont disponibles pour prévenir leurs effets délétères. De nombreux biomarqueurs ont fait leur apparition au cours de ces dernières années et fournissent de meilleures informations diagnostiques et pronostiques. Certains biomarqueurs spécifiques sont le reflet de dysfonctions d'organe particulières et constituent donc des outils utiles dans la détection précoce, l'évaluation diagnostique et la stratification du risque de ces complications. L'utilisation des biomarqueurs concerne également l'évaluation de la réponse des patients au traitement. A l'avenir, les dispositifs de surveillance des patients en chirurgie cardiaque devraient inclure l'évaluation d'un ou de plusieurs biomarqueurs, dont chacun sera spécifique d'une complication postopératoire. Un tel dispositif peut aider les cliniciens à mettre en place une prise en charge peropératoire sur-mesure, en s'appuyant sur une pathogenèse et un pronostic quasiment individualisés.

A l'aide d'échantillons plasmatiques provenant de patients inclus dans deux essais cliniques (ARTICLE et PAC/FA) se déroulant dans les services d'Anesthésie-Réanimation et du Bloc de Chirurgie Cardiovasculaire et Thoracique au CHU de Dijon, nos travaux ont été conduits selon deux axes successifs : 1) évaluer la libération et la cinétique plasmatique du GDF-15 au cours de la chirurgie cardiaque et 2) mettre en relation les taux circulants de GDF-15 avec des complications postopératoires de nature myocardique et/ou rénale.

La première partie de cette Thèse, ayant donné lieu à un article dans la revue *PLoS ONE* en 2014 correspond à l'étude de la cinétique plasmatique de GDF-15 au cours de la chirurgie cardiaque et à l'association de ces taux avec des atteintes cardiaques et rénales [426].

La deuxième partie, ayant donné lieu à un article dans la revue *International Journal of Cardiology* en 2015 visait à mettre en évidence le pouvoir prédictif des taux plasmatiques préopératoires de GDF-15 dans la survenue d'IRA postopératoire [427].

## ***MATERIEL ET METHODES***

## I. Cohortes d'étude

Les patients ont été prémédiqués par du midazolam *per os* et de l'hydroxyzine 90 minutes avant l'anesthésie. Les traitements chroniques à indications cardiovasculaires ont été poursuivis jusqu'au jour de la chirurgie, hormis le clopidogrel interrompu 5 jours plus tôt. Avant l'induction de l'anesthésie, un système surveillance hémodynamique complet a été mis en place dans le bloc chirurgical. L'anesthésie a été induite par du midazolam (0,02 mg/kg), sufentanil (0,2 à 0,5 µg/kg/h) et propofol (1,5 à 2,5 mg/kg). Après vérification de la correcte ventilation manuelle, le dibesylate de cisatracurium a été administré (0,06 mg/kg/h). Les patients ont été intubés et ventilés avec une FiO<sub>2</sub> à 0,4. L'anesthésie a été maintenue avec sufentanil et cisatracurium si besoin et à l'aide d'un anesthésique halogéné (sévoflurane ou desflurane) par voie pulmonaire.

La chirurgie a été réalisée selon la procédure suivante : sternotomie, prélèvements des artères mammaires droites et gauches plus ou moins la veine saphène, cannulations aortique et cavoatriale suivies de la mise en place de la CEC et de la protection myocardique par cardioplégie antérograde. Une hypothermie corporelle modérée à 32°C est requise. Les patients ont été héparinisés à la dose de 300 UI/kg jusqu'à l'obtention d'un TCA>300 sec. Le temps entre le déclampage et l'arrêt de la CEC ont été enregistrés. Après réalisation des PAC (de 1 à 5 chez les patients de l'étude), la CEC a été arrêtée et la protamine injectée pour neutraliser l'héparine (1 mg de protamine pour 100 UI d'héparine administrée). Pour la chirurgie sans assistance de CEC, l'accès chirurgical au cœur s'est fait à l'aide d'une sternotomie médiane chez tous les patients. La chirurgie *off-pump* a été réalisée grâce à l'utilisation de Cor vasc (Coroneo, Montréal, Canada). Une pince de clampage aortique, un gel d'occlusion temporaire LeGoo\* (Sanofi, Paris, France), sont habituellement utilisés pour la réalisation des anastomoses proximales. Quant à la technique à utiliser, le choix était défini en fonction de l'anatomie des coronaires.

Les patients ont reçu une transfusion sanguine dans les cas d'anémie sévère (hématocrite inférieure à 22% au cours de la CEC, ou à 26% après CEC). Après fermeture du sternum, les patients ont été transférés en réanimation chirurgicale puis dans le service de chirurgie cardiovasculaire. Les paramètres cliniques et biologiques ont été régulièrement relevés. Les complications telles que les arythmies, les hémorragies, les infections et les atteintes d'organes ont été notées, ainsi que les durées de séjours hospitaliers.

## A. Etude ARTICLE

### 1. Justification scientifique

#### a) *Rationnel*

Il a été démontré que la CEC était responsable d'une réponse inflammatoire généralisée dont l'origine est multifactorielle : contact du sang avec les éléments non biologiques du circuit de CEC et avec l'air, stress chirurgical, anesthésie, ischémie-reperfusion, endotoxémie, modifications de l'hémostase... Ce phénomène s'accompagne d'une libération de médiateurs inflammatoires, d'une activation des plaquettes, des polynucléaires neutrophiles et des monocytes qui sont capables d'adhérer à l'endothélium et de libérer des substances cytotoxiques, en particulier des enzymes protéolytiques et des radicaux libres oxygénés. Cette réponse inflammatoire contribuerait à la dysfonction multi-organe, mais aussi myocardique, puisque l'ensemble de ces médiateurs circulant dans le circuit de CEC sont introduits dans le cœur au moment de la reperfusion. Les radicaux libres ainsi que les protéases et les cytokines libérés dans le cadre de cette inflammation conjugueraient leurs effets sur le myocarde précédemment ischémié. Ainsi, la diminution de l'inflammation pourrait permettre d'améliorer la protection systémique, et par la même occasion la protection myocardique. Des travaux conduits antérieurement au Laboratoire ont montré qu'au cours de la chirurgie cardiaque associée à la CEC, une production intense et graduelle d'espèces radicalaires, particulièrement de radicaux libres secondaires de type alkyle et alkoyle, se produisait au niveau de la circulation systémique. Au moment du déclampage aortique, une accélération de la production d'espèces radicalaires était observée dans le sinus veineux coronaire, mais son amplitude en était masquée par la prédominance des radicaux produits au niveau de la circulation systémique. Nous avons pu mettre en évidence une corrélation positive entre la concentration des adduits radicalaires, la durée de la CEC et la concentration post-opératoire de créatine phosphokinase musculaire (CPK-MB) [78].

Par la suite, nous avons conduit un nouveau travail dans lequel nous avons tenté de juguler la réponse inflammatoire induite par la CEC en combinant plusieurs procédés à visée anti-inflammatoire : circuits de CEC recouverts de Duraflon-Héparine, doses élevées d'aprotinine et hémofiltration pré-CEC. Dans le plasma des patients traités par la combinaison anti-inflammatoire, on retrouvait moins de protéine C-réactive, d'interleukine-6, de CPK-MB, de



troponine I, d'acide lactique et surtout de radicaux libres secondaires de type alkyle et alkoxy. Ces patients présentaient en outre moins de complications post-opératoires et une durée réduite de temps d'hospitalisation en unité de soins intensifs [428].

Toutefois, il semble aujourd'hui essentiel de poursuivre ce travail en explorant plus avant le rôle de modulateurs du stress oxydant induit par la chirurgie cardiaque associée à la CEC, et dans ce cadre nous souhaiterions plus particulièrement étudier le rôle du GDF-15 dans ce contexte.

Le growth differentiation factor-15 (GDF-15, connu aussi sous le nom de macrophage inhibitory cytokine-1 ou MIC-1) est un membre éloigné de la superfamille du transforming growth factor- $\beta$ . Alors que le GDF-15 peut promouvoir la mort cellulaire dans un certain nombre de lignées cellulaires tumorales, d'autres expériences de cultures cellulaires suggèrent que le GDF-15 peut aussi se comporter comme un facteur de survie cellulaire, ce qui indique que le GDF-15 joue certainement un rôle décisif dans l'exécution des programmes de mort ou de survie cellulaire. Récemment, il a été montré sur des cardiomyocytes soumis à une ischémie reperfusion que le GDF-15 était induit de manière majeure par le stress oxydant. D'autre part, in vivo, le GDF-15 est fortement induit dans le myocarde infarci de souris, mais aussi dans des échantillons de tissus ventriculaires prélevés sur des patients décédés d'infarctus du myocarde. Toutefois, les sources cellulaires, les facteurs d'induction et les effets fonctionnels du GDF-15 dans le système cardiovasculaire ne sont pas aujourd'hui complètement élucidés. Alors que dans des conditions expérimentales le GDF-15 semble constituer un facteur de survie bénéfique pour les cellules du myocarde, en situation clinique, les données suggèrent un rôle étonnamment antithétique. En effet, les résultats initiaux de l'étude Women's Health Study, montrant que les taux sériques de GDF-15 constituaient un facteur de risque d'événements cardiovasculaires délétères ont été renforcées par des travaux plus récents chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique, de coronaropathie ou d'infarctus du myocarde, pour lesquels le GDF-15 s'est révélé comme un nouveau biomarqueur puissant du risque de mortalité, fournissant des informations pronostiques supérieures à celles des marqueurs cliniques et biochimiques classiques. Il semble ainsi totalement paradoxal qu'un facteur qui a été démontré comme protecteur vis-à-vis des altérations myocardiques de l'ischémie ou de l'hypertrophie dans des études expérimentales soit unanimement associé à un plus grand risque cardiovasculaire

dans des études cliniques. Toutefois, aucune donnée n'existe à l'heure actuelle sur le GDF-15 produit dans un contexte de chirurgie associée à la circulation extracorporelle, et sur son rôle éventuel de marqueur du risque cardiovasculaire du patient.

### *b) Hypothèse de recherche*

Notre hypothèse est que le GDF-15, induit par le stress oxydant, puisse être bénéfique pour les cardiomyocytes qui le libèrent, mais qu'il peut se révéler néfaste pour d'autres types cellulaires du système cardiovasculaire, comme les cellules endothéliales ou musculaires lisses. Une possibilité à envisager est que le GDF-15 puisse être à l'origine de dysfonctions de la microcirculation, qui se manifesteraient par des défaillances de perfusion ou de reperfusion d'organes, dans des situations cliniques telles que la revascularisation post-infarctus du myocarde, ou lors de la reperfusion post-CEC.

## **2. Objectifs et critères d'évaluation**

L'objectif principal consistait à évaluer s'il existe une augmentation des niveaux circulants de GDF-15 et des marqueurs circulants de souffrance tissulaire après une chirurgie cardiaque associée à la circulation extracorporelle (CEC) chez des patients coronariens stables. Ainsi le critère d'évaluation principal était l'augmentation de la concentration plasmatique de GDF-15 au cours de la chirurgie cardiaque associée à la CEC chez des patients coronariens stables.

Les objectifs secondaires visaient à mettre en évidence si l'augmentation des taux de GDF-15 circulant au cours des phases associées et/ou consécutives à la CEC, peut constituer un indicateur du risque de dysfonction des organes avec pour critères de jugement secondaires l'évaluation des facteurs associés à la souffrance tissulaire :

- Systémique (lactates) ;
- Myocardique (troponines cardiaque, Nt-proBNP, CPK-MB) ;
- Rénale (créatininémie, urémie, NGAL) ;
- Hépatique (transaminases, facteur V, bilirubine).

D'autres critères de jugement secondaires ont été pris en compte notamment ceux relatifs au stress oxydant (pouvoir antioxydant du plasma, hydroperoxydes plasmatiques et myéloperoxydase) et à l'inflammation (CPR ultrasensible).

### 3. Population

#### a) *Justification statistique de la taille de l'échantillon*

Le critère principal de jugement porte sur l'augmentation de GDF15 après chirurgie cardiaque et CEC chez des patients coronariens. Or, il n'existe actuellement aucune donnée dans la littérature ayant évalué les niveaux de ce biomarqueur dans ce contexte. Cependant, il est possible en s'appuyant sur des résultats obtenus dans 2 études similaires de construire les hypothèses suivantes [336] :

- Des travaux similaires issus de notre groupe montrent que chez 11 patients ayant bénéficié d'une chirurgie de pontage sous CEC, il a été observé une augmentation importante (+150%) des niveaux circulants d'un marqueur du stress oxydatif, l'adduit PBN en post CEC, qui passe de  $10 \pm 2$  nM avant CEC à  $25 \pm 8$  nM après la CEC ( $p < 0.05$ ) [78].
- Les travaux expérimentaux suggèrent une augmentation notable (X7) rapide (<3H) et significative ( $p < 0.01$ ) de l'expression myocardique de GDF15 après une séquence ischémie/reperfusion [336].

Ainsi, compte tenu de ces éléments, une libération importante de libération du GDF15 dans la circulation périphérique après CEC peut être attendue. De plus, sa cinétique de libération est compatible avec notre protocole expérimental. En outre, l'analyse des données pré-cliniques en utilisant un test ELISA similaire (BioVendor GmbH, Heidelberg, Germany) sur des patients STEMI avant reperfusion [429] précise les éléments suivants : la concentration sérique de GDF-15 a une limite inférieure de détection du GDF15 de 30.2 pg/ml, avec un coefficient de variation intra- et inter-essai de moins de 10% (respectivement 4.3% and 7.8%) et une valeur médiane d'environ 2000 pg/ml.

Ainsi, en posant une hypothèse réaliste d'un taux avant CEC de 2000 pg/ml et après CEC de 2500 pg/ml, avec un écart type commun de 600 ng/ml, la taille de l'échantillon attendue est de 23 patients avec un risque  $\alpha$  de 5% et une puissance de 80%. Afin de tenir compte d'éventuelles exclusions a posteriori et garantir la puissance de l'analyse, un effectif de 34 patients sera donc retenu pour notre étude.

Ainsi 34 patients présentant une pathologie coronarienne stable et programmés pour PAC sous CEC au CHU de Dijon ont été inclus dans cette étude prospective entre le 26 avril 2012

et le 11 octobre 2012. Le protocole de l'étude était en accord avec la déclaration d'Helsinki et approuvée par le comité d'éthique régional (Espace éthique de Bourgogne/Franche-Comté, CHU de Besançon, Hôpital St Jacques ; Besançon, France, Protocole ARTICLE, 2012-A00184-39). Le consentement écrit libre et éclairé a été obtenu pour chacun des patients. Les critères suivants constituaient les critères d'exclusion ou de non-inclusion des patients : urgences chirurgicales, remplacements valvulaires, SCA survenu au cours des 30 jours précédant la chirurgie, FEVG<30%, pathologies inflammatoires chroniques, maladies infectieuses ou malignes, IRC (DFG<30 mL/min/1,73m<sup>2</sup> selon la formule MDRD simplifiée), patients transplantés et patients sous corticothérapie.

#### 4. Protocole de l'étude

Au cours de tests préliminaires, réalisés afin de déterminer les meilleures conditions de mesures de GDF-15 chez les patients, nous avons évalué les concentrations sériques et plasmatiques de GDF-15 chez cinq sujets volontaires « sains ». Les échantillons sanguins ont été recueillis sur différents types de tubes permettant d'obtenir soit du sérum soit du plasma en présence ou non d'héparine ou d'EDTA (Figure 16). Les taux de GDF-15 obtenus chez ces volontaires sains étaient compris entre 350 et 650 ng/mL et ne semblaient pas être influencés par le type de tube ayant servi au recueil. Par conséquent, nous avons décidé de mesurer les concentrations plasmatiques de GDF-15 sur des prélèvements collectés dans des tubes en présence d'héparine étant donné que l'EDTA a la capacité d'inactiver les réactifs présents dans le test FORT.

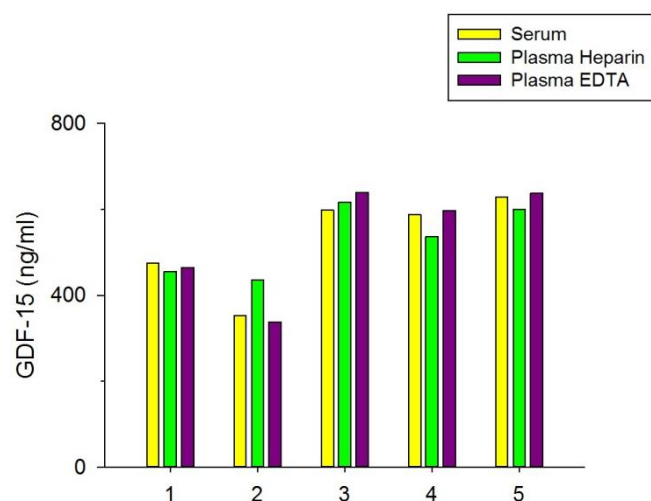


Figure 16. Concentrations du GDF-15 chez des volontaires sains selon le type d'échantillonnage (plasma EDTA, plasma héparine, sérum)

Les échantillons de sang artériel et de sang veineux artérialisé ont été prélevés dans des tubes héparinés à partir du cathéter artériel ou directement depuis le circuit de CEC, après l'induction de l'anesthésie (IND), juste avant la mise en place de la CEC (Pre-CPB), après le déclampage (UNCLAMP), après la chirurgie dans le service de réanimation (Post-SURG) et approximativement 24 h plus tard (ICU) (Figure 17). Les prélèvements sanguins étaient immédiatement centrifugés, et le plasma réparti en aliquotes de 200 µL congelées (azote liquide) et conservées à -80°C jusqu'à analyse. Le lieu de conservation se situait au sein du LPPCM à la faculté de Médecine-Pharmacie de Dijon.

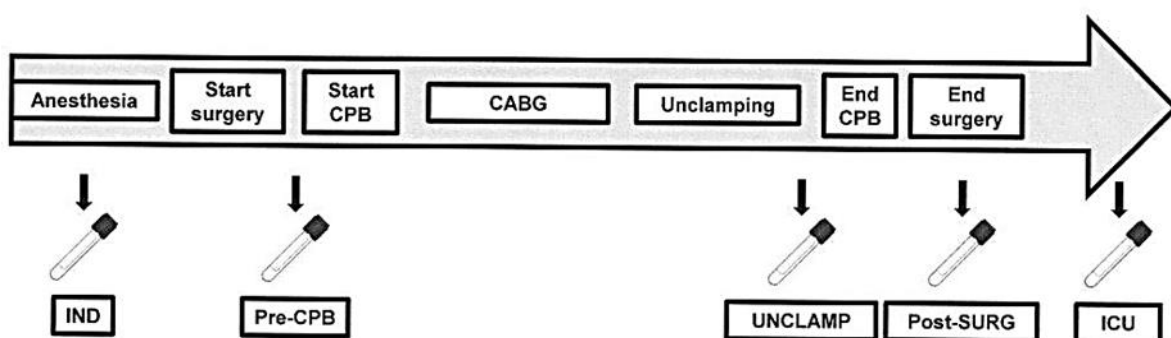


Figure 17. Protocole de prélèvements

## 5. Evènements cliniques

Les critères secondaires d'évaluation cliniques retenus dans notre étude étaient les suivants : séjour hospitalier supérieur à 10 jours, séjour en réanimation chirurgicale supérieur à 5 jours [430], recours à un traitement par vasopresseurs et complications cliniques telles que la transfusion sanguine (indiquée selon les taux postopératoires d'hémoglobémie compris entre 9 et 12g/dL, en prenant en considération les critères d'oxygénation tissulaires ainsi que l'apparition de dysfonctions de nature rénale et pulmonaire) [431], les infections (objectivées par un tableau clinique infectieux ou par la positivité de l'ECBU ayant conduit l'instauration d'une antibiothérapie), la survenue d'une IRA (définie selon les critères de l'AKIN) et de FA. Les associations entre ces évènements et les biomarqueurs ont également été analysées.

## B. Etude PAC/FA

### 1. Population

Dans cette étude, tous les patients ont été opérés par 2 chirurgiens pour PAC au CHU de Dijon de septembre 2011 à mars 2013 et ont été sélectionnés pour participer à cette étude observationnelle prospective. Le protocole de l'étude était en accord avec la déclaration d'Helsinki et approuvée par le comité d'éthique régional (Espace éthique de Bourgogne/Franche-Comté, CHU de Besançon, Hôpital St Jacques ; Besançon, France, Protocole PAC/FA, 2010-A00222-37). Le consentement écrit libre et éclairé a été obtenu pour chacun des patients. Les critères d'exclusion étaient l'âge <18 ans ou >80 ans, antécédents de FA/flutter, antécédents d'IR sévère (DFG <30 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, formule MDRD), antécédents de chirurgie cardiaque, urgence chirurgicale.

La collecte des données cliniques à l'admission était exhaustive et les variables suivantes ont été enregistrées : le sexe, l'âge, les facteurs de risque cardiovasculaires habituels, les pathologies cardiovasculaires et pulmonaires, le traitement médicamenteux chronique et les paramètres échocardiographiques préopératoires. La FEVG a été calculée à partir de la méthode de Simpson et dichotomisée (<45% ou ≥ 45%) pour plus de pertinence clinique. Au cours du séjour en réanimation chirurgicale, tous les traitements médicamenteux administrés (sauf les doses) ont été enregistrés. Les échantillons sanguins ont été prélevés à l'admission et toutes les 24 h. L'IR préopératoire a été définie par un DFG <60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (formule MDRD) [432].

### 2. Evènements cliniques

L'IRA a été définie suivant les critères KDIGO similaires à ceux de l'AKIN (utilisés dans notre première étude) c'est-à-dire une chute brutale (en moins de 48h) de la fonction rénale, définie par une augmentation absolue de la créatininémie d'au moins 26,5 µmol/L (0,3 mg/dL) ou par un pourcentage d'augmentation de la créatininémie supérieure ou égale à 50 % de la valeur de base (\*1,5) [433]. Cependant nous n'avons pas pris en considération la chute brutale de la diurèse dans la définition de l'IRA selon les recommandations du KDIGO, car l'utilisation des critères de diurèse dans le diagnostic et dans la classification est moins bien validée chez les patients pris individuellement ; le jugement clinique doit être pris en compte en incluant les effets des médicaments (diurétiques, vasopresseurs), balance liquide et d'autres facteurs.

Les évènements cliniques après la sortie de l'hôpital étaient enregistrés pour tous les patients. Les données collectées étaient la durée d'hospitalisation en réanimation et totale, la mortalité en réanimation, à la sortie ou à 28 jours. L'ensemble de ces divers critères ont été sélectionnés et collectés de manière rétrospective, l'étude PAC/FA ayant défini d'autres critères de nature cardiaque. En effet, cette étude avait pour objectif principal d'étudier, sur une population de patients bénéficiant de pontages aorto-coronariens avec et sans CEC, les anomalies tissulaires préexistantes et celles induites par la chirurgie et pouvant être associées à la survenue d'une fibrillation atriale *de novo*. Compte-tenu d'une part de l'absence de données dans la littérature concernant les anomalies précitées (taux de fibrose, répartition des connexines dans le tissu atrial) et d'autre part les données préliminaires obtenues dans le cadre d'un protocole de recherche interne au CHU de Dijon, il ne fut pas possible de justifier statistiquement le nombre de patients nécessaires.

Ce nombre dépend :

- 1- De l'incidence de la survenue de fibrillation atriale post chirurgie cardiaque (estimée à 30% dans l'étude pilote réalisée au CHU de Dijon) ;
- 2- Du nombre d'interventions réalisées par an par les chirurgiens (200 interventions) Le service de chirurgie cardiaque du CHU de Dijon a réalisé 704 chirurgies cardiaques avec CEC et 67 sans CEC en 2009. Il a été prévu d'inclure tous les patients opérés pour pontage aorto-coronarien de moins de 80 ans et sans antécédents de fibrillation atriale, en dehors de situations d'urgences, sur le CHU de Dijon soit 100 patients en 2 ans. La répartition fut la suivante : 50 patients opérés sous CEC et 50 patients opérés sans CEC inclus de manière prospective.

## II. Dosages plasmatiques

### A. GDF-15

Les concentrations plasmatiques de GDF-15 ont été mesurées par technique ELISA (Human GDF-15, Quantikine®, R&D Systems® Europe, Lille, France) dont l'intervalle linéaire de concentration se situe entre 200 et 50 000 ng/l. L'intensité de la coloration, en rapport avec la concentration de GDF-15, a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Victor V3, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Une valeur de GDF-15 de 1 200 ng/l correspond à la valeur limite supérieure chez les individus sains (absence d'anomalie à l'ECG, sans

traitements ni pathologie cardiovasculaire ou autre affection aiguë ou chronique et présentant un bilan biologique normal), dont l'âge médian est de 65 ans (25<sup>ème</sup> to 75<sup>ème</sup> percentiles : 59 à 71 ans) tandis que des valeurs comprises entre 1 200 et 1 800 ng/l permettent d'identifier des patients à faible risque (<1 200 ng/l), à risque modéré (entre 1 200 et 1 800 ng/l), ou à haut risque cardiovasculaire (>1 800 ng/l) [321, 434]. Afin de prendre en compte l'hémodilution au cours de la procédure chirurgicale, nous avons corrigé les taux de GDF-15 à l'aide de la protidémie. Les taux protéiques plasmatiques (exprimés en gramme par litre) ont été évalués par la méthode spectrophotométrique selon la technique de Lowry [435]. Les concentrations de biomarqueurs obtenues ont été ainsi corrigées selon l'équation suivante : Valeur corrigée= valeur mesurée \* (C<sub>échantillon</sub>/ C<sub>t0</sub>) où C<sub>t0</sub> correspond à la protidémie mesurée au moment de l'induction (avant la CEC) et C<sub>échantillon</sub>, indique la protidémie du même échantillon aux différents temps de prélèvement (avant CEC, au déclampage, après la chirurgie et en réanimation le lendemain de l'intervention).

## B. Follistatin-like 1

Telle que décrit précédemment, la follistatin-like 1 (FSTL-1) est une glycoprotéine sécrétée de 308 acides aminés appartenant à la famille des follistatines. Elle agit en tant que ligand pour un récepteur de surface des membres de la superfamille des TGF- $\beta$  [380]. La FSTL-1 est une cardiokine dont le taux d'expression est augmenté au cours d'hypertrophie cardiaque ou lors d'infarctus myocardique [381]. De récentes études ont démontré que les actions de la FSTL-1 étaient associées à la suppression à la fois de l'inflammation et de l'apoptose au cours des phénomènes d'ischémie myocardique, se traduisant par une réduction des lésions et des dysfonctions myocardiques [382]. De plus, des taux élevés de FSTL-1 ont été mis en évidence chez des patients victimes de SCA et ont été associés à la survenue d'IC systolique chez cette même population. Par exemple, Widera et coll. ont identifié des taux de FSTL-1 en moyenne de 14,1  $\mu$ g/L chez 1369 patients admis pour SCA dont 78% présentaient des taux supérieurs à 12  $\mu$ g/L, valeur limite supérieure observée sur une population saine [383]. En outre, ces taux de FSTL-1 à l'admission ont été associés à la mortalité cardiovasculaire et ce même après ajustement sur des variables clinico-biologiques (DFG, troponines cardiaques, CRP, Nt-proBNP). D'où son utilisation potentielle en tant que biomarqueur dans les maladies cardiovasculaires [383, 384].



Enfin, de manière intéressante, il a été également démontré que l'expression de FSTL-1 était à la fois suffisante et nécessaires pour la production du GDF-15 [385].

Les concentrations de FSTL-1, dont les taux ont été également corrigés à l'aide de la protidémie, ont été mesurées également par ELISA (Kit ELISA pour FSTL-1, Usbn<sup>®</sup>, Life Science Inc. <sup>®</sup>).

## C. Evaluation du stress oxydant et de l'inflammation

### 1. Le pouvoir antioxydant du plasma

Le pouvoir antioxydant du plasma ou *plasma antioxidant status* (PAS) a été quantifié grâce à la technique Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) qui consiste en l'étude de la cinétique de décroissance de la fluorescence d'une protéine (allophycocyanine APC) en fonction de son degré d'oxydation en présence d'un générateur de radicaux libre [2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)]. L'addition d'une ou plusieurs substances aux propriétés antioxydantes, présentes dans le plasma, ralentit la chute de la fluorescence induite par les espèces radicalaires. Des courbes de décroissance de la fluorescence ont été enregistrées et les aires sous la courbe calculées. Le degré de protection antioxydante en unité ORAC est quantifié à l'aide du Trolox<sup>®</sup> (analogue hydrosoluble de la vitamine E) considéré comme antioxydant de référence, une unité ORAC correspondant à la protection offerte par 1  $\mu$ M de Trolox<sup>®</sup> [78, 436] (Figure 18).

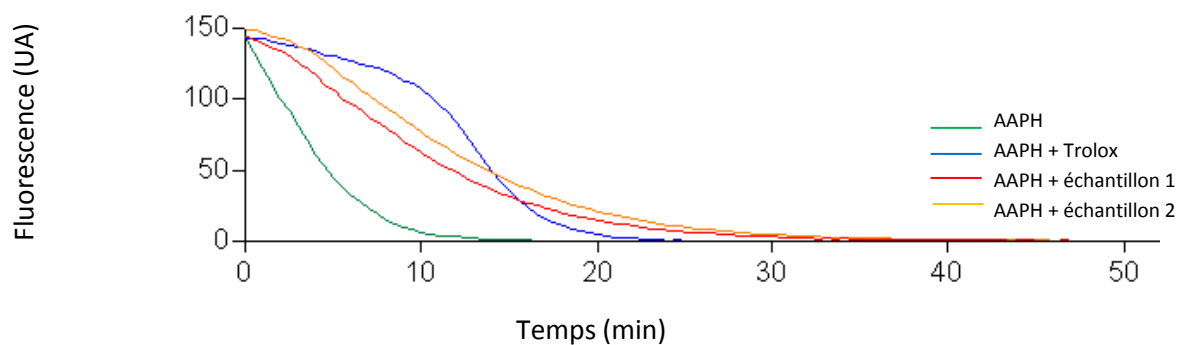


Figure 18. Effets du Trolox<sup>®</sup> et des échantillons plasmatiques sur la décroissance de fluorescence de l'APC

## 2. Les hydroperoxydes plasmatiques

Les concentrations plasmatiques d'hydroperoxydes ont été déterminées par un test colorimétrique à l'aide du test FORT (FORM-PLUS-3000<sup>®</sup>, Optimabio, Ollioules, France), tel que décrit précédemment [437]. Brièvement, en présence d'hydroperoxydes, le fer catalyse la formation de radicaux libres qui sont par la suite piégés par un dérivé aminé. Ce dérivé réagit avec les radicaux libres produisant un radical cationique coloré détectable à 505 nm dont l'intensité est directement corrélée à la concentration en hydroperoxydes selon la loi de Beer-Lambert. La concentration d'hydroperoxydes est exprimée en unité FORT qui correspond à 0,26 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les concentrations d'hydroperoxydes ont été corrigées en regard de l'hémodilution tel que décrits précédemment [435].

## 3. Les myeloperoxydases (MPO)

Les concentrations plasmatiques de MPO ont été mesurées par technique ELISA (Human Myeloperoxidase Immunoassay, Quantikine<sup>®</sup> ELISA, R&D Systems Europe, Lille, France). Les concentrations de MPO ont été corrigées en regard de l'hémodilution.

## D. Evaluation de dysfonction d'organes et caractéristiques des patients

Le NGAL est considéré comme un marqueur précoce de l'IRA [438, 439]. Les concentrations plasmatiques de NGAL ont été mesurées à l'induction, après la chirurgie et à J+1 par technique ELISA (Human NGAL Immunoassay, Quantikine<sup>®</sup> ELISA, R&D Systems Europe, Lille, France).

La numération de formule sanguine standard, la fonction rénale, les gaz du sang, le pH, le lactate, les cTnI ont été mesurées par le plateau technique de biologie du CHU, le jour précédant la chirurgie, avant et après la CEC, et au lendemain de l'intervention. Différentes données des patients ont été collectées : l'âge, le sexe, les facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'HTA, la présence de FA, l'IMC, les dyslipidémies, le diabète sucré et l'IR, mais aussi le statut tabagique et le traitement chronique avant l'admission. Les paramètres hémodynamiques avant l'admission ont été également enregistrés, il s'agit de la fréquence cardiaque et la pression artérielle. Le DFG estimé a été calculé à partir des taux préopératoires de créatininémie en utilisant la formule MDRD simplifiée [432]. L'IRA a été

définie selon les critères de l'AKIN ou de KDIGO comme une chute brutale (en moins de 48 h) de la fonction rénale, définie par une augmentation absolue de la créatininémie d'au moins 26,5  $\mu\text{mol/L}$  (0,3 mg/dL) ou par un pourcentage d'augmentation de la créatininémie supérieure ou égale à 50 % de la valeur de base (\*1,5) [440]. L'EuroSCORE additif a été calculé et nous avons choisi un seuil à 3 pour plus de pertinence clinique.

## **E. Outils statistiques**

### **1. Etude ARTICLE (1er article)**

Les variables continues sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart standard à la moyenne (ESM) ou médiane  $\pm$  intervalle interquartile (interquartile range, IQR) de manière appropriée, et les variables discrètes en nombre absolu ou pourcentage.

Les valeurs pour un temps donné ont été analysées par le test de Student (unpaired t-test) ou par test de Mann-Whitney respectivement pour les variables normalement distribuées ou non. Les résultats sont exprimés sous forme de diagrammes (boîtes à moustaches) au sein desquels chaque diagramme représente les 25ème et 75ème percentiles, ou par la moyenne  $\pm$  ESM.

Les analyses des variances sur rang One Way ou Friedman en mesures répétées ont été utilisées pour analyser les différences entre les groupes au cours du temps, et corrigées pour les comparaisons multiples par le test de Tukey.

Les associations entre les paramètres biologiques et GDF-15 ont été déterminées par le test de corrélation sur rang de Spearman.

Afin de déterminer la valeur diagnostique incrémentale de GDF-15 postopératoire dans la détection précoce de l'IRA comparée aux biomarqueurs conventionnels, une analyse point par point a été réalisée compte tenu du faible nombre d'évènements. Nous avons calculé l'amélioration du Khi2 global après addition de GDF-15 dans le modèle incluant le DFG estimé postopératoire plus ou moins le NGAL.

Une valeur de probabilité de  $p < 0,05$  est considérée comme statistiquement significative.

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant les logiciels SigmaPlot® version 12 (Systat® Software, Inc.) et SPSS 20.00 (SPSS®, Inc., Chicago, IL, USA).

### **2. Etudes PAC/FA et ARTICLE (2nd article)**

Les variables continues sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (standard deviation, SD) lorsqu'elles sont normalement distribuées sinon en médiane  $\pm$  intervalle

interquartile ; les variables catégorielles en valeur absolue (pourcentage). Pour les données continues, la normalité était vérifiée par le test Kolmogorov. Les caractéristiques des groupes IRA et non-IRA étaient comparées par le test exact de Mann-Whitney pour les variables continues et par le test du Chi2 ou le test exact de Fischer pour les variables nominales de façon appropriée. Tous les tests étaient bilatéraux et une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme significative.

Pour les modèles multivariés, les variables étaient sélectionnées sur la base de leur association en analyse univariée avec l'IRA dans cette étude. L'identification exploratoire des facteurs indépendamment associés avec l'IRA a été réalisée à l'aide d'une analyse de régression conditionnelle multivariée descendante avec inclusion et exclusion d'un seuil à 5%. Le NT-proBNP et le GDF-15 n'étant pas normalement distribués, les valeurs ont été transformées en logarithme pour être manipulées dans l'analyse multivariée. Afin d'évaluer le modèle de régression, nous avons utilisé les améliorations des méthodes point par point de Chi2 et du test de maximum log de vraisemblance, incluant l'estimation de la qualité de l'ajustement du Chi2 Hosmer-Lemeshow (HL). Afin d'examiner la discrimination des événements de l'IRA, nous avons examiné l'ASC ROC (sensibilité d'un point versus 1-spécificité pour toutes les valeurs seuils possibles pour les prédictions classifiées) pour les taux préopératoires de GDF-15, NT-proBNP, DFG (formule MDRD) et l'EuroSCORE avec la meilleure sensibilité et spécificité selon l'index de Youden [298]. La valeur seuil est donnée dans la section résultats. Les ASC ROC ont été comparées à l'aide de la méthode de DeLong et coll. [441] pour les données appariées.

Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide des logiciels SPSS® 20.0 0 (SPSS®, Inc., Chicago, IL, USA) et MedCalc® 13.3.1 (MedCalc® Software, Mariakerke, Belgique).

## ***ETUDES CLINIQUES***

# **I. Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) Levels Are Associated with Cardiac and Renal Injury in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting with Cardiopulmonary Bypass (Protocole ARTICLE)**

## **Objectifs**

Notre travail a porté sur des prélèvements sanguins effectués chez des patients opérés pour une chirurgie cardiaque nécessitant la mise en place d'une circulation extracorporelle. Ces prélèvements ont été effectués à différents temps.

Au total, 34 patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque pour PAC sous CEC ont été inclus dans cette étude prospective.

La première partie de notre travail de Doctorat avait pour objectifs d'apprécier si :

- la chirurgie cardiaque associée à la CEC est à l'origine de la libération de GDF-15 au niveau de la circulation,
- l'augmentation des taux de GDF-15 circulant au cours des phases associées et/ou consécutives à la CEC, peut constituer un indicateur du risque de dysfonction des organes, révélateur d'une mauvaise reperfusion de territoires présentant une altération de la microcirculation.

## **Résultats**

Les résultats sur l'ensemble des échantillons mettent en évidence une augmentation des taux circulants du GDF-15 au cours de la chirurgie associée à la CEC et des phases post-opératoires, jusqu'au lendemain. Ces derniers taux sont significativement associés à la durée de la CEC ( $r=0.367$  ;  $p=0.0329$ ).

De plus, la réaction inflammatoire associée au stress nitro-oxydant a été objectivée par l'augmentation importante des taux plasmatiques de MPO avec un pic au moment du déclampage, ainsi que par la diminution, en miroir, du pouvoir antioxydant du plasma.

La NGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin) est une protéine appartenant à la grande famille des lipocalines, et un marqueur précoce de l'insuffisance rénale aiguë, ce que nous avons pu remarquer grâce à l'augmentation très significative des taux plasmatiques de NGAL, de manière bien plus précoce que celle des marqueurs habituels tels que la créatinine et l'urée.

Grâce au recueil des différentes données cliniques et biologiques, nous avons pu mettre en évidence que les paramètres de la fonction rénale (DFG, NGAL, créatinine et urée

plasmatiques) étaient étroitement corrélés aux valeurs plasmatiques du GDF-15, ce qui suggère que le GDF-15 pourrait être considéré comme un marqueur de l'atteinte rénale. De plus, nous confirmons l'atteinte cardiaque grâce à l'élévation des taux de cTnI dont les concentrations plasmatiques postopératoires sont très significativement corrélées à celles du GDF-15. Compte-tenu du risque de confusion concernant l'interprétation des résultats, notamment dû à l'effet de l'hémodilution sur les valeurs de concentrations de GDF-15, nous avons privilégié les mesures qui s'affranchissent du bilan hydrique observé au cours des périodes postopératoires précoces. En effet, les différentes corrélations observées ont été réalisées avec les taux plasmatiques de GDF-15 mesurés le lendemain de l'intervention. Par conséquent, les corrections opérées vis-à-vis de l'hémodilution sont non-significatives et quasi-nulles.

Table II. Comparaison des moyennes des taux plasmatiques de GDF-15 corrigés et non-corrigés par la protidémie en réanimation cardiovasculaire

	GDF-15 (ng/l) REA CCV sans correction	GDF-15 (ng/l) REA CCV avec correction	
Moyenne	2904,5	3074,9	P=0,564
ESM	282,4	284,2	

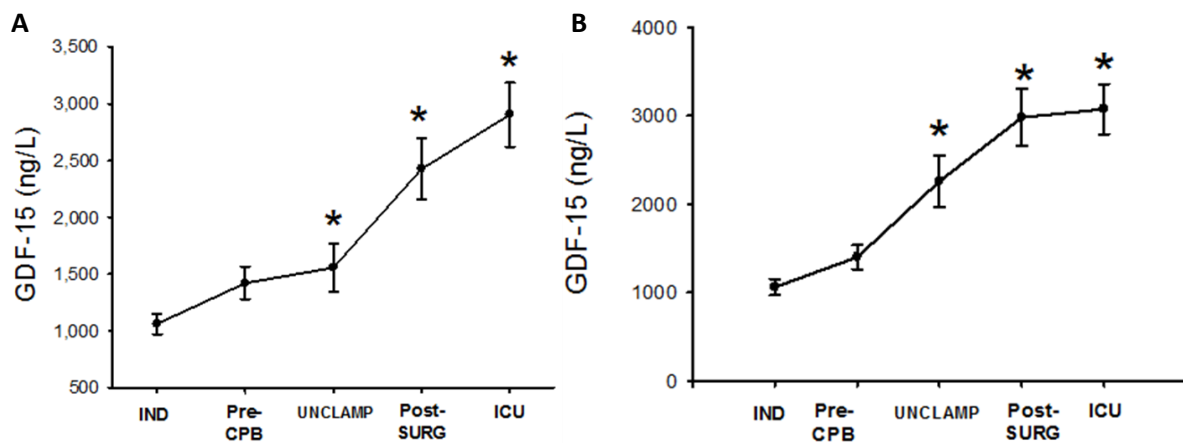


Figure 19. Cinétiques des concentrations plasmatiques de GDF-15 non-corrigées (A) et corrigées par la protidémie (B) au cours des périodes pré-, per- et postopératoires (\* p<0,05).

Enfin, les valeurs de GDF-15 à l'induction, au déclampage et en réanimation sont très significativement associées à l'EuroSCORE, score prédictif de risque de mortalité opératoire chez les patients subissant une chirurgie cardiaque, ce qui confirme les résultats d'une

récente étude montrant que le GDF-15 est un marqueur prédictif indépendant du risque de mortalité et de morbidité chez les patients ayant bénéficié d'une chirurgie cardiaque.

Concernant les mesures de FSTL-1, il s'agit des seuls résultats disponibles sur cette cytokine à ce jour dans le contexte de la chirurgie cardiaque. L'objectif de ce test était de mettre en évidence une potentielle association entre les taux plasmatiques de GDF-15 et ceux de FSTL-1 afin de discriminer l'origine cardiaque et/ou systémique de l'élévation du GDF-15. Nous observons une augmentation progressive mais non-significative des taux plasmatiques de FSTL-1 au cours des périodes post-déclampage contrairement à l'augmentation du GDF-15 qui a lieu plus précocement et de manière très significative. De plus, aucune association significative n'a été mise en évidence entre les taux plasmatiques de GDF-15 et ceux de FSTL-1 bien que ces derniers, mesurés à l'induction, aient été significativement associés à la FEVG ( $r = -0,385$  ;  $p=0,025$ ) et aux concentrations de Nt-proBNP ( $r=0,350$  ;  $p=0,043$ ). Ces résultats s'expliquent par les mesures cardioprotectrices opérées au cours de l'intervention chirurgicale afin de limiter les phénomènes ischémiques et par conséquent les lésions d'I/R qui représentent les déclencheurs de la production de FSTL-1. Ce qui conduit à penser que l'essentiel des taux plasmatiques de GDF-15 est d'origine extracardiaque, du moins au cours des périodes peropératoires et postopératoires précoces. En effet, l'augmentation observée des taux de FSTL-1 au lendemain de l'intervention pourrait être à l'origine de celle des taux de GDF-15. Dans notre étude, cette hypothèse peut être écartée car ces taux respectifs ne semblent pas être associés entre eux ( $r = 0,290$  ;  $p = 0,095$ ).

### Conclusion

Cette étude prospective est la première à apprécier la cinétique des taux plasmatiques de GDF-15 au cours de la chirurgie cardiaque pour PAC sous CEC. Nous avons pu également confirmer l'importance du GDF-15 en tant que biomarqueur des atteintes cardiaques et rénales dans ce contexte de chirurgie cardiaque. Ainsi le dosage du GDF-15 permettrait d'améliorer le diagnostic des complications postopératoires et le suivi de ces patients.





# Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) Levels Are Associated with Cardiac and Renal Injury in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting with Cardiopulmonary Bypass

Abdelkader Kahli<sup>1,2</sup>, Charles Guenancia<sup>1,3</sup>, Marianne Zeller<sup>1</sup>, Sandrine Grosjean<sup>1,2</sup>, Karim Stamboul<sup>1,3</sup>, Luc Rochette<sup>1</sup>, Claude Girard<sup>1,2</sup>, Catherine Vergely<sup>1\*</sup>

**1** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U866, Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardio-Métaboliques (LPPCM), Université de Bourgogne, Facultés des Sciences de la Santé, Dijon, France, **2** Service d'Anesthésie-Réanimation, Centre Hospitalier Régional Bocage Central, Dijon, France, **3** Service de Cardiologie, Centre Hospitalier Régional Bocage Central, Dijon, France

## Abstract

**Objective:** Growth differentiation factor-15 (GDF-15) has been identified as a strong marker of cardiovascular disease; however, no data are available concerning the role of GDF-15 in the occurrence of organ dysfunction during coronary artery bypass grafting (CABG) associated with cardiopulmonary bypass (CPB).

**Methods:** Five arterial blood samples were taken sequentially in 34 patients from anesthesia induction (IND) until 24 h after arrival at the intensive care unit (ICU). Plasma levels of GDF-15, follistatin-like 1 (FLST1), myeloperoxidases (MPO), hydroperoxides and plasma antioxidant status (PAS) were measured at each time-point. Markers of cardiac (cardiac-troponin I, cTnI) and renal dysfunction (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL) and other classical biological factors and clinical data were measured.

**Results:** Plasma GDF-15 levels increased gradually during and after surgery, reaching nearly three times the IND levels in the ICU ( $3,075 \pm 284$  ng/L vs.  $1,061 \pm 90$  ng/L,  $p < 0.001$ ). Plasma MPO levels increased dramatically during surgery, attaining their highest level after unclamping (UNCLAMP) ( $49 \pm 11$  ng/mL vs.  $1,679 \pm 153$  ng/mL,  $p < 0.001$ ) while PAS significantly decreased between IND and UNCLAMP ( $p < 0.05$ ), confirming the high oxidative status induced by this surgical procedure. ICU levels of GDF-15 correlated positively with cTnI and NGAL ( $p = 0.006$  and  $p = 0.036$ , respectively), and also with hemoglobin and estimated glomerular filtration rate (eGFR). Among all the post-operative biomarkers available, only eGFR, NGAL and GDF-15 measured at ICU arrival were significantly associated with the onset of acute kidney injury (AKI). Patients with a EuroSCORE  $> 3$  were shown to have higher GDF-15 levels.

**Conclusions:** During cardiac surgery associated with CPB, GDF-15 levels increased substantially and were associated with markers of cardiac injury and renal dysfunction.

**Citation:** Kahli A, Guenancia C, Zeller M, Grosjean S, Stamboul K, et al. (2014) Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) Levels Are Associated with Cardiac and Renal Injury in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting with Cardiopulmonary Bypass. PLoS ONE 9(8): e105759. doi:10.1371/journal.pone.0105759

**Editor:** Jaap A. Joles, University Medical Center Utrecht, Netherlands

**Received:** April 17, 2014; **Accepted:** July 23, 2014; **Published:** August 29, 2014

**Copyright:** © 2014 Kahli et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from the French Ministry of Research, from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and from the Regional Council of Burgundy. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* Email: cvergely@u-bourgogne.fr

## Introduction

During cardiopulmonary bypass (CPB), pro-inflammatory mediators activate leucocytes, vascular endothelial cells and platelets, thus producing a systemic inflammatory response that results in organ dysfunction, affecting the heart, brain, lungs and kidneys. Several factors, including operative trauma, the contact of blood components with the artificial surface of the circuit, cardioplegic techniques and allogenic blood transfusion account for this phenomenon. The cellular response is mediated by the main effectors of the inflammatory response, including neutrophils, which degranulate and release cytotoxic molecules such as

elastase, myeloperoxidase (MPO) and free radicals[1]. Several therapeutic strategies have thus been developed to minimize this inflammation and lessen organ dysfunction[2]. In a previous study carried out in our laboratory, we measured systemic and coronary sinus free-radical release during and following removal of the cross-clamp[3]. We observed that radical production was significantly greater during and after the CPB procedure, and that circulating free-radical levels correlated with serum creatine kinase-MB (CK-MB). Various biological and hemodynamic markers are measured to estimate the pre-and postoperative risk of developing complications; however, no data exist to assess the

role and impact of growth differentiation factor-15 (GDF-15) in the occurrence of organ dysfunction during coronary artery bypass grafting (CABG) associated with CPB.

GDF-15 (also known as NAG-1 and MIC-1) is a cytokine related to the superfamily of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), and is weakly expressed or not expressed at all under physiological conditions[4]. The plasma concentration of GDF-15 increases under pathological conditions such as hypoxia, inflammation or oxidative stress and is closely associated with all-cause mortality[5]. The expression of GDF-15 has been induced in cultured cardiomyocytes during experimental ischemia/reperfusion (IR), and in cardiomyocytes subjected to nitrosative stress and stimulation with proinflammatory cytokines and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )[6]. In the cardiovascular system, GDF-15 is now identified as a strong prognosis marker in patients with cardiovascular disease, including coronary artery disease (CAD), acute coronary syndromes (ACS)[7,8] and heart failure (HF)[9]. GDF-15 is associated with reduced endothelium-dependent vasodilation, the risk of atherosclerotic plaque rupture and reduced left ventricular ejection fraction (LVEF)[10]. Cardiomyocytes have been identified as the main source of GDF-15 in patients with ST-elevation myocardial infarction (STEMI) or HF[6]. Recent findings also suggested that the secreted protein FSTL-1 could be an upstream inducer of GDF15 production and an independent prognostic biomarker in acute coronary syndromes[11]. Finally, it was suggested that GDF-15 could represent a novel risk marker in association with the EuroSCORE for risk stratification in cardiac surgery patients[12]. In addition, GDF-15 is also a novel independent serum marker of mortality in chronic kidney disease (CKD), and combining this marker with other established predictors of mortality may help to identify individuals at high risk for developing CKD [13,14].

The present study was designed to evaluate the kinetics of plasma GDF-15 levels in patients with significant CAD undergoing cardiac surgery associated with CPB, and to relate GDF-15 to inflammatory/ oxidative stress status and to organ dysfunction.

## Methods

### Study patients

Thirty-four consecutive patients operated on for CABG under CPB at Dijon University Hospital, Bodge Central, Dijon, France were included in this prospective study between April 26<sup>th</sup> 2012 and October 11<sup>th</sup> 2012. The study protocol complied with the Declaration of Helsinki and was approved by the regional ethics committee (Espace éthique de Bourgogne/Franche-Comté, CHU de Besançon, Hôpital St Jacques, Besançon, France; ARTICLE Protocol, 2012-A00184-39). Informed written consent was obtained from all of the patients. Patients with stable CAD were included. The following criteria led to the exclusion of patients: surgical emergencies, aortic valve replacement, ACS reported within 30 days before the surgery, LVEF <30%, chronic inflammatory pathologies, infectious or malignant diseases, chronic renal failure, transplant patients and patients treated with corticosteroids.

### Clinical postoperative events

Clinical events were defined as hospital stay >10 days, intensive care unit (ICU) stay >5 days, the use of vasopressor therapy and clinical complications (blood transfusion, infection, acute kidney injury and atrial fibrillation).

The association between these events and biomarkers was also analyzed.

### Anesthesia and heart surgery procedure

Patients were pre-medicated with midazolam orally plus hydroxyzine 90 min before anesthesia. Routine cardiac medications were continued until the morning of the surgery, except for Clopidogrel, which was stopped at least 5 days earlier. Before the induction of anesthesia, a complete hemodynamic monitoring system was set up in the operating room. Anesthesia was induced with intravenous midazolam (0.02 mg.kg<sup>-1</sup>), sufentanil (0.2 to 0.5  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), and propofol (1.5 to 2.5 mg.kg<sup>-1</sup>). After verifying that manual ventilation was satisfactory, cisatracurium dibesylate (0.06 mg.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) was injected. Patients were orally intubated and ventilated with FiO<sub>2</sub>: 0.4. Anesthesia was maintained with sufentanil and cisatracurium as required and inhaled desflurane.

Surgery was performed according to the following protocol: sternotomy, harvesting of the right and left internal mammary arteries and saphenous vein, and aortic and cavoatrial cannulation, followed by the implementation of CPB and myocardial protection by antegrade cardioplegia. Moderate body hypothermia (32°C) was used. The time from removal of the aortic cross-clamp until the discontinuation of CPB was measured. After completion of the CABG (from 1 to 5 CABG in the patients studied), CPB was discontinued and protamine was given for heparin reversal. Patients were given a blood transfusion in the case of severe anemia (blood hematocrit, 22% during CPB or, 26% after CPB). After closure of the sternum, the patients were transferred to the post-operative ICU, and finally to the surgery ward. Clinical and biological parameters were regularly recorded. Complications such as arrhythmia, blood loss, infection, and organ failure were recorded. ICU length of stay was noted.

### Study protocol

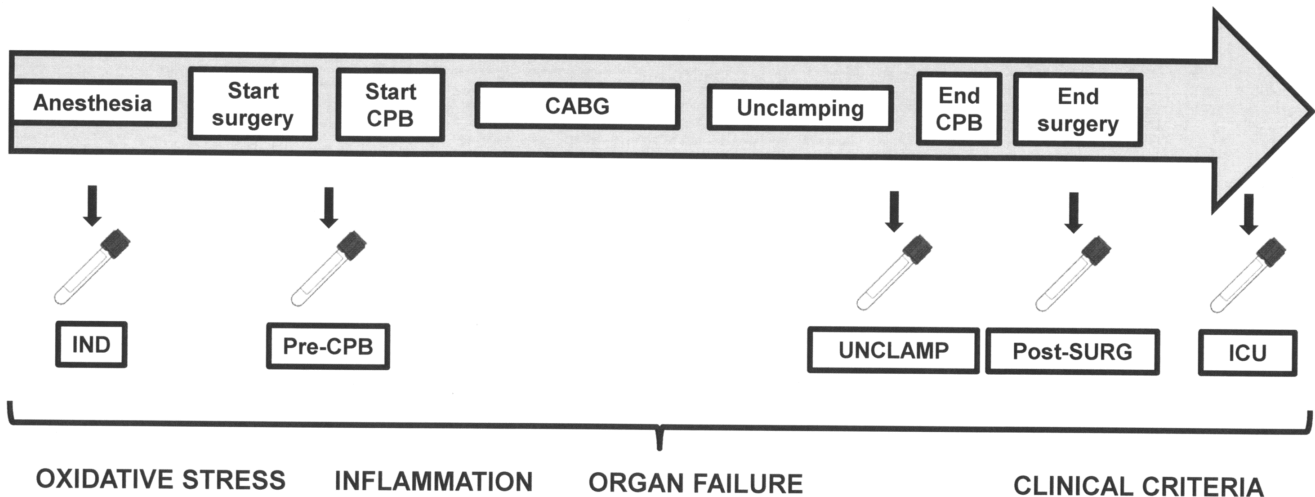
Blood samples were taken in heparinized tubes as shown in Figure 1. Arterial samples were taken from the arterial catheter or from the CPB pump: after anesthesia (IND), just before starting CPB (pre-CPB), just after removing the cross clamp (UNCLAMP), after surgery (Post-SURG) upon arrival and after 24 hours at the ICU. Blood samples were immediately centrifuged after collection and the plasma was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

### Plasma levels of GDF-15 and follistatin like-1 during cardiac surgery with CPB

Plasma GDF-15 concentrations were measured by quantitative sandwich enzyme immunoassay (Human GDF-15, Quantikine, R&D Systems Europe, Lille, France) with a linear range from 200 to 50,000 ng/L. The color intensity, relative to GDF-15 concentration, was measured at 450 nm with a spectrophotometer (VictorV3, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). A GDF-15 value of 1,200 ng/L corresponds to the upper limit of normal in healthy elderly individuals, whereas GDF-15 levels of 1,200 and 1,800 ng/L allowed the identification of patients at low (<1,200 ng/L), intermediate (between 1,200 and 1,800 ng/L), or high risk (>1,800 ng/L)[7,15]. Plasma follistatin like-1 protein (FSTL-1) concentrations were measured by a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique (ELISA kit for FSTL-1, Uscn, Life Science Inc). In order to account for hemodilution, plasma GDF-15 and FSTL-1 levels were corrected using proteinemia.

### Oxidative stress/inflammation analysis

The plasma antioxidant status (PAS) was determined by measuring the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), as detailed elsewhere[3,16]. The results were expressed in ORAC



**Figure 1. Schematic diagram of the study protocol.** Arterial blood samples were harvested after anesthesia (IND), just before starting CPB (pre-CPB), just after removing the cross clamp (UNCLAMP), after surgery upon arrival in the ICU (Post-SURG) and after 24 hours at the cardiovascular intensive care unit (ICU). Markers of oxidative stress, inflammation, organ failure and clinical criteria were collected.  
doi:10.1371/journal.pone.0105759.g001

units, where 1 ORAC unit equals the net protection provided by 1  $\mu\text{M}$  Trolox. Plasma antioxidant status is a dynamic measurement and does not need to be corrected for hemodilution. Plasma MPO concentrations were measured by a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique (Human Myeloperoxidase Immunoassay, Quantikine ELISA, R&D Systems Europe, Lille, France). Plasma concentrations of hydroperoxides were determined by a colorimetric assay using Free Oxygen Radical Testing (FORT, FORM-PLUS-3000, Optimabio, Ollioules, France), as previously described[17]. The hydroperoxide concentrations were corrected for hemodilution.

Plasma protein concentrations (expressed as grams per liter of plasma) were evaluated by the spectrophotometric method according to Lowry *et al.*

### Markers of organ dysfunction

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is considered an early marker of acute kidney injury (AKI)[18,19]. Plasma NGAL concentrations were measured at IND, post-SURG and ICU by a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique (Human NGAL Immunoassay, Quantikine ELISA, R&D Systems Europe, Lille, France). Standard blood count, platelet count, renal enzymes, blood gases, pH, lactic acid, cardiac troponin-I (cTnI) were measured by the hospital's medical analysis laboratory the day before (DAY-1), before (PRE-CPB) and after CPB (post-SURG) and at the first postoperative day (ICU). The following patients' data were collected: age, sex, and cardiovascular risk factors (hypertension, atrial fibrillation, body mass index (BMI), dyslipidemia, diabetes mellitus and renal failure), current smoker and chronic medications before admission. Hemodynamic parameters on admission (heart rate, systolic blood pressure) were recorded. LVEF was measured by echocardiography at admission and during the postoperative hospital stay. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated from pre-operative plasma creatinine by the abbreviated Modifications of Diet in Renal Disease equation[20]. AKI was defined in accordance with the AKI network (AKIN) criteria as an abrupt decrease (in 48 h) in renal function, defined by an increase in absolute serum creatinine (SCr) of at least 26.5  $\mu\text{mol/L}$  (0.3 mg/dL) or by a percentage increase in SCr  $\geq 50\%$  ( $1.5\times$  baseline

value), or by a decrease in the urinary output (documented oliguria  $<0.5$  mL/kg/h for more than 6 h)[21]. The additive EuroSCORE was calculated, and a cut-off at 3 was used for more clinical relevance.

### Statistical analyses

Continuous variables are presented as mean  $\pm$  SEM or median (IQR) as appropriate, and discrete variables as absolute number and percentages.

Given time points were analyzed by Student's un-paired t-test or the Mann-Whitney test for normally or not normally distributed data, respectively. Results are expressed as box plots in which the boxes represent the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles, or as means+SEM.

One Way Repeated Measures Analysis of Variance or Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks was used to analyze differences within groups over time, and corrected for multiple comparisons by the Tukey test. A probability value of  $<0.05$  was considered statistically significant.

Associations between laboratory parameters and GDF-15 were tested using Spearman's correlation rank test.

To determine the incremental diagnostic value of post-operative GDF-15 in the early detection of AKI compared with conventional biomarkers, a stepwise analysis was performed given the limited number of events. We calculated the improvement in global  $\chi^2$  after the addition of GDF-15 to a model that included post-operative eGFR and eGFR plus NGAL.

A probability value  $<0.05$  was considered statistically significant.

Statistical analyses were performed using SigmaPlot version 12 (Systat Software, Inc.) and SPSS 20.0 0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

### Results

Perioperative clinical and laboratory information is shown in Table 1 (left part). The mean age of patients was  $65\pm 2$  years. Preoperative LVEF was  $58\pm 2\%$  and the mean EuroSCORE was 2.9. Initial plasma GDF-15 levels (IND) ranged from 456 to 2,832 ng/L with a mean value of  $1,061\pm 91$  ng/L.

**Table 1.** Association between induction plasma GDF-15 concentration and baseline clinical and biological variables<sup>1</sup>.

		Mean (IQR) of plasma GDF-15 concentration (ng/L)	p	r
Gender	M n=27 (79%)	961 (605–1401)	0.418	
	F n=7 (21%)	827 (752–935)		
Age (year)(mean ± SEM)	65.2±1.7		0.005	0.477
Medical history				
Hypertension	Yes n=25 (74%)	935 (787–1443)	0.101	
	No n=9 (26%)	761 (572–1092)		
Diabetes	Yes n=14 (41%)	1002 (881–1672)	0.011	
	No n=20 (59%)	825 (593–1109)		
Hyperlipidemia	Yes n=31 (91%)	883 (743–1347)	0.903	
	No n=3 (9%)	1290 (587–1334)		
Obesity	Yes n=10 (29%)	935 (853–1745)	0.234	
	No n=24 (71%)	855 (614–1323)		
Weight (kg)(mean ± SEM)	79.4±2.8		0.109	0.279
BMI (kg/m <sup>2</sup> )(mean ± SEM)	28.0±0.8		0.196	0.226
Smoking	Yes n=9 (26%)	861 (683–1251)	0.725	
	No n=25 (74%)	935 (692–1340)		
Chronic renal failure (GFR <60 mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	Yes n=5 (15%)	1645 (884–2594)	0.046	
	No n=29 (85%)	877 (674–1174)		
Creatinine (μmol/L)(mean ± SEM)	87.6±3.2		0.019	0.398
Glomerular filtration rate (GFR) (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )(mean ± SEM)	80.4±3.3		0.006	−0.465
Urea (mmol/L)(mean ± SEM)	6.9±0.4		0.105	0.282
NGAL (μg/L)(mean ± SEM)	108.3±6.1		0.220	0.215
Infarction	Yes n=6 (18%)	923 (589–1168)	0.635	
	No n=28 (82%)	884 (745–1388)		
PCI	Yes n=6 (18%)	951 (765–1204)	0.874	
	No n=28 (82%)	881 (667–1344)		
LVEF (%) (mean ± SEM)	58.0±1.9		0.328	−0.172
EuroSCORE (mean ± SEM)	2.9±0.4		0.0003	0.585
Cardiac status				
Troponin>0.02 μg/L	Yes n=7 (21%)	987 (587–1402)	0.898	
	No n=27 (79%)	884 (743–1334)		
Creatine kinase (IU/L)(mean ± SEM)	139.7±14.2		0.717	0.064
NT-proBNP (pg/mL)(mean ± SEM)	594.1±113.3		0.044	0.347
Inflammatory and oxidative stress (mean ± SEM)				
CRP>3 mg/L	Yes n=5 (15%)	1541 (881–2594)	0.041	
	No n=29 (85%)	861 (623–1208)		
Fibrinogen (g/L)	3.5±0.1		0.100	0.571
Hydroperoxides (mmol/L)	2.1±0.1		0.547	0.106
PAS (ORAC)	3619.2±137.5		0.900	−0.022
Myeloperoxidase (ng/mL)	49.3±10.8		0.216	0.217
Lactate (mmol/L)	1.1±0.1		0.003	−0.490
Biological variables (mean ± SEM)				
Hemoglobin pre op (g/dL)	13.0±0.3		0.156	−0.248
Hematocrit (%)	39.9±0.9		0.137	−0.260
Blood glucose (mmol/L)	7.5±0.8		0.006	0.464
ASAT (IU/L)	22.4±1.2		0.055	−0.332
ALAT (IU/L)	36.7±2.1		0.018	−0.404

<sup>1</sup>p-value and Spearman's rank correlation was for used for testing the association of GDF-15 at IND to the baseline clinical and biological variables.  
doi:10.1371/journal.pone.0105759.t001

Intraoperative data and postoperative outcomes are shown in Table 2. The majority of patients ( $n = 21$ ) underwent three bypass grafts. Nine patients with LVEF<40% received an infusion of Glucose-Insulin-Potassium (GIK) (potassium 40 mEq and regular insulin 300 IU in 500 ml of 30% glucose) one hour before aortic clamping. All of the patients were still alive on 31<sup>st</sup> October 2013.

### Plasma levels of GDF-15 and FSTL-1 during cardiac surgery with CPB

Compared with IND levels, plasma GDF-15 concentrations rose significantly ( $p < 0.05$ ) after removal of the cross-clamp and during the post-surgery period in the ICU, reaching nearly three times the induction level (Figure 2A). Plasma FSTL-1 levels were not modified during the surgical procedure. However, a slight rise in FSTL-1 was observed in the ICU (Figure 2B).

Clinical and biological variables associated with IND plasma GDF-15 concentrations are shown in Table 1 (right part). GDF-15 levels were significantly associated with age ( $r = 0.477$ ,  $p = 0.005$ ). A medical history of diabetes mellitus was significantly associated with higher GDF-15 levels ( $p = 0.011$ ). Moreover, associations between GDF-15 concentrations and blood glucose levels were significant ( $r = 0.464$ ,  $p = 0.006$ ). Concerning the cardiac status, plasma levels of GDF-15 were significantly associated with those of N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) ( $r = 0.347$ ,  $p = 0.044$ ) but not with plasma levels of creatine kinase.

Although lower GFR values and higher plasma creatinine levels were associated with higher GDF-15 levels (respectively,  $r = -0.465$ ,  $p = 0.006$  and  $r = 0.398$ ,  $p = 0.019$ ), neither urea nor NGAL

concentrations were significantly associated with GDF-15 levels. Regarding the inflammatory and oxidative stress status, the highest GDF-15 levels were associated with CRP ( $p = 0.041$ ), but not with higher hydroperoxide and MPO concentrations or PAS. Higher preoperative GDF-15 levels were significantly associated with higher EuroSCORE values ( $r = 0.585$ ,  $p = 0.0003$ ).

The association of clinical and biological variables with peak plasma GDF-15 concentrations, observed one day after surgery in ICU, was also investigated. Patients with moderate or high operative risk (EuroSCORE > 3) had higher plasma GDF-15 concentrations than did patients with low operative risk (EuroSCORE  $\leq 3$ ) ( $p = 0.007$ ) (Figure 3A). GDF-15 levels at the ICU were significantly higher in patients who presented anemia during the postoperative period ( $p = 0.010$ ) (Figure 3B); moreover, higher GDF-15 concentrations correlated with lower ICU plasma hemoglobin ( $r = -0.456$ ,  $p = 0.007$ ) (Figure 3C). Patients who developed postoperative renal failure presented significantly higher GDF-15 levels at the ICU ( $p = 0.0004$ ) (Figure 3D). Furthermore, ICU levels of GDF-15 correlated significantly with a worse eGFR ( $r = -0.640$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figure 3E).

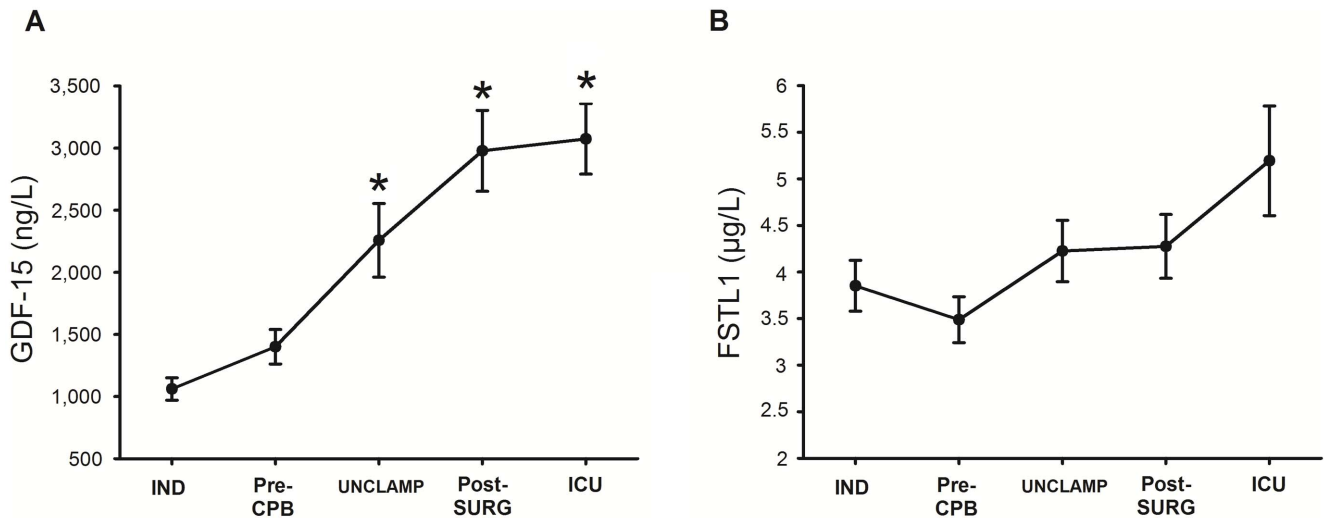
### Evolution of oxidative stress/inflammation

The PAS decreased significantly ( $p < 0.05$ ) during the CPB procedure (Figure 4A) while plasma MPO levels increased dramatically ( $p < 0.05$ ) during the surgical procedure, attaining their highest levels just after unclamping and then decreasing rapidly (Figure 4B), confirming the high inflammatory status induced by this surgical procedure. Whereas plasma hydroperox-

**Table 2.** Intraoperative data and postoperative outcomes.

No. of CABG, n (%)	
Two	7 (20%)
Three	21 (62%)
Four	4 (12%)
Five	2 (6%)
GIK (Yes/No)	9/25
Cross-clamping time (min)	61.7 ± 3.7
Cardioplegia (min)	52.5 ± 3.6
Defibrillation	
Spontaneous	32 (94%)
Electric	2 (6%)
Postoperative LVEF (%) (mean ± SEM)	57.4 ± 1.2
Number of surgeries with CPB > 120 min, n (%)	2 (6%)
In-hospital stay after surgery (days) (mean ± SEM)	10.3 ± 0.4
Postoperative in-hospital > 10 days, n (%)	10 (29%)
ICU stay (days) (mean ± SEM)	3.7 ± 0.2
ICU stay > 5 days, n (%)	4 (12%)
Clinical complication, n (%)	
Blood transfusion	9 (26%)
Atrial fibrillation (AC/FA)	7 (21%)
AKI	9 (26%)
Use of vasopressor	9 (26%)
Postoperative infection	4 (12%)
SIRS	14 (41%)

doi:10.1371/journal.pone.0105759.t002

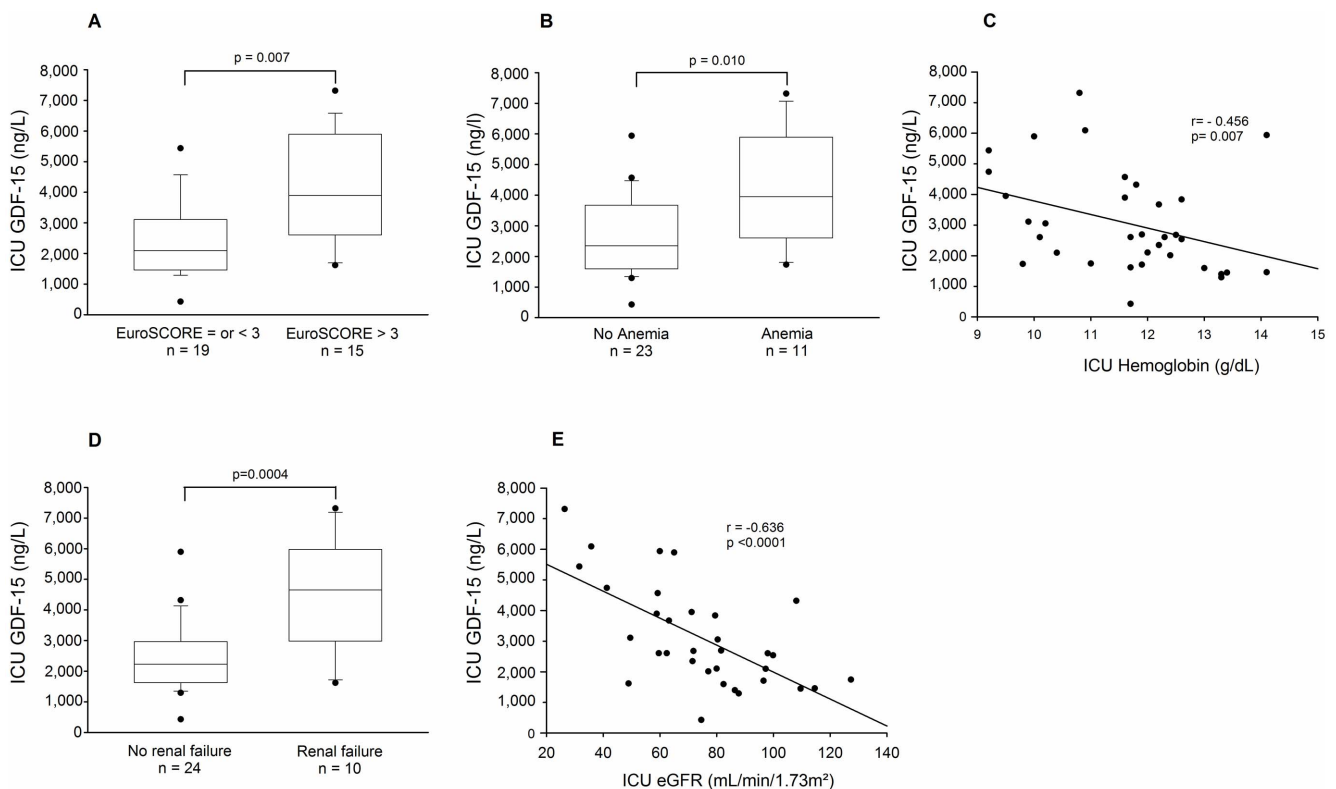


**Figure 2. Time course of plasma GDF-15 (A) and FSTL-1 (B) levels in patients (n = 34) undergoing cardiac surgery associated with CPB.** Values, corrected for hemodilution, are mean  $\pm$  SEM, \*: significantly different ( $p < 0.05$ ) between time-point and IND levels (One way repeated measures ANOVA, followed by pair-wise comparison of mean levels with Tukey test). doi:10.1371/journal.pone.0105759.g002

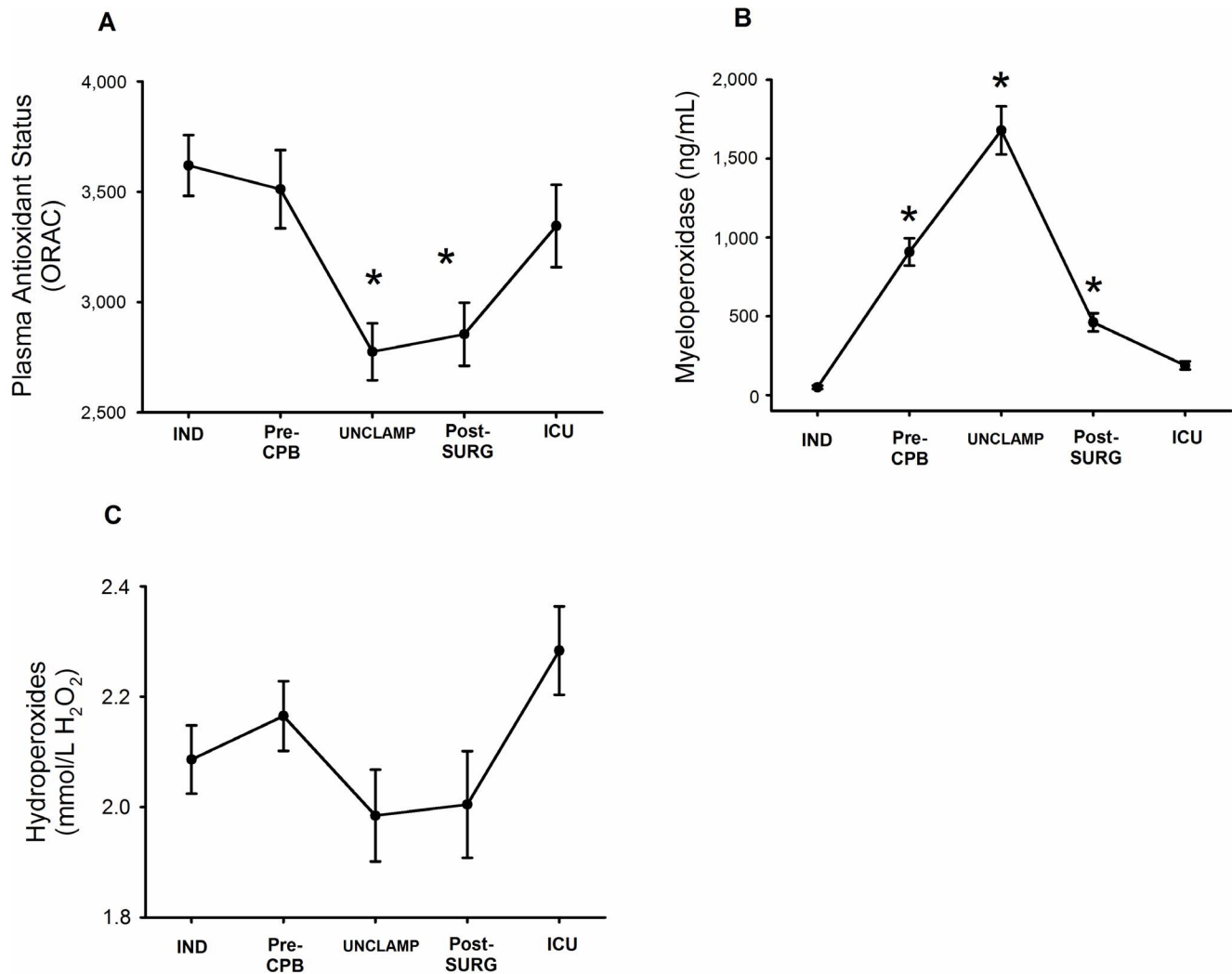
ide levels did not fluctuate significantly during and after the surgery (Figure 4C), ICU hydroperoxide plasma levels were associated with longer ICU and hospital stays ( $p = 0.027$  and  $p = 0.044$  respectively).

#### GDF-15 and Markers of tissue injury

Cardiac Troponin I (cTnI) was significantly higher ( $p = 0.008$ ) on arrival at the ICU (Figure 5A) and remained high the following day. Concerning the early stages of kidney damage, plasma NGAL



**Figure 3. Association of post-operative (ICU) GDF-15 levels with clinical and biological variables: GDF-15 levels in patients (n = 34) according to EuroSCORE  $\leq$  3 or EuroSCORE  $>$  3(A), GDF-15 levels in patients presenting or not anemia (B), correlation between GDF-15 and plasma hemoglobin levels (C), GDF-15 levels in patients presenting or not renal failure (D), correlation between plasma GDF-15 levels and glomerular filtration rate (E).** (Student's test, Spearman's correlation). doi:10.1371/journal.pone.0105759.g003



**Figure 4. Time course of plasma antioxidant status (A), myeloperoxidase (B) and hydroperoxides (C) given as the mean  $\pm$  SEM, n = 34, \*: significantly different ( $p < 0.05$ ) between time-point and IND levels (One way repeated measures ANOVA followed by pairwise comparison of mean levels with Tukey test).**

doi:10.1371/journal.pone.0105759.g004

levels increased significantly ( $p < 0.001$ ) after surgery (Figure 5C) and remained high in the ICU. Moreover, the day after surgery, plasma GDF-15 levels correlated positively and significantly with cTnI and NGAL ICU levels (Figure 5B, D). Among all of the post-operative biomarkers available, only eGFR, NGAL and GDF-15 measured at ICU arrival were significantly associated with the onset of AKI. Given the small size of the population, we performed stepwise multivariate regression beginning with eGFR, and we tested the incremental performance of the model when the two other biomarkers were added (Figure 6). The addition of NGAL to eGFR significantly improved the model's performance ( $p = 0.02$ ), as did the addition of GDF-15 levels to eGFR ( $p = 0.03$ ). When GDF-15 levels were added to the combined model of eGFR+NGAL, there was a trend towards an improvement in the global Chi-square coefficient of the model ( $p = 0.06$ ).

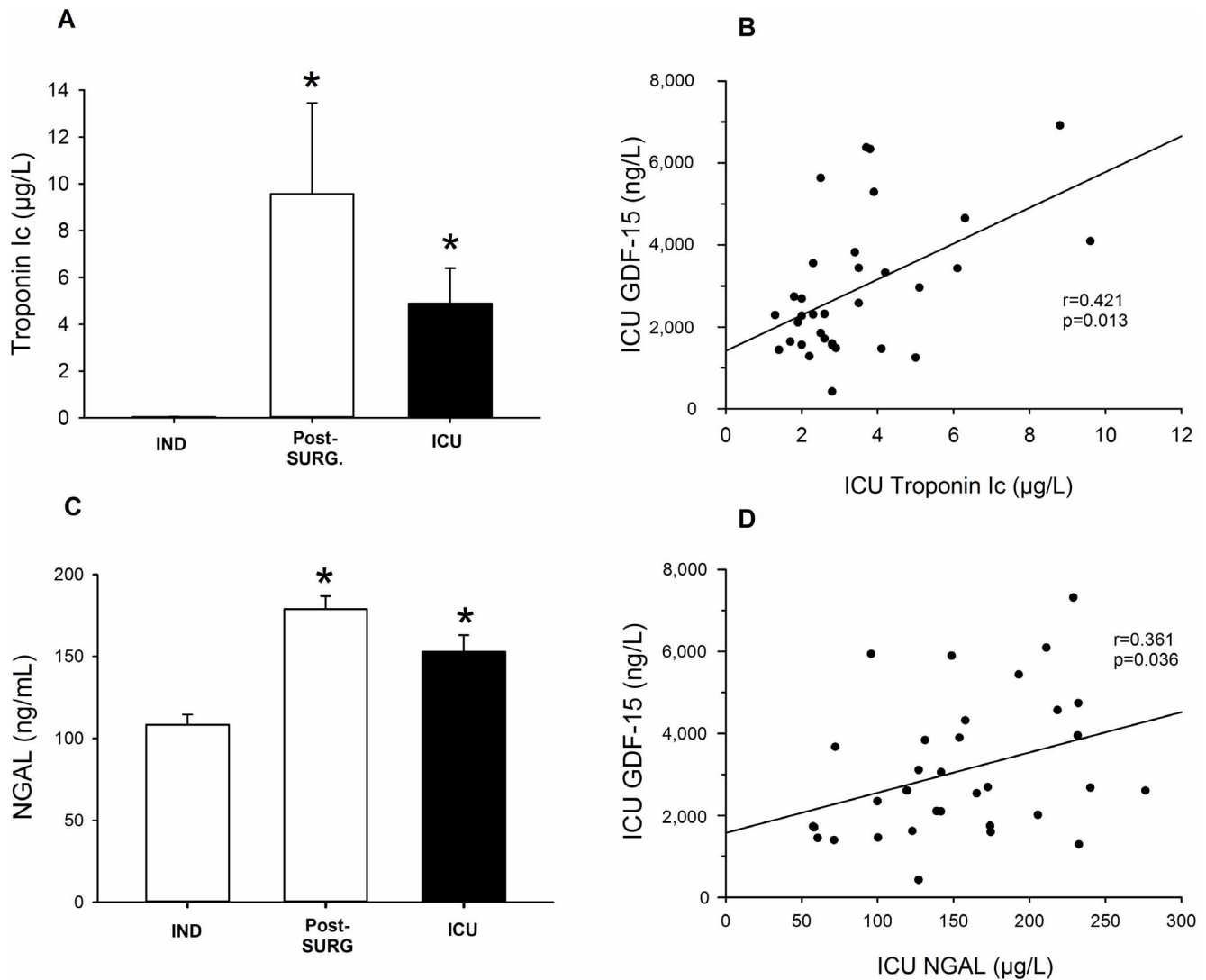
## Discussion

During CABG, ischemia-reperfusion injury may occur because of elevated intracellular levels of reactive oxygen species and calcium. CPB is associated with an inflammatory response that can

generate systemic oxidative stress, which, in turn, causes further damage not only to the heart, but also to other organs. Therefore, it is necessary to identify new biomarkers of inflammation and oxidative stress during this surgical procedure, in order to predict the severity of damage to vital organs.

## Determinants of GDF-15 at baseline

Our data showed that pre-operative GDF-15 levels in patients undergoing bypass surgery were positively associated with age, a history of diabetes, chronic renal failure, high NT-proBNP and plasma CRP levels. Clinical studies have shown that GDF-15 concentrations correlated strongly with age in both healthy and unhealthy adults [15]. Ho *et al.* found that GDF-15 concentrations in apparently healthy elderly adults were higher than those in younger adults [22]. More recently, it was reported that these changes could reflect both cardiovascular and renal perturbations, inflammation and other independent pathophysiological processes [23]. The association between elevated GDF-15 levels and diabetes has also been reported. In obese non-diabetic individuals, GDF-15 could predict future insulin resistance and impaired



**Figure 5. Correlations between post-operative ICU GDF-15 levels and markers of renal and cardiac injury: plasma levels of cTnI ( $\mu\text{g/L}$ ) at IND, post-SURG and ICU (A), correlation between plasma levels of GDF-15 and cTnI ICU (B), plasma levels of NGAL (ng/mL) at IND, post-SURG and ICU (C), correlation between plasma levels of GDF-15 and NGAL at the ICU (D). (One way repeated measures ANOVA followed by pair-wise comparison of mean levels with Tukey test; Spearman's correlation,  $n=34$ ).**  
doi:10.1371/journal.pone.0105759.g005

glucose control[24], and in patients free of clinically-overt cardiovascular disease, GDF-15 was positively associated with age, diabetes, hypertension, worse kidney function[22] and NT-proBNP levels[23]. Indeed, several studies have also reported higher plasma GDF-15 levels in patients with cardiovascular pathologies such as CAD [25], ACS[7,8,26] or chronic heart failure[9,27]. Furthermore, in patients with CAD, GDF-15 concentrations correlated with other markers of inflammation[28], and elevated GDF-15 levels are now considered a strong biomarker of risk progression and mortality in cardiovascular disease[29–31]. GDF-15 expression is up-regulated in chronic kidney disease and represents a novel independent serum marker of mortality[13].

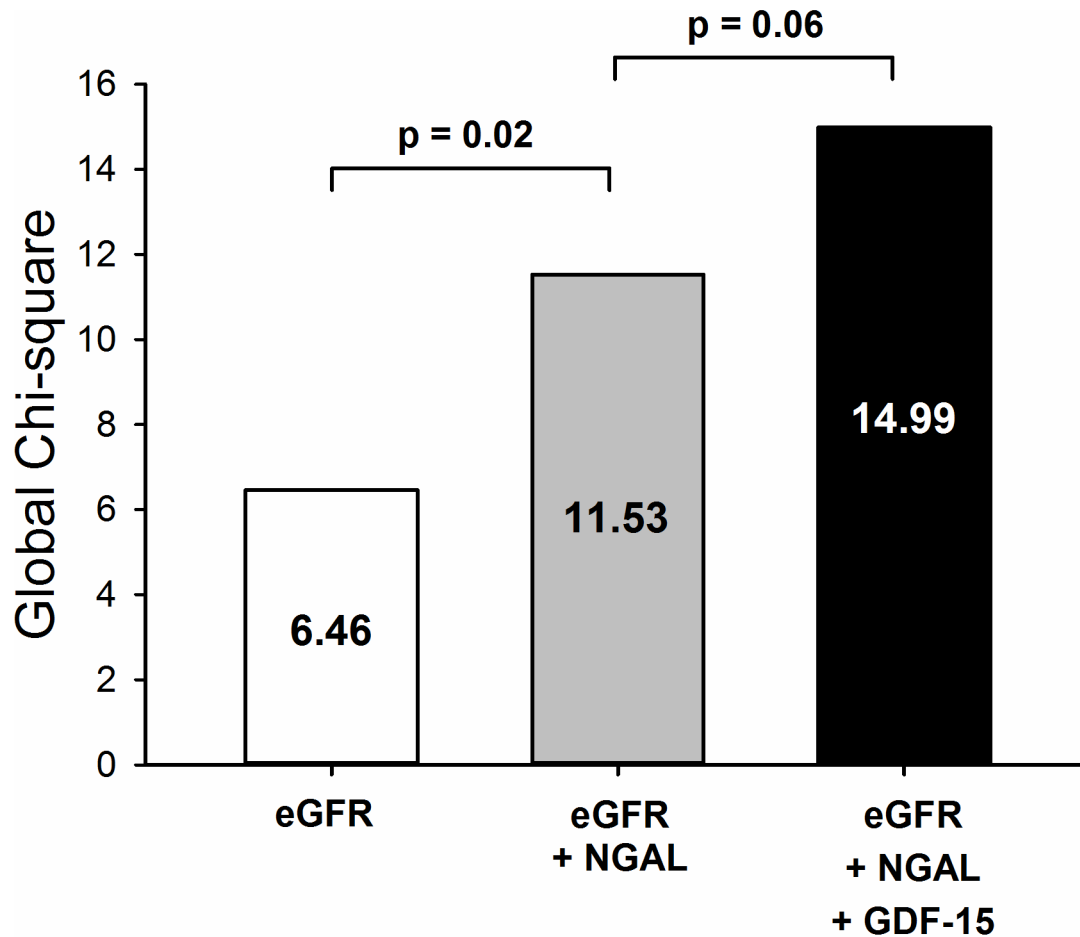
#### Evolution of GDF-15 during CABG

This is the first report of the time course of GDF-15 during cardiac surgery. Our study demonstrated that plasma GDF-15

levels in humans increased during cardiac surgery associated with CPB. Concerning myocardial IR injury during CABG, the increase in plasma GDF-15 levels that we report is in accordance with experimental findings[6]. Rat cardiomyocytes subjected to simulated IR secreted GDF-15, but only after 3 hours of IR. In an *in vivo* mouse model of cardiac IR injury, myocardial GDF-15 mRNA levels rapidly increased in the ischemic area after both permanent and transient coronary artery ligation. In our study, the median duration of ischemia (cross-clamp time) was  $61.7 \pm 3.7$  minutes, and we examined the levels of GDF-15 after unclamping and after 1 to 2 hours of reperfusion; showing that, in humans, plasma GDF-15 levels increased significantly after a period of myocardial IR.

Heart surgery with CPB is associated with an acute inflammatory response, which has implications for postoperative recovery and myocardial function[32]. Recent findings also suggested that the secreted protein FSTL-1 could be an upstream inducer of





**Figure 6. Incremental value of post-operative GDF-15 to predict AKIN after CABG surgery.** Bar graph illustrating the change in global  $\chi^2$  value by the addition of post-operative GDF-15 and/or NGAL to post-operative eGFR. All models were significantly associated with AKI ( $p < 0.05$ ). \* =  $p < 0.05$  vs eGFR model. † =  $p = 0.06$  vs eGFR + NGAL model. doi:10.1371/journal.pone.0105759.g006

GDF15 production and an independent prognostic biomarker in acute coronary syndromes[11]. FSTL1 is a cardiokine, whose cardiac expression levels are upregulated in hypertrophic hearts of mice or in myocardial infarction models[33]. FSTL1 can serve as a useful biomarker of cardiovascular disease given that elevated circulating levels of FSTL1 are found in patients with ACS and associated with chronic HF[34]. In our study performed in patients undergoing bypass surgery, although IND plasma levels of FSTL1 were significantly associated with LVEF ( $r = -0.385$ ,  $p = 0.025$ ) and with NT-proBNP concentrations ( $r = 0.350$ ,  $p = 0.043$ ), we were unable to demonstrate an association between GDF-15 levels and FSTL-1, at any time during the surgical procedure or the recovery period.

To summarize, our data emphasize the role of GDF-15 in inflammatory situations, and, as suggested by the rapid increase in levels of GDF-15, showed that this induction occurs quickly in cardiac surgery associated with CPB.

#### CABG and oxidative stress

Increases in various markers of systemic oxidative stress and in inflammatory products have been shown to occur during CPB[3]. Neutrophils are thought to be the primary source of systemic radical oxygen species (ROS) during heart surgery on CPB [3].

MPO is one of the major neutrophil effector proteins and levels of MPO have been associated with a variety of clinical conditions including systemic inflammation, risk of cardiovascular events, vascular endothelial dysfunction and oxidative stress[35]\_ENREF\_63. MPO produces hypochlorous acid from hydrogen peroxide and chloride anion during the neutrophil's respiratory burst. In the present work, circulating hydroperoxides did not increase throughout the surgical procedure, even though the plasma antioxidant status significantly decreased and plasma MPO levels increased significantly just after aortic cross clamping. In a previous study, we observed that the PAS decreased during CPB[3], reflecting the reduced capacity of plasma to protect its environment from free-radical aggression; this phenomenon is probably triggered to a large extent by hemodilution. Additionally, it should be noted that mannitol, a well-known non-specific antioxidant, administered just before myocardial reperfusion, could have influenced the level of oxidative stress in these patients. Kempf *et al.*[6] reported that nitro-oxidative stress induced by peroxynitrite was able to induce the expression of GDF-15 in cultured rat neonatal cardiomyocytes. However, at this point in our study, it seems difficult to draw any conclusions on the possible interaction between circulating markers of oxidative stress and

GDF-15 levels in the clinical setting of cardiac surgery associated with CPB.

### GDF-15 and markers of renal and cardiac injury during CABG

We did find a close association between high GDF-15 levels and worse eGFR. As our population was small, few adverse events were recorded. There were only 9 AKI events, and the results of the multivariate analysis therefore need to be interpreted with caution. In particular, we were unable to show that the prognostic value of the early measurement of GDF-15 was better than a model that associated two powerful biomarkers of the AKIN. Nonetheless, this result supports our findings that GDF-15 is closely associated with renal function and, in combination with known biomarkers, such as NGAL and eGFR, could be of use for the early detection of AKI. This is in agreement with previous results showing that GDF-15 was a novel independent serum marker of mortality in chronic kidney disease[13]. Correlations between GDF-15 levels and renal function biomarkers, such as creatinine, urea or NGAL levels, became significant during the post-surgery period and the following day, suggesting that GDF-15 possibly originates in the kidney or is influenced by renal function. Elevated urinary levels of GDF-15 were found in type-2 diabetic patients with subnormal eGFR, and were associated with proximal tubule injury[36]. NGAL was originally identified in neutrophil granules but is also expressed in the kidney and liver, and its synthesis is induced in response to inflammation, infection, ischemia, and acute kidney injury[18]. Several studies investigating cardiac surgery patients have shown that NGAL levels in both the blood and urine could be a useful predictive marker of acute kidney injury[19].

While there was no correlation between preoperative GDF-15 and cTnI and CK, we found a significant positive association between GDF-15 and NT-proBNP during the post-operative reperfusion period, and there was a significant positive correlation between ICU GDF-15 and cTnI. In experimental conditions[6], IR injury was shown to induce GDF-15 in cardiomyocytes and mouse hearts. Several clinical studies have clearly demonstrated that GDF-15 was a strong biomarker of cardiovascular disease, and a prognosis marker of fatal events in patients with myocardial infarction[7,8,30] and chronic HF[9,15]. Indeed, plasma GDF-15 is elevated in patients with CAD, and levels are even higher in patients with STEMI. GDF-15 is independently associated with NT-proBNP and cardiac troponin T (cTnT) levels at presentation in STEMI patients[8,26]. Persisting elevated GDF-15 levels may be related to myocardial injury, revealed by the increase in circulating levels of cTnI. However, to our knowledge, this is the

first study to report that elevated GDF-15 levels are positively associated with markers of cardiac injury after CABG with CPB.

### GDF-15 and other risk factors during CABG

We found a significant association between GDF-15 and hemoglobin levels during the post-operative period. GDF-15 is known to be implicated in dyserythropoietic syndromes such as thalassemia or sickle cell disease[37]. Theurl *et al.* demonstrated that GDF15 was significantly increased in chronic anemia in subjects with or without true iron deficiency[38]\_ENREF\_69. GDF-15 is probably involved in mechanisms that regulate hemoglobin levels; however, further studies are needed to elucidate these pathways.

Finally, our results showed that higher pre-, per- and post-operative GDF-15 levels were significantly associated with higher EuroSCORE values. Our results are in agreement with a recent study showing that pre-operative plasma GDF-15 levels improved the predictive capacity of the additive EuroSCORE. Collectively, these results suggest that the addition of GDF-15 to conventional risk stratification tools could provide important prognostic information[12].

### Conclusions

In conclusion, our prospective study demonstrated for the first time the kinetic increase in plasma GDF-15 levels during cardiac surgery in patients undergoing CABG associated with CPB. We confirm here the important role of GDF-15 as a marker of renal and cardiac injury in patients with CAD who underwent CABG associated with CPB. Given the value of GDF-15 as a marker of heart disease and cardiovascular risk and the prevalence of major adverse cardiovascular events associated with the post-CPB period, it seems important to measure GDF-15 levels in patients undergoing CABG with CPB so as to improve diagnosis and follow-up.

### Acknowledgments

The authors thank Françoise Bechet, Norenn Baverel and Séverine Claes for technical assistance. The authors thank Mr. Philip Bastable for English revision of the manuscript.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CV LR CG. Performed the experiments: AK KS. Analyzed the data: MZ CV CG. Contributed reagents/materials/analysis tools: SG. Wrote the paper: CV AK CG.

### References

- Wildhirt SM, Schulze C, Schulz C, Egi K, Brenner P, et al. (2001) Reduction of systemic and cardiac adhesion molecule expression after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Shock* 16 Suppl 1: 55–59.
- Goudeau JJ, Clermont G, Guillery O, Lemaire-Ewing S, Musat A, et al. (2007) In high-risk patients, combination of antiinflammatory procedures during cardiopulmonary bypass can reduce incidences of inflammation and oxidative stress. *J Cardiovasc Pharmacol* 49: 39–45.
- Clermont G, Vergely C, Jazayeri S, Lahet JJ, Goudeau JJ, et al. (2002) Systemic free radical activation is a major event involved in myocardial oxidative stress related to cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 96: 80–87.
- Shi Y, Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685–700.
- Ago T, Sadoshima J (2006) GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein. *Circ Res* 98: 294–297.
- Kempf T, Eden M, Strelau J, Naguib M, Willenbockel C, et al. (2006) The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 98: 351–360.
- Wollert KC, Kempf T, Peter T, Olofsson S, James S, et al. (2007) Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation* 115: 962–971.
- Khan SQ, Ng K, Dhillon O, Kelly D, Quinn P, et al. (2009) Growth differentiation factor-15 as a prognostic marker in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 30: 1057–1065.
- Kempf T, von Haehling S, Peter T, Allhoff T, Cicoira M, et al. (2007) Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 50: 1054–1060.
- Hochholzer W, Morrow DA, Giugliano RP (2010) Novel biomarkers in cardiovascular disease: update 2010. *Am Heart J* 160: 583–594.
- Widera C, Giannitsis E, Kempf T, Korf-Klingebiel M, Fiedler B, et al. (2012) Identification of follistatin-like 1 by expression cloning as an activator of the growth differentiation factor 15 gene and a prognostic biomarker in acute coronary syndrome. *Clin Chem* 58: 1233–1241.
- Heringlake M, Charitos EI, Gatz N, Kabler JH, Beilharz A, et al. (2013) Growth differentiation factor 15: a novel risk marker adjunct to the EuroSCORE for risk stratification in cardiac surgery patients. *J Am Coll Cardiol* 61: 672–681.

13. Breit SN, Carrero JJ, Tsai VW, Yagoutifam N, Luo W, et al. (2012) Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) and mortality in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 27: 70–75.
14. Ho JE, Hwang SJ, Wollert KC, Larson MG, Cheng S, et al. (2013) Biomarkers of cardiovascular stress and incident chronic kidney disease. *Clin Chem* 59: 1613–1620.
15. Kempf T, Horn-Wichmann R, Brabant G, Peter T, Allhoff T, et al. (2007) Circulating concentrations of growth-differentiation factor 15 in apparently healthy elderly individuals and patients with chronic heart failure as assessed by a new immunoradiometric sandwich assay. *Clin Chem* 53: 284–291.
16. Doise JM, Aho LS, Quenot JP, Guillaud JC, Zeller M, et al. (2008) Plasma antioxidant status in septic critically ill patients: a decrease over time. *Fundam Clin Pharmacol* 22: 203–209.
17. Lorgis L, Zeller M, Dentan G, Sicard P, Richard C, et al. (2010) The free oxygen radicals test (FORT) to assess circulating oxidative stress in patients with acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 213: 616–621.
18. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, et al. (2003) Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 14: 2534–2543.
19. Wagener G, Jan M, Kim M, Mori K, Barasch JM, et al. (2006) Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology* 105: 485–491.
20. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, et al. (1999) A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 130: 461–470.
21. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, et al. (2007) Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 11: R31.
22. Ho JE, Mahajan A, Chen MH, Larson MG, McCabe EL, et al. (2012) Clinical and genetic correlates of growth differentiation factor 15 in the community. *Clin Chem* 58: 1582–1591.
23. Eggers KM, Kempf T, Wallentin L, Wollert KC, Lind L (2013) Change in growth differentiation factor 15 concentrations over time independently predicts mortality in community-dwelling elderly individuals. *Clin Chem* 59: 1091–1098.
24. Kempf T, Guba-Quint A, Torgerson J, Magnone MC, Haefliger C, et al. (2012) Growth differentiation factor 15 predicts future insulin resistance and impaired glucose control in obese nondiabetic individuals: results from the XENDOS trial. *Eur J Endocrinol* 167: 671–678.
25. Rohatgi A, Patel P, Das SR, Ayers CR, Khera A, et al. (2012) Association of growth differentiation factor-15 with coronary atherosclerosis and mortality in a young, multiethnic population: observations from the Dallas Heart Study. *Clin Chem* 58: 172–182.
26. Kempf T, Bjorklund E, Olofsson S, Lindahl B, Allhoff T, et al. (2007) Growth-differentiation factor-15 improves risk stratification in ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J* 28: 2858–2865.
27. Foley PW, Stegemann B, Ng K, Ramachandran S, Proudler A, et al. (2009) Growth differentiation factor-15 predicts mortality and morbidity after cardiac resynchronization therapy. *Eur Heart J* 30: 2749–2757.
28. Zhang M, Lu S, Wu X, Chen Y, Song X, et al. (2012) Multimarker approach for the prediction of cardiovascular events in patients with mild to moderate coronary artery lesions. A 3-year follow-up study. *Int Heart J* 53: 85–90.
29. Wollert KC (2007) Growth-differentiation factor-15 in cardiovascular disease: from bench to bedside, and back. *Basic Res Cardiol* 102: 412–415.
30. Wollert KC, Kempf T, Lagerqvist B, Lindahl B, Olofsson S, et al. (2007) Growth differentiation factor 15 for risk stratification and selection of an invasive treatment strategy in non ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation* 116: 1540–1548.
31. Xu X, Li Z, Gao W (2011) Growth differentiation factor 15 in cardiovascular diseases: from bench to bedside. *Biomarkers* 16: 466–475.
32. Warren OJ, Smith AJ, Alexiou C, Rogers PL, Jawad N, et al. (2009) The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1—mechanisms of pathogenesis. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 23: 223–231.
33. Oshima Y, Ouchi N, Sato K, Izumiya Y, Pimentel DR, et al. (2008) Follistatin-like 1 is an Akt-regulated cardioprotective factor that is secreted by the heart. *Circulation* 117: 3099–3108.
34. Widera C, Horn-Wichmann R, Kempf T, Bethmann K, Fiedler B, et al. (2009) Circulating concentrations of follistatin-like 1 in healthy individuals and patients with acute coronary syndrome as assessed by an immunoluminometric sandwich assay. *Clin Chem* 55: 1794–1800.
35. van der Veen BS, de Winther MP, Heeringa P (2009) Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 11: 2899–2937.
36. Simonson MS, Tikin M, Debanne SM, Rahman M, Berger B, et al. (2012) The renal transcriptome of db/db mice identifies putative urinary biomarker proteins in patients with type 2 diabetes: a pilot study. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F820–829.
37. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, et al. (2007) High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 13: 1096–1101.
38. Theurl I, Finkenstedt A, Schroll A, Nairz M, Sonnweber T, et al. (2010) Growth differentiation factor 15 in anaemia of chronic disease, iron deficiency anaemia and mixed type anaemia. *Br J Haematol* 148: 449–455.

## Travaux complémentaires

En parallèle, grâce à la collection biologique constituée lors de cette étude, nous avons réalisé le dosage de l'arginine et de ses dérivés diméthylés : diméthyl-arginine asymétrique (ADMA) et diméthyl-arginine symétrique (SDMA), dans le but d'étudier l'impact de la CEC sur les taux circulants de ces marqueurs de la fonctionnalité de l'endothélium vasculaire.

En effet, au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont suggéré que l'ADMA pouvait constituer un marqueur de la dysfonction endothéliale. L'ADMA est issue de protéines méthylées au niveau de leurs résidus arginine (Figure 20A), principalement au sein du noyau cellulaire, sous l'action de méthylases appelées protéine arginine méthyl-transférase (PRMTs). Pour exercer leur rôle biologique, les dérivés méthylés de la L-arginine doivent être clivés enzymatiquement de leurs protéines porteuses. A l'issue de cette protéolyse, les résidus méthyl-arginine, ADMA, SDMA et monométhyl-arginine (MMA), sont libérés dans le cytoplasme, et peuvent ainsi y réaliser leurs actions biologiques. ADMA, SDMA et MMA sont ensuite éliminées sous forme intacte par voie urinaire, mais l'ADMA peut aussi subir une dégradation en L-citrulline et diméthylamine par le biais des diméthyl-arginine diméthyl-aminohydrolases (DDAH) [442].

L'ADMA est un inhibiteur endogène des NOS de par sa compétition avec leur substrat, la L-arginine. Par le biais de l'inhibition des NOS, l'ADMA altère la biodisponibilité du NO, et des taux élevés d'ADMA sont significativement associés à une réduction de la production de NO circulant. De plus, une augmentation des taux circulants d'ADMA est également rencontrée dans un grand nombre de situations cliniques associées à un risque cardiovasculaire élevé telles que l'HTA, le diabète et les dyslipidémies [443].

Par ailleurs, la méthylation post-traductionnelle des protéines conduit à la synthèse d'un autre dérivé méthylé de la L-arginine : la SDMA, stéréoisomère de l'ADMA (Figure 20A). La SDMA n'est pas un inhibiteur compétitif des NOS, mais peut interférer avec la L-arginine au niveau de son transporteur cellulaire. De par son élimination majoritairement rénale, la SDMA est un marqueur puissant de la fonction rénale (Figure 20B). En effet, les taux de SDMA circulants sont très élevés chez des patients présentant une pathologie rénale chronique. De plus, de récents travaux ont suggéré que la SDMA prédirait la survenue d'évènements cardiaques, et ce au-delà d'une pathologie rénale chronique [444].

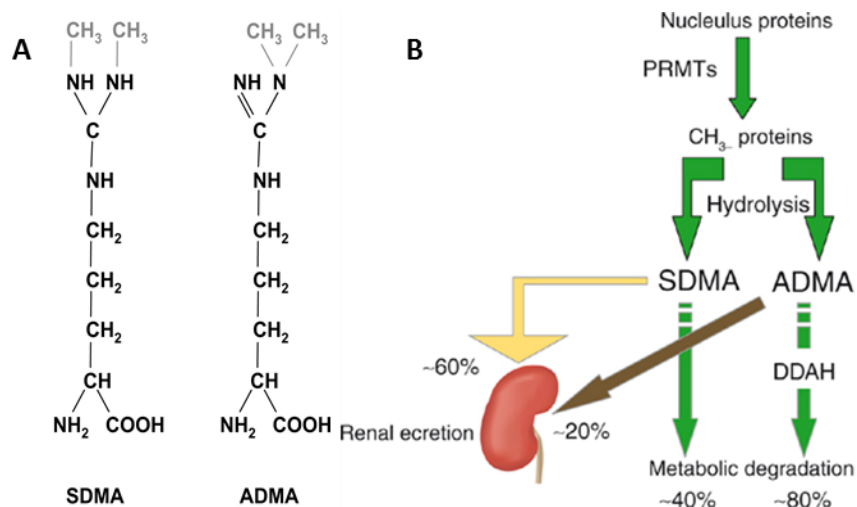


Figure 20. Structures moléculaires et métabolisme des dérivés diméthylés de la L-arginine (D'après C Zoccali. *Asymmetric dimethylarginine in end-stage renal disease patients: A biomarker modifiable by calcium blockade and angiotensin II antagonism?* *Kidney International* (2006) 70, 2053–2055) [445].

ADMA: diméthyl-arginine asymétrique ; DDAHs: diméthyl-arginine diméthyl-amino-hydrolyses ; PRMTs: protéine arginine méthyl-transférase ; SDMA: diméthyl-arginine symétrique.

L'activité biologique des DDAH est ralentie par le stress oxydant, ce qui peut conduire à une accumulation de l'ADMA donc une réduction de la synthèse de NO. Ainsi cette inhibition de la NOS par l'ADMA est à l'origine d'une diminution de la compliance vasculaire avec augmentation de la résistance et donc limite le flux sanguin [446].

A ce jour, peu de travaux se sont intéressés à mesurer l'évolution des taux des dérivés de la L-arginine, marqueurs de la fonctionnalité de l'endothélium vasculaire, au cours de la CEC associée à la chirurgie cardiaque.

### Matériel et méthodes

La méthode de CLHP, couplée à une détection fluorimétrique, propre au dosage de la L-arginine et de ses dérivés méthylés, a été développée en phase inverse et en mode gradient suite à l'adaptation des travaux d'Ivanova et coll. [447].

La L-arginine, l'ADMA et la SDMA sont des composés qui ne fluorescent pas naturellement. Une réaction dite de « dérivation » avec de l'ortho-phthalaldéhyde (OPA) est donc nécessaire afin de les détecter (longueurs d'ondes d'excitation 340 nm et d'émission 455 nm). Ainsi, les acides aminés sont à même de réagir avec le système OPA/R'SH et deviennent alors fluorescents et détectables

La séparation des composés est réalisée à l'aide d'une colonne chromatographique en phase inverse (CHROMOLITH® RP-18E, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) optimisée par l'ajout d'une précolonne (4 x 4,5 µm) (CHROMOLITH® RP-18E, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne). L'analyse des chromatogrammes se fait à l'aide du logiciel ChromQuest 5.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). L'aire du pic, correspondant au composé dosé, est corrélée à celle du standard interne (L-MMA) permettant ainsi le calcul des concentrations des composés en normalisant par rapport à la solution de calibration. Les concentrations endogènes de L-MMA sont de l'ordre de 0,1 µM [448]. Une surcharge en L-MMA (5 µM) dans chaque échantillon permet de niveler les différences de concentrations pouvant exister entre chaque patient. Les résultats sont exprimés en µmol/L=µM

## Résultats

Table III. Association entre le ratio ARG/ADMA à l'induction et les variables biologiques et cliniques basales

		Moyenne du ratio ARG/ADMA plasmatique	p	r
Sexe	M n=22 (79%) F n=6 (21%)	155 (126-176) 148 (109-168)	0,595	
Age (année) (moyenne ± ESM)	66,0 ± 1,6		0,582	0,108
<b>Contexte médical</b>				
Hypertension	Oui n=22 (79%) Non n=6 (21%)	140 ± 7,38 169 ± 5,72	0,061	
Diabète	Oui n=13 (46%) Non n=15 (54%)	153 (103-174) 156 (141-176)	0,357	
Dyslipidémie	Oui n=25 (89%) Non n=3 (11%)	156 (120-176) 143 (141-153)	0,458	
Obésité	Oui n=9 (32%) Non n=19 (68%)	123 (94-181) 156 (142-169)	0,258	
Poids (kg) (moyenne ± ESM)	80,4 ± 2,8		0,421	-0,157
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) (moyenne ± ESM)	28,0 ± 0,8		0,088	-0,327
Tabagisme	Oui n=6 (21%) Non n=22 (79%)	138 (106-159) 156 (138-177)	0,188	
IRC (DFG < 60 mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	Oui n=4 (15%) Non n=24 (85%)	102 ± 22,16 154 ± 5,19	<b>0,002</b>	
Créatinine (µmol/L) moyenne ± ESM)	87,9 ± 3,4		0,941	-0,014
Débit de filtration glomérulaire (DFG) (mL/min/1,73m <sup>2</sup> ) (moyenne ± ESM)	80,1 ± 3,5		0,636	0,093
Urée (mmol/L) (moyenne ± ESM)	7,1 ± 0,4		0,868	-0,032
NGAL (ng/mL) (moyenne ± ESM)	114,6 ± 6,1		0,258	0,220
Coronaropathies	Oui n=11 (39%) Non n=17 (61%)	158 ± 7,50 139 ± 8,83	0,128	
Infarctus myocardique	Oui n=4 (14%) Non n=24 (86%)	142 (123-151) 156 (124-176)	0,251	
Angioplastie coronaire percutanée	Oui n=5 (18%) Non n=23 (82%)	156 (129-189) 154 (123-189)	0,401	
FEVG (%) (moyenne ± ESM)	57,0 ± 2,6		<b>0,002</b>	<b>0,554</b>
EuroSCORE (moyenne ± ESM)	3,0 ± 0,4		0,317	-0,195
<b>Biologie cardiaque</b>				
Troponine > 0.02 µg/L	Oui n=7 (25%) Non n=21 (75%)	153 ± 8 144 ± 9	0,544	
Créatine kinase (IU/L) (moyenne ± ESM)	136,5 ± 14,8		0,410	0,161
NT-proBNP (pg/mL) (moyenne ± ESM)	555,5 ± 107,2		0,137	-0,287

		Moyenne du ratio ARG/ADMA plasmatique	p	r
<b>Statut inflammatoire et oxydant (moyenne ± ESM)</b>				
CRP>3 mg/L	Oui n=5 (18%) Non n=23 (82%)	99 (70-144) 156 (142-176)	<b>0,023</b>	
Fibrinogène (g/L)	3,4 ± 0,1		0,777	0,055
Hydroperoxydes (mmol/L)	2,1 ± 0,1		0,160	0,272
PAS (ORAC)	3543,5 ± 128,8		0,178	-0,260
Myeloperoxydase (ng/mL)	51,4 ± 11,6		0,280	0,051
Lactate (mmol/L)	1,2 ± 0,1		0,784	-0,054
GDF-15 (ng/L)	1091,8 ± 97,2		0,185	-0,257
<b>Bilan biologique (moyenne ± ESM)</b>				
	12,8 ± 0,3		0,240	0,228
Hémoglobine (g/dL)				
Hématies (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,6 ± 0,1		0,675	0,082
Hématocrite (%)	39,5 ± 0,9		0,231	0,233
Leucocytes (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	7,0 ± 0,3		0,458	-0,145
Neutrophiles (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,5 ± 0,2		0,908	0,022
Plaquettes (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	206,9 ± 7,1		0,659	0,087
paO <sub>2</sub> (mmHg)	156,2 ± 8,8		0,003	0,546
pa CO <sub>2</sub> (mmHg)	35,8 ± 1,1		0,416	-0,159
pH	7,4 ± 0,01		0,239	0,229
TCA (sec)	1,1 ± 0,1		0,782	-0,054
Temps de Prothrombine(%)	93,7 ± 1,3		0,722	-0,069
Glycémie (mmol/L)	8,0 ± 0,8		0,048	-0,376
Kaliémie (mmol/L)	3,7 ± 0,1		0,538	0,120
ASAT (IU/L)	21,7 ± 1,3		0,216	-0,240
ALAT (IU/L)	35,6 ± 2,1		0,538	-0,121

Notre travail met en évidence que le rapport des taux plasmatiques de L-arginine sur ceux de l'ADMA (reflet de la biodisponibilité du NO) sont particulièrement associés à trois facteurs : les fonctions cardiaque, rénale et le statut inflammatoire. Concernant la fonction contractile du ventricule gauche, la valeur de ce ratio à l'induction est positivement et significativement associée aux FEVG préopératoire (r=0,554 ; p=0,002) et postopératoire (r=0,411 ; p=0,03). Au sujet de l'association avec la fonction rénale, les patients avec une IRC modérée (DFG < 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>) présentent un ratio Arginine /ADMA significativement plus faible (p=0,002). Enfin, ce ratio est également significativement plus bas (p=0,023) chez les patients dont le taux CRP est supérieur à 3 mg/L en période préopératoire.

En ce qui concerne les cinétiques peropératoires des taux plasmatiques des dérivés méthylés de la L-Arginine, rapportés à la protidémie afin de tenir compte de l'hémodilution, il se



produit un pic des taux de L-arginine, d'ADMA et de SDMA au moment du déclantage (Figure 21). Toutefois, le ratio Arginine /ADMA est significativement abaissé au moment du déclantage (Figure 19).

Des taux élevés de SDMA sont associés aux durées plus longues de CEC et de clampage aortique. La SDMA, éliminée principalement par le rein, constitue également un marqueur potentiel de la fonction rénale. Nous retrouvons ainsi une forte association significative entre les taux plasmatiques de SDMA à l'induction avec la créatininémie préopératoire ( $r=0,666$  ;  $p<0,00001$ ). Enfin, il est intéressant de noter que les taux postopératoires de SDMA au lendemain de l'intervention sont étroitement et significativement associés aux taux plasmatiques du GDF-15 sur ces mêmes prélèvements ( $r=0,480$  ;  $p=0,001$ ).

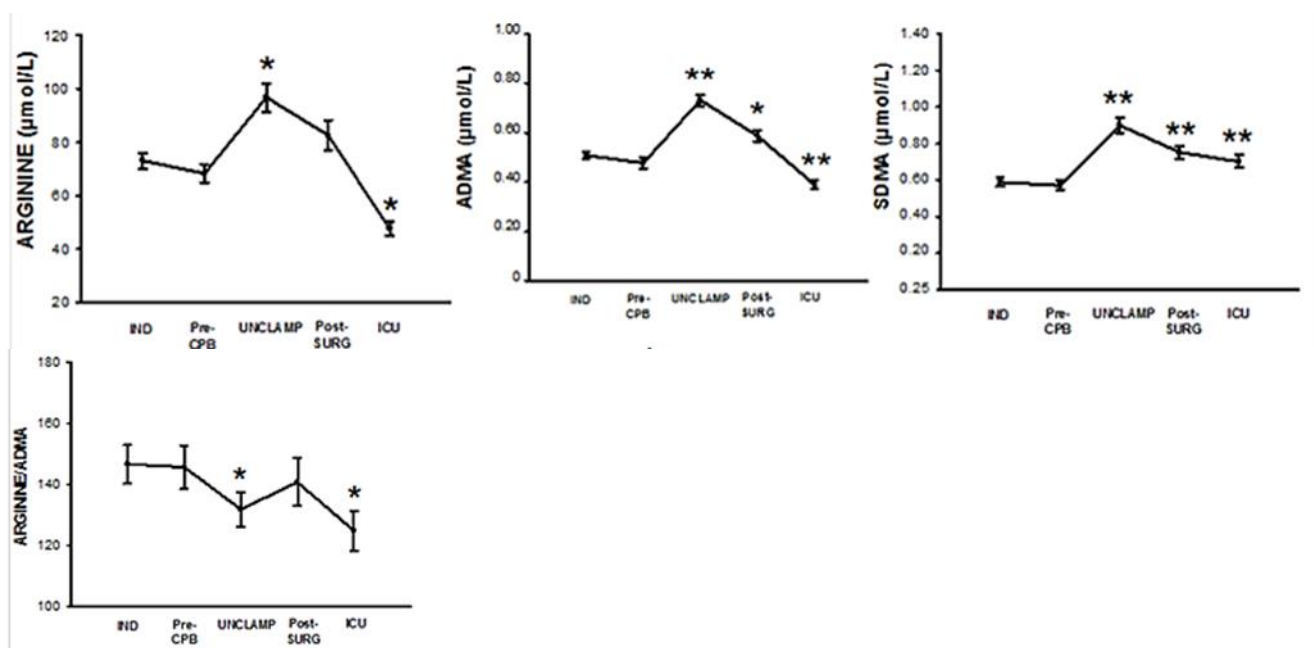


Figure 21. Cinétiques des concentrations plasmatiques de la L-Arginine, d'ADMA, de SDMA et du ratio Arginine/ADMA au cours des périodes pré-, per- et postopératoires. \* $p<0,05$  et \*\* $p<0,001$  différences significatives entre la valeur au temps de prélèvement comparée à la valeur à l'induction (moyenne  $\pm$  ESM)

## Discussion

L'élévation des taux plasmatiques d'ADMA au cours de la chirurgie cardiaque associée à la CEC pourrait à la fois résulter de l'atteinte rénale mais aussi participer à son instauration [449]. En effet, sur des modèles animaux, une augmentation des taux d'ADMA semble induire directement des atteintes aux niveaux glomérulaires et interstitiels et participerait au développement des principaux facteurs de risque de la dysfonction rénale (HTA, stress oxydant, fibrose) [450]. Les patients candidats à la CEC et présentant des taux préopératoires d'ADMA élevés sont à risque d'IRA et d'instabilités hémodynamiques [451]. Ainsi, il était intéressant d'étudier, dans une approche multi-marqueur, le lien existant entre les dérivés de l'arginine et le GDF-15 et nous avons pu mettre en évidence une relation entre les taux plasmatiques postopératoires de SDMA et de GDF-15.

Cependant, aucune association n'a été mise en évidence entre l'évolution de la biodisponibilité du NO (ratio arginine/ADMA) et celle du GDF-15. L'importance du ratio plasmatique arginine/ADMA a été soulignée dans l'interprétation biologique du « paradoxe de l'arginine » [452]. De nombreuses études indiquent qu'un faible ratio constitue un facteur de risque de mortalité toute-cause aussi bien chez les patients à haut risque, dont ceux atteints de cardiomyopathies dilatées [453], que chez des patients issus de larges cohortes [454]

Enfin, comme décrits précédemment, les phénomènes inflammatoires et oxydatifs contribuent à l'augmentation des taux d'ADMA et par conséquent à une diminution du ratio arginine/ADMA. Nous avons pu ainsi mettre en évidence des relations positives et étroitement significatives entre les valeurs de ce ratio et les taux plasmatiques de MPO à chaque temps de prélèvements après l'induction ( $r$  compris entre 0,465 et 0.633 ;  $p \leq 0,01$ ).

Bien que le GDF-15 et les dérivés méthylés de la L-Arginine évoluent dans les contextes d'inflammation et de stress oxydant, les modifications de leurs taux plasmatiques respectifs ne suivent pas la même cinétique, compte-tenu de leurs modes d'expression et des voies de signalisations impliquées. Afin d'établir un modèle multi-marqueur robuste, il sera nécessaire à l'avenir d'inclure ces biomarqueurs au sein d'études à plus grande échelle et intégrant un suivi à long terme pour tenter d'élucider les mécanismes sous-jacents impliqués dans la pathogenèse cardio-rénale au cours de procédures invasives.

## **II. Pre-operative growth differentiation factor 15 as a novel biomarker of acute kidney injury after cardiac bypass surgery (Protocoles ARTICLE et PAC/FA)**

### **Objectifs**

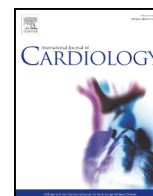
Fort des résultats obtenus au cours de notre première étude, nous avons entrepris des travaux portant sur le GDF-15 dans une population plus large. Nous avons effectué des dosages du GDF-15 chez 134 patients opérés pour PAC issus des protocoles PAC/FA (100 patients) et ARTICLE (34 patients) dans le but de mettre en évidence le potentiel pouvoir prédictif de ces taux en période préopératoire sur la survenue d'éventuelles complications postopératoires, notamment du risque d'apparition d'IRA.

### **Résultats**

Nous avons mis en évidence que 31% des patients avaient déclaré une IRA après une chirurgie pour PAC (avec ou sans CEC) et que les facteurs indépendamment associés au déclenchement d'une IRA étaient les taux préopératoires plasmatiques de GDF-15, le DFG préopératoire et la chirurgie sous CEC. Sur les courbes ROC, le taux de GDF-15 préopératoire était plus discriminant que le DFG préopératoire, le NT-proBNP et l'EuroSCORE. De plus, les taux de GDF-15 préopératoires, non-correctés par la protidémie, ajoutaient une valeur prédictive incrémentale lorsque ces taux étaient ajoutés au modèle incluant un contexte d'HTA, de diabète, le DFG préopératoire ainsi qu'une chirurgie sous CEC.

### **Conclusion**

Les patients présentant des taux plasmatiques préopératoires de GDF-15 et bénéficiant d'une chirurgie de PAC sont plus à risque de développer une IRA. Ainsi, le dosage du GDF-15 pourrait constituer un test d'intérêt dans l'amélioration de la stratification du risque chez les patients candidats à la chirurgie cardiaque, permettant ainsi de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir la survenue de complications postopératoires de nature rénale notamment.



## Pre-operative growth differentiation factor 15 as a novel biomarker of acute kidney injury after cardiac bypass surgery☆☆☆



Charles Guenancia<sup>a,b,\*</sup>, Abdelkader Kahli<sup>b,c,1</sup>, Gabriel Laurent<sup>a,d</sup>, Olivier Hachet<sup>a,b</sup>, Ghislain Malapert<sup>e</sup>, Sandrine Grosjean<sup>c</sup>, Claude Girard<sup>c</sup>, Catherine Vergely<sup>b</sup>, Olivier Bouchot<sup>e</sup>

<sup>a</sup> University Hospital, Department of Cardiology, Dijon, France

<sup>b</sup> INSERM U866, LPPCM, Dijon, France

<sup>c</sup> University Hospital, Department of Anaesthesiology, Dijon, France

<sup>d</sup> CNRS, UMR 5158, Le2I, Dijon, France

<sup>e</sup> University Hospital, Department of Cardiothoracic Surgery, Dijon, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 December 2014

Received in revised form 13 May 2015

Accepted 12 June 2015

Available online 17 June 2015

#### Keywords:

GDF-15

Acute kidney injury

Cardiopulmonary bypass

Risk stratification

Off-pump

Cardiac surgery

### ABSTRACT

**Background:** Pre-operative GDF-15 plasma levels significantly improve the prognostic value of the EuroSCORE for mortality after cardiac surgery. However, despite the strong correlation between GDF-15 and renal function, no data are available regarding the potential interest of pre-operative GDF-15 levels to improve the prediction of acute kidney injury (AKI) after cardiac artery bypass graft (CABG) surgery.

**Methods:** All patients operated on by 2 surgeons for CABG surgery at our university hospital from September 2011 to March 2013 were screened for participation in this prospective, observational study. Exclusion criteria: age < 18 years or > 80 years, previous atrial fibrillation/flutter, previous severe renal failure, previous cardiac surgery, emergency surgery. AKI was defined according to KDIGO criteria. GDF-15 levels in plasma were measured before induction and 12 h after surgery.

**Results:** 134 patients were included in this study. 42 (31%) developed post-operative AKI. AKI patients had a significantly higher pre-operative log-GDF-15 level (OR = 3.64; 95% CI = 1.41–9.40,  $p = 0.008$ ), a lower pre-operative eGFR (OR = 0.98; 95% CI = 0.96–0.99;  $p = 0.026$ ), and most often underwent on-pump surgery (OR = 2.60; 95% CI = 1.14–5.96,  $p = 0.024$ ). On ROC curves, GDF-15 before induction was found to be the best pre-operative biomarker to predict AKI (AUC = 0.83; CI = 0.75–0.89), compared with eGFR (AUC = 0.67; 95% CI = 0.59–0.75),  $p = 0.003$  and NT-proBNP (AUC = 0.62; CI = 0.51–0.72),  $p < 0.001$ . Pre-operative GDF-15 was also significantly better than the EuroSCORE in predicting AKI (AUC 0.62, 95% CI = 0.54–0.70),  $p < 0.001$ .

**Conclusions:** Pre-operative GDF-15 plasma levels are associated with post-operative AKI in CABG patients. If confirmed in larger cohorts, pre-operative GDF-15 may be of value to improve pre-operative risk stratification among candidates for surgery.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Abbreviations:** AKI, acute kidney injury; AF, atrial fibrillation; CABG, coronary artery bypass graft surgery; CBP, cardiopulmonary bypass; CRS, cardio renal syndrome; eGFR, estimated glomerular filtration rate; GDF-15, growth differentiation factor 15; HBP, high blood pressure; ICU, intensive care unit; IND, induction of anesthesia; LA, left atrial; LVEF, left ventricular ejection fraction; NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; NT-proBNP, N terminal pro brain natriuretic peptide; OFF, off-pump surgery; ONP, on-pump surgery; RRT, renal replacement therapy; SCr, serum creatinine.

☆ All authors take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

☆☆ Financial support: This work was supported by the University Hospital of Dijon, and by grants from Conseil Régional de Bourgogne.

\* Correspondence to: C. Guenancia, Service de Cardiologie, CHU Dijon, 14 rue Paul Gaffarel, 21079 Dijon Cedex, France.

E-mail address: [charles.guenancia@chu-dijon.fr](mailto:charles.guenancia@chu-dijon.fr) (C. Guenancia).

<sup>1</sup> Dr C. Guenancia and A. Kahli contributed equally to this work.

### 1. Introduction

Acute kidney injury (AKI) is a severe complication occurring during the post-operative period in patients undergoing cardiac surgery, and is associated with a poor prognosis [1,2]. Even small increases in serum creatinine (SCr) after cardiac surgery have been associated with a significant increase in 30-day mortality: a small increase of up to 0.3 mg/dl from baseline is associated with a 3-fold increased risk, whereas an SCr rise greater than 0.5 mg/dl is associated with an 18-fold increased risk of death [3]. Despite advances in supportive care, mortality and morbidity rates for patients with AKI remain high [4,5]. The main causes of post-operative AKI are renal ischemia due to reduced renal blood flow and/or loss of pulsatile flow, hypothermia, atheroembolism, and inflammatory response, which may induce ischemia-reperfusion injuries. Various predictive factors of post-operative AKI have been identified.

These include age, female sex, a high pre-operative creatinine blood level, emergency surgery, previous cardiac surgery, a history of high blood pressure (HBP), diabetes, congestive heart failure or left ventricular ejection fraction (LVEF) impairment [6–8].

Cystatin C and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) are two recently identified biomarkers available for the prediction of renal injury [9]. After kidney injury, the concentration of cystatin C increases earlier than that of creatinine, thus enabling earlier identification of AKI [10]. However, none of these biomarkers has been developed for the pre-operative prediction of AKI but only for the early detection of AKI. Except for a few isolated studies, the vast majority of animal and clinical studies have failed to demonstrate conclusively the benefit of the pharmacological treatment of AKI [11]. Early preventive measures, including preoperative risk stratification and perioperative optimization may be a way to reduce postoperative AKI [12]. There is a need to identify new biomarkers in order to prevent AKI by treating patients appropriately.

Growth differentiation factor 15 (GDF-15) is a cytokine related to the superfamily of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), and is weakly expressed under physiological conditions [13]. The plasma concentration of GDF-15 increases under pathological conditions such as hypoxia, inflammation or oxidative stress and is closely associated with all-cause mortality [14]. It has been shown in a large population of patients undergoing cardiac surgery that the addition of pre-operative plasma GDF-15 levels to the EuroSCORE significantly improves its prognostic value for mortality [15]. Moreover, GDF-15 may also help to identify individuals at a high risk of developing chronic kidney disease (CKD), and has even been identified as an independent marker of mortality in this disease [16]. In a recent study, we identified a strong association between GDF-15 levels and renal function impairment [17].

To date, there are no data regarding the potential interest of pre-operative GDF-15 levels to predict AKI.

Thus, we aimed to determine whether pre-operative GDF-15 plasma levels could help to identify patients at a high risk of acute kidney injury after coronary artery bypass graft (CABG) surgery.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study design

The independent ethics committee of the University Hospital of Dijon approved the study protocol and written informed consent was obtained from all patients. The study was designed as a prospective observational cohort study.

### 2.2. Patients

All patients operated on by 2 surgeons (OB, GM) for coronary artery bypass graft surgery at the University Hospital of Dijon from September 2011 to March 2013, were screened for participation in this prospective, observational study. The exclusion criteria were age <18 years or >80 years, previous atrial fibrillation/flutter, previous severe renal failure (estimated glomerular filtration rate (eGFR) <30 ml/min, MDRD formula), previous cardiac surgery, emergency surgery.

### 2.3. Data collection

Clinical data collection at admission was exhaustive and the following variables were recorded: sex, age, usual cardiovascular risk factors, cardiovascular and pulmonary diseases, previous regular medication, and pre-operative echocardiographic parameters. LVEF was calculated using the Simpson method on the apical four-chamber and apical two-chamber views. LVEF was dichotomized (<45% or  $\geq$ 45%) for more clinical relevance. During the stay in the intensive care unit (ICU), all medications administered (but not the doses) were recorded. Blood samples were taken at admission and then every 24 h. Preoperative renal failure was defined as an eGFR <60 ml/min (MDRD formula)

[18]. Acute kidney injury was defined following the KDIGO criterion [19] as the sudden decrease in renal function, defined by an increase in absolute SCr of at least 26.5  $\mu$ mol/L (0.3 mg/dL) within 48 h or by a percentage increase in SCr  $\geq$ 50% ( $1.5 \times$  baseline value) which is known or presumed to have occurred within the prior 7 days. However, we did not consider a sudden decrease in the urinary output to define AKI because, as suggested in the KDIGO guidelines, the use of urine output criteria for diagnosis and staging has been less well validated and in individual patients the need for clinical judgment regarding the effects of drugs (diuretics, vasopressive drugs), fluid balance, and other factors must be included [19].

### 2.4. Determination of GDF-15

Blood samples were taken in heparinized tubes. GDF-15 levels in plasma were measured before induction and 12 h after surgery at the ICU. Blood samples were immediately centrifuged after collection and the plasma was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C until analysis. Plasma GDF-15 concentrations were measured by quantitative sandwich enzyme immunoassay (Human GDF-15, Quantikine®, R&D Systems Europe, Lille, France) with a linear range from 200 to 50,000 ng/L. The color intensity, relative to GDF-15 concentration, was measured at 450 nm with a spectrophotometer (VictorV3, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Complete data sets including GDF-15 levels were available from all patients.

### 2.5. Anesthesia and heart surgery procedure

Patients were pre-medicated with midazolam orally plus hydroxyzine 90 min before anesthesia. Routine cardiac medications were continued until the morning of the surgery, except for clopidogrel, which was stopped at least 5 days earlier. Before the induction of anesthesia, a complete hemodynamic monitoring system was set up in the operating room. Anesthesia was induced with intravenous midazolam (0.02 mg kg $^{-1}$ ), sufentanil (0.2 to 0.5 mg.kg $^{-1}$  h $^{-1}$ ), and propofol (1.5 to 2.5 mg kg $^{-1}$ ). After verifying that manual ventilation was satisfactory, cisatracurium dibesylate (0.06 mg.kg $^{-1}$  h $^{-1}$ ) was injected. Patients were orally intubated and ventilated with FiO $_2$ : 0.4. Anesthesia was maintained with sufentanil and cisatracurium as required and inhaled desflurane.

Surgical access to the heart was gained through a median sternotomy in all of the patients. Off-pump surgery (OPF) was performed with the use of Cor vasc (Coroneo, Montréal, Canada). Patients were heparinized with 150 IU/kg intravenously to achieve an activated clotting time >300 s. A side-biting aorta clamp was usually used when proximal anastomoses were performed. The anastomoses were performed using temporary occlusion with LeGoo® gel [20] (Sanofi, Paris, France).

On-pump surgery (ONP) was performed in normothermia, with the use of aortic cross-clamping and warm blood cardioplegia. Patients were heparinized with 300 IU/kg to achieve an activated clotting time >300 s. Heparin was neutralized with 1 mg protamine sulfate per 100 IU given. During the study, there were no changes in the 2 surgical techniques. The surgeon chose between the two techniques depending on the coronary anatomy.

### 2.6. Follow-up

Lastly, clinical outcomes over the hospital stay after discharge from the hospital were recorded for all patients. The data collected were length of stay in the ICU and in the hospital, and mortality in the ICU, at discharge or at day 28, whichever came first.

### 2.7. Statistical analysis

Continuous variables are presented as means  $\pm$  standard deviations (SD) when normally distributed or medians and ranges otherwise; and

categorical variables as numbers (percentages). For continuous data, normality was checked by the Kolmogorov-test. The characteristics of the AKI and non-AKI groups were compared using the exact Mann-Whitney test for continuous variables and the Chi-square or Fisher's exact test for categorical variables as appropriate. All of the tests were two-sided, and a *p* value less than 0.05 was considered significant.

For multivariate models, variables were selected on the basis of their univariate association with AKI in the present study. Exploratory identification of factors independently associated with AKI was performed using multivariate descending conditional regression analysis, with an inclusion and exclusion cut-off at 5%. Because NT-proBNP level and GDF-15 were not normally distributed, log-transformed values were used in multivariate analysis. Improvements in chi-square and maximum log likelihood stepwise methods, including Hosmer-Lemeshow (HL) goodness of fit chi-square estimates, were used to evaluate the regression model. To examine the discrimination of AKI events, we examined the area under the receiver-operating characteristic (ROC) curve (plot of sensitivity versus 1 – specificity for all possible cut-off values for classifying predictions) for pre-operative GDF-15, NT-proBNP, eGFR (MDRD formula) and EuroSCORE with the best sensitivity and specificity according to the Youden index [21]. The cut-off value is given in the Results section. Areas under the ROC curves were compared using the method of DeLong et al. [22] for paired data.

All analyses were performed using SPSS 20.0.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) and MedCalc 13.3.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

### 3. Results

One hundred and thirty-two patients were prospectively included in this study, of whom 50 (38%) underwent off-pump surgery. Patients who underwent the ONP surgery were comparable to OFP patients for all baseline characteristics except for a lower number of coronary-artery grafts per procedure in the OFP group (OFP:  $2.8 \pm 0.8$  vs. ONP:  $3.4 \pm 0.9$ ,  $p < 0.001$ ).

#### 3.1. Correlation between pre-operative GDF-15 serum concentrations and baseline characteristics

There was a significant (but not strong, all  $r^2 < 0.50$ ) correlation between pre-operative circulating levels of GDF-15 and the EuroSCORE, ( $r^2 = 0.28$ ;  $p < 0.001$ ), age ( $r^2 = 0.15$ ;  $p < 0.001$ ), creatinine ( $r^2 = 0.16$ ;  $p < 0.001$ ) and NT-proBNP levels ( $r^2 = 0.10$ ,  $p < 0.001$ ). In contrast, no significant correlation was observed between GDF-15 and LVEF ( $p = 0.34$ ). Regarding categorical baseline variables, plasma GDF-15 levels were significantly higher in patients with diabetes ( $1334 \pm 707$  ng/l vs.  $952 \pm 413$  ng/l,  $p < 0.001$ ), HBP ( $1178 \pm 595$  ng/l vs.  $931 \pm 481$  ng/l,  $p = 0.02$ ), previous renal failure ( $1796 \pm 808$  ng/l vs.  $1038 \pm 570$  ng/l,  $p < 0.001$ ), peripheral artery disease ( $1305 \pm 632$  ng/l vs.  $999 \pm 514$  ng/l,  $p = 0.003$ ), and dyspnea as assessed by NYHA  $> 1$  ( $1297 \pm 634$  ng/l vs.  $944 \pm 491$  ng/l,  $p = 0.002$ ).

#### 3.2. Factors associated with AKI

Among the 134 patients included, 42 (31%) developed AKI within the 48 h after surgery. 31 (74%) were classified as KDIGO stage 1, 8 (19%) as stage 2 and 3 (7%) as stage 3. Compared with non-AKI patients, several baseline parameters differed (Tables 1 and 2). Mainly, AKI patients were older, with a higher EuroSCORE and were more likely to have a history of HBP, previous renal failure, obesity, diabetes, and LVEF  $< 45\%$ . AKI was significantly associated with higher pre-operative SCr, NT-proBNP and serum GDF-15 concentrations. Moreover, AKI patients were significantly more likely to have undergone on-pump surgery than were non-AKI patients.

Table 3 after multivariate regression analysis, only 3 factors were independently associated with AKI in our population: pre-operative plasma log-GDF-15 levels (OR = 3.64; 95% CI = 1.41–9.40,  $p =$

**Table 1**

Baseline characteristics according to the occurrence of acute kidney injury (AKI).

n (%), median (interquartile range), mean $\pm$ SD	AKI (n = 42)	No AKI (n = 92)	<i>p</i>
<b>Risk factors</b>			
Age, years	69 (61–75)	63 (58–70)	0.021
Female sex	6 (14)	9 (10)	0.44
History of high blood pressure	34 (81)	55 (60)	0.02
Diabetes mellitus	22 (52)	28 (30)	0.02
Smoking	12 (29)	28 (30)	0.83
Obesity (BMI $\geq 30$ kg/m <sup>2</sup> )	25 (60)	36 (39)	0.03
Hypercholesterolemia	36 (86)	72 (78)	0.31
<b>Medical coronary history</b>			
Recent MI	7 (17)	32 (35)	0.04
Previous peripheral artery disease	11 (26)	31 (34)	0.39
Previous chronic renal failure	9 (21)	7 (8)	0.02
<b>Previous treatments</b>			
Betablockers	33 (79)	79 (86)	0.29
Calcium channel blockers	14 (33)	24 (26)	0.39
Diuretics	18 (43)	20 (22)	0.01
Statins	37 (88)	92 (100)	0.001
ACE inhibitors	27 (64)	57 (62)	0.80
VKA	1 (2)	4 (4)	0.58
<b>Clinical data</b>			
NYHA $> 1$	24 (57)	39 (42)	0.11
LVEF (%)	56 (48–64)	58 (50–65)	0.65
LVEF $< 45\%$	8 (19)	5 (5)	0.02
EuroSCORE	4 (2–6)	3 (1–4)	0.021
<b>Biological data</b>			
Pre-operative GDF-15, ng/L	1695 (1141–2422)	887 (640–1118)	$< 0.001$
NT-proBNP, pg/mL	335 (102–1011)	150 (75–487)	0.030
Creatinine, $\mu$ mol/L	94 (79–113)	82 (73–94)	0.003
eGFR (Cockcroft), ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	80 (63–95)	91 (71–119)	0.006
eGFR (MDRD), ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	71 (57–91)	85 (72–99)	0.002

ACE: angiotensin conversion enzyme; BMI: body mass index; eGFR: estimated glomerular filtration rate; GDF: Growth Differentiation Factor; ICU: intensive care unit; LVEF: left ventricular ejection fraction; MI: myocardial infarction; NT-proBNP: N terminal pro brain natriuretic peptide; NYHA: New-York Heart Association classification; SD: standard deviation, VKA: vitamin K antagonists.

0.008), pre-operative eGFR (OR = 0.98; 95% CI = 0.96–0.99;  $p = 0.026$ ), and on-pump surgery (OR = 2.60; 95% CI: 1.14–5.96,  $p = 0.024$ ).

#### 3.3. AKI and pre-operative GDF-15 serum concentrations

ROC curve analysis (Fig. 1) showed that GDF-15 was a better pre-operative serum biomarker to predict AKI (AUC 0.83; 95% CI 0.75–0.89), than eGFR (MDRD formula) (AUC 0.67; 95% CI 0.59–0.75),  $p = 0.003$  or NT-proBNP (AUC 0.62; 95% CI 0.51–0.72),  $p < 0.001$ . GDF-15 was also significantly better than the EuroSCORE in predicting AKI (AUC 0.62, 95% CI 0.54–0.70),  $p < 0.001$ . The addition of eGFR, of NT-proBNP or of the EuroSCORE to the GDF-15 ROC curve did not improve the discriminative value to identify AKI onset. The best pre-operative GDF-15 cut-off value to predict AKI was  $> 1033$  ng/ml with a sensitivity of 81% and specificity of 69%. When this cut-off value of GDF-15 levels was added to the multivariate regression analysis, only 2 factors were independently associated with AKI in our population: pre-operative GDF-15  $> 1033$  ng/ml (OR = 7.63; 95% CI = 3.09–18.84,  $p < 0.001$ ) and pre-operative eGFR (OR = 0.98; 95% CI = 0.96–0.99;  $p = 0.017$ ).

Using previously known predictors of AKI after cardiac surgery, we built a multivariate model (model 1) that included: a history of HBP, diabetes, preoperative eGFR, and ONP surgery (univariate analysis in Table 1). The performance of this model as assessed by the Chi-square value was 25.4 ( $p < 0.001$ ), and the fitting of the model was good (HL: 11.8,  $p = 0.16$ ). When pre-operative GDF-15 levels were added to model 1, the predictive performance of the model was significantly improved: (Chi-square = 29.3,  $p = 0.04$ ) (Fig. 2). Again, the fitting of the model was good (HL: 4.2,  $p = 0.84$ ). In contrast, adding preoperative

**Table 2**  
Clinical characteristics according to the occurrence of acute kidney injury (AKI).

n (%), median (interquartile range), mean ± SD	AKI (n = 42)	No AKI (n = 92)	
<b>Surgery data</b>			
Number of CABG			0.56
1	0	2 (2)	
2	9 (21)	19 (21)	
3	21 (50)	40 (44)	
4	9 (21)	25 (27)	
5	2 (5)	6 (7)	
6	1 (2)	0	
CBP	32 (76)	52 (57)	0.04
CBP duration (min)	106 (76–126)	88 (72–105)	0.10
Clamping duration (min)	76 (57–97)	65 (54–82)	0.12
<b>ICU management</b>			
Mechanical ventilation duration (hours)	6 (4–11)	5 (4–10)	0.22
ICU stay duration (hours)	88 (46–124)	48 (25–89)	0.001
Norepinephrine	22 (52)	31 (34)	0.04
Inotropic catecholamine	11 (26)	6 (7)	0.004
<b>Biological data</b>			
pH 3 h after surgery	7.39 (7.31–7.46)	7.39 (7.36–7.42)	0.65
Troponin 3 h after surgery, µg/L	3 (2–6)	4.2 (1.5–6.5)	0.11
Creatinine peak, µmol/L	152 (118–121)	95 (81–105)	<0.001
Lowest hemoglobin level, g/dL	8.7 (8.3–9.7)	9.6 (8.8–10.5)	0.001
Post-operative GDF-15, ng/L	4357 (2932–6226)	2280 (1645–2872)	<0.001
<b>In-hospital follow-up</b>			
Sepsis	6 (14)	2 (2)	0.01
Myocardial infarction	3 (7)	0	0.03
Atrial fibrillation	11 (26)	18 (20)	0.40
RRT	2 (5)	0 (0)	0.10
Death	2 (5)	1 (1)	0.23

CABG: cardiac artery bypass graft surgery; CBP: cardiopulmonary bypass; CRP: C reactive protein; GDF: growth differentiation factor; ICU: intensive care unit; NT-proBNP: N terminal pro brain natriuretic peptide; RRT: renal replacement therapy; SD: standard deviation.

NT-proBNP blood levels did not improve the model (Chi-square = 26.7, p = 0.27).

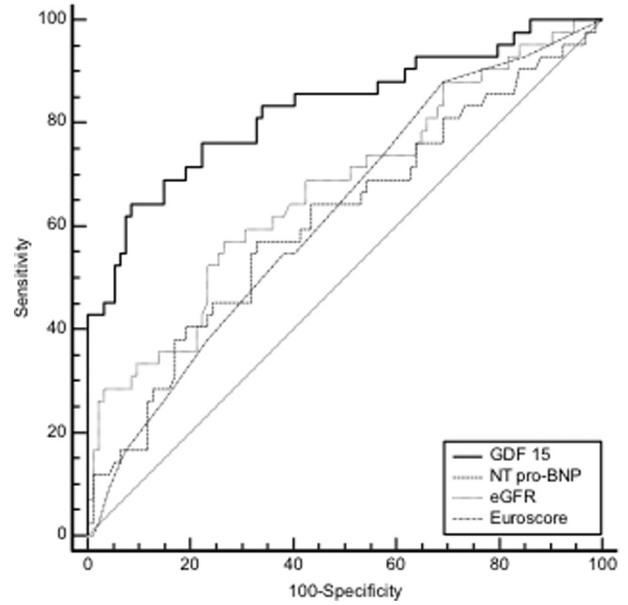
**3.4. Follow-up**

Several complications were identified during the hospital stay: 29 episodes of new-onset AF, 8 cases of sepsis, 3 myocardial infarctions, 3 deaths. AKI patients were significantly more likely to experience septic complications (14% vs. 2%, p = 0.01) and myocardial infarction (7% vs. 0%, p = 0.03) than were non-AKI patients. Renal replacement therapy

**Table 3**  
Factors associated with AKI by univariate and multivariate analysis.

Univariate analysis	Multivariate analysis			
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Age	1.06 (1.01–1.10)	0.02		
Female sex	2.51 (1.19–5.33)	0.02		
History of HBP	2.86 (1.19–6.86)	0.02		
Obesity	2.29 (1.09–4.82)	0.03		
Diabetes	2.51 (1.19–5.33)	0.02		
EuroSCORE	1.19 (1.02–1.19)	0.03		
LVEF < 45%	4.10 (1.25–13.40)	0.02		
Pre-operative eGFR	0.97 (0.96–0.99)	0.001	0.98 (0.96–0.99)	0.026
Pre-operative log GDF-15	4.87 (2.04–11.61)	<0.001	3.64 (1.41–9.40)	0.008
Pre-operative log NT-proBNP	2.03 (1.08–3.81)	0.03		
On-pump surgery	2.51 (1.19–5.33)	0.02	2.60 (1.14–5.96)	0.024

CI: confidence interval; eGFR: estimated glomerular filtration rate (MDRD formula); GDF: growth differentiation factor; HBP: high blood pressure; LVEF: left ventricular ejection fraction; MI: myocardial infarction; NT-proBNP: N terminal pro brain natriuretic peptide; OR: odds ratio.



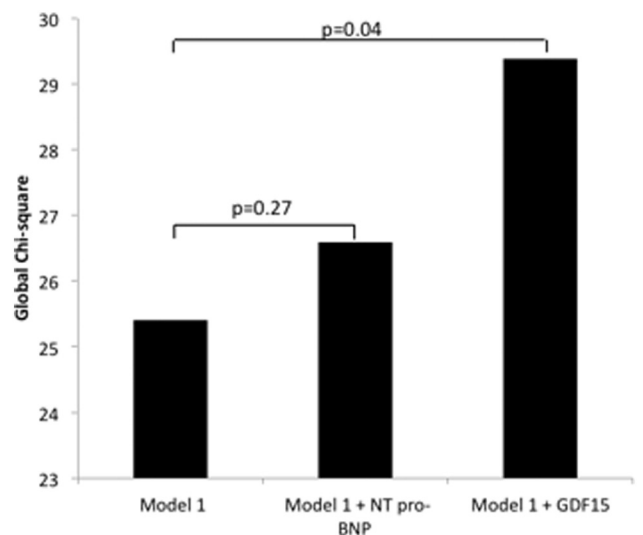
**Fig. 1.** ROC curves comparing sensitivity and specificity of preoperative GDF-15 versus NT-proBNP serum concentrations (p < 0.001), eGFR (p = 0.003) and versus the EuroSCORE (p < 0.001) for the prediction of post-CABG acute kidney injury.

was necessary in 2 of the 3 patients staged as AKIN 3, one of whom required chronic hemodialysis after surgery.

**4. Discussion**

Post-operative AKI is associated with high mortality and morbidity. Since no pharmacological therapy is available to treat AKI once installed, early preventive measures, including preoperative risk prediction and perioperative optimization may be a way to reduce postoperative AKI. Thus, AKI prediction thanks to a new biomarker could provide valuable help in the pre and perioperative management.

In the present study, 31% of our patients experienced AKI after CABG surgery. The factors independently associated with the onset of AKI



**Fig. 2.** Incremental value of either NT-proBNP or GDF-15 to predict AKI after CABG. Bar graph illustrating the change in global  $\chi^2$  value by the addition of either NT-proBNP or GDF-15 to a multivariate regression model comprising a history of HBP, diabetes, pre-operative eGFR and cardiopulmonary bypass surgery (model 1). The addition of GDF-15 (but not NT-proBNP) significantly improved the global  $\chi^2$ , thereby demonstrating the incremental value of GDF-15 to predict AKI after CABG.

were pre-operative plasma GDF-15 levels, pre-operative eGFR and on-pump surgery. On ROC curves, the pre-operative GDF-15 level was more discriminative than pre-operative eGFR, NT-proBNP, and the EuroSCORE. Moreover, pre-operative GDF-15 levels added an incremental predictive value when added to a predictive model that included a history of HBP, diabetes, pre-operative eGFR and ONP surgery.

The incidence of AKI closely depends on the definitions used. Studies that used RIFLE staging (an increase of 50% or more in SCr from baseline) reported an AKI rate as high as 30% [23,24]. In contrast, AKI was found to occur in 7.9% of patients by Conlon et al., who defined AKI as a rise in SCr > 1 mg/dL above baseline [4]. However, the AKIN classification, a modification of the RIFLE classification, has been used and validated in several studies [25]. Using AKIN [26] classification, Lamy et al. [27] found similar rates of AKI to that in the present study (31%). Recently, using KDIGO criteria [28], Machado et al. reported a 42% rate of AKI during the first 7 days after cardiac surgery.

Several risk factors of AKI after cardiac surgery have been described. These include age, female gender, chronic obstructive pulmonary disease, HBP, diabetes, peripheral vascular disease, previous renal failure, congestive heart failure, LVEF < 35%, emergency surgery, cardiogenic shock, duration of the CPB and cross-clamp, and on-pump surgery [29,30]. Most of these predictive criteria were also found in our population, except for female gender since most of our patients were male, and for emergency surgery and cardiogenic shock, which were exclusion criteria. Cross-clamp and CBP times were not statistically different between AKI and non-AKI patients. In accordance with the literature, procedures in AKI patients tended to be longer duration than those in non-AKI patients [6].

We found that ONP surgery was independently associated with a higher prevalence of AKI. This result is consistent with numerous publications regarding risk factors of AKI.

A recent randomized controlled trial that included more than 4752 patients showed that the incidence of AKI in OFP patients was lower than that in ONP patients (28 vs. 31%) [27]. This study confirmed that ONP cardiac surgery is one of the most common risk factors for AKI [31]. It is known that compared with OFP cardiac surgery, ONP is associated with an increase in both systemic inflammation and oxidative stress induced by ischemia-reperfusion injury [32,33]. In a previous study, we reported that a massive systemic release of free-radicals occurred following the removal of the cross-clamp during the CPB procedure [17]. In fact, during CPB, several factors (operative trauma, embolism, the contact of blood components with the artificial surface of the circuit, cardioplegic techniques and allogenic blood transfusion) stimulate pro-inflammatory mediators that activate leukocytes, vascular endothelial cells, and platelets. These mediators trigger a systemic inflammatory response that affects the heart, the brain, the lungs, and the kidneys.

Interestingly, although the GDF-15 level correlated well with renal function, its predictive value was independent of baseline eGFR or previous renal failure. Moreover, despite its positive association with traditional risk factors of AKI in our study, the association between GDF-15 and AKI was independent of these risk factors. Indeed, when GDF-15 was added to a predictive model that included classical predictors of AKI, the predictive performance of the model was significantly improved. In contrast, the addition of pre-operative NT-proBNP levels to this model had no significant impact. Moreover, pre-operative GDF-15 showed a better discriminative value on the onset of AKI than did the EuroSCORE, NT-proBNP and eGFR, as assessed by the comparison of ROC curves. GDF-15 has been described as a powerful marker of cardiovascular events (mortality, recurrent heart failure, recurrent myocardial infarction) in various populations, including patients with myocardial infarction or heart failure [34]. GDF-15 even improved risk stratification using the EuroSCORE before cardiac surgery [15]. However, in the particular setting of renal failure, very few studies are available regarding its prognostic value. In type-1 diabetic patients, high GDF-15 levels are associated with a rapid decrease in eGFR [35].

It has already been suggested that the association of GDF-15 levels with reduced renal function could reflect a combination of altered renal clearance of GDF-15 along with increased expression in the setting of renal dysfunction, as has been shown in animal models of kidney injury [34,36]. Indeed, this cytokine is secreted early in the setting of renal endothelial dysfunction [37]. Vascular dysfunction is known to precede the development of microalbuminuria [38] and may be one of the plausible mechanisms by which increased GDF-15 is relevant to kidney injury. As a consequence, elevated preoperative plasma GDF-15 levels might reflect previous subclinical renal injury, which is undetectable using actual clinical testing.

#### 4.1. Limitations

Our study has limitations. Mainly, we did not measure urinary NGAL, which has been described as an early postoperative biomarker of AKI. However, our purpose was to evaluate the improvement in preoperative risk stratification rather than the early detection of AKI. Another limitation must be highlighted: given the relatively small number of patients (since our inclusion criteria were designed to recruit a homogeneous and “otherwise healthy” cohort of patients), our results should be confirmed in larger population studies. Finally, even though the patients undergoing on-pump and off-pump surgeries were comparable, the study was not designed as a randomized controlled trial to compare the incidence of AKI in both groups.

#### 5. Conclusion

Patients with the highest pre-operative plasma GDF-15 levels are at risk for AKI after CABG surgery (31% in our study). If confirmed in larger cohorts, pre-operative GDF-15 may be a valuable blood test to improve pre-operative risk stratification and discrimination among surgical candidates.

This newly used biomarker may therefore be of interest in identifying patients for future preventive therapeutic strategies.

#### Conflict of interest

None.

#### Acknowledgments

The authors thank Frédérique Debomy for her technical assistance and Philip Bastable for English revision of the manuscript.

#### References

- [1] G.M. Chertow, E. Burdick, M. Honour, J.V. Bonventre, D.W. Bates, Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients, *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 (2005) 3365–3370.
- [2] S.G. Coca, B. Yusuf, M.G. Shlipak, A.X. Garg, C.R. Parikh, Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis, *Am. J. Kidney Dis.* 53 (2009) 961–973.
- [3] A. Lassnigg, D. Schmidlin, M. Mouhieddine, L.M. Bachmann, W. Druml, P. Bauer, et al., Minimal changes of serum creatinine predict prognosis in patients after cardiothoracic surgery: a prospective cohort study, *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (2004) 1597–1605.
- [4] P.J. Conlon, M. Stafford-Smith, W.D. White, M.F. Newman, S. King, M.P. Winn, et al., Acute renal failure following cardiac surgery, *Nephrol. Dial. Transplant.* 14 (1999) 1158–1162.
- [5] P.E. Antunes, D. Prieto, J. Ferrao de Oliveira, M.J. Antunes, Renal dysfunction after myocardial revascularization, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 25 (2004) 597–604.
- [6] C.V. Thakar, O. Liangos, J.P. Yared, D.A. Nelson, S. Hariachar, E.P. Paganini, Predicting acute renal failure after cardiac surgery: validation and re-definition of a risk-stratification algorithm, *Hemodial. Int.* 7 (2003) 143–147.
- [7] B.O. Eriksen, K.R. Hoff, S. Solberg, Prediction of acute renal failure after cardiac surgery: retrospective cross-validation of a clinical algorithm, *Nephrol. Dial. Transplant.* 18 (2003) 77–81.
- [8] G.M. Chertow, J.M. Lazarus, C.L. Christiansen, E.F. Cook, K.E. Hammermeister, F. Grover, et al., Preoperative renal risk stratification, *Circulation* 95 (1997) 878–884.
- [9] C.R. Parikh, P. Devarajan, New biomarkers of acute kidney injury, *Crit. Care Med.* 36 (2008) S159–S165.



- [10] M.G. Shlipak, M.D. Mattes, C.A. Peralta, Update on cystatin C: incorporation into clinical practice, *Am. J. Kidney Dis.* 62 (2013) 595–603.
- [11] S.K. Jo, M.H. Rosner, M.D. Okusa, Pharmacologic treatment of acute kidney injury: why drugs haven't worked and what is on the horizon, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2 (2007) 356–365.
- [12] G. Maitra, A. Ahmed, A. Rudra, R. Wankhede, S. Sengupta, T. Das, Renal dysfunction after off-pump coronary artery bypass surgery—risk factors and preventive strategies, *Indian J. Anaesth.* 53 (2009) 401–407.
- [13] Y. Shi, J. Massague, Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus, *Cell* 113 (2003) 685–700.
- [14] T. Ago, J. Sadoshima, GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein, *Circ. Res.* 98 (2006) 294–297.
- [15] M. Heringlake, E.I. Charitos, N. Gatz, J.H. Kabler, A. Beilharz, D. Holz, et al., Growth differentiation factor 15: a novel risk marker adjunct to the EuroSCORE for risk stratification in cardiac surgery patients, *J. Am. Coll. Cardiol.* 61 (2013) 672–681.
- [16] K.C. Wollert, Growth-differentiation factor-15 in cardiovascular disease: from bench to bedside, and back, *Basic Res. Cardiol.* 102 (2007) 412–415.
- [17] A. Kahli, C. Guenancia, M. Zeller, S. Grosjean, K. Stamboul, L. Rochette, et al., Growth differentiation factor-15 (GDF-15) levels are associated with cardiac and renal injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass, *PLoS One* 9 (2014) e105759.
- [18] A.S. Levey, J. Coresh, E. Balk, A.T. Kausz, A. Levin, M.W. Steffes, et al., National kidney foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification, *Ann. Intern. Med.* 139 (2003) 137–147.
- [19] Notice, *Kidney Int. Suppl.* 2012 (2) (2011) 1.
- [20] O. Bouchot, R.L. Berger, J.P. Berne, F. Brunotte, R. Brenot, Clinical experience with a novel thermosensitive temporary coronary artery occluder (LeGoo), *Ann. Thorac. Surg.* 89 (2010) 1912–1917.
- [21] W.J. Youden, Index for rating diagnostic tests, *Cancer* 3 (1950) 32–35.
- [22] E.R. DeLong, D.M. DeLong, D.L. Clarke-Pearson, Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach, *Biometrics* 44 (1988) 837–845.
- [23] C.M. Mangano, L.S. Diamondstone, J.G. Ramsay, A. Aggarwal, A. Herskowitz, D.T. Mangano, Renal dysfunction after myocardial revascularization: risk factors, adverse outcomes, and hospital resource utilization. The Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group, *Ann. Intern. Med.* 128 (1998) 194–203.
- [24] G.M. Chertow, E.M. Levy, K.E. Hammermeister, F. Grover, J. Daley, Independent association between acute renal failure and mortality following cardiac surgery, *Am. J. Med.* 104 (1998) 343–348.
- [25] A.B. Kumar, M. Suneja, Cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury, *Anesthesiology* 114 (2011) 964–970.
- [26] R.L. Mehta, J.A. Kellum, S.V. Shah, B.A. Molitoris, C. Ronco, D.G. Warnock, et al., Acute kidney injury network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury, *Crit. Care* 11 (2007) R31.
- [27] A. Lamy, P.J. Devereaux, D. Prabhakaran, D.P. Taggart, S. Hu, E. Paolasso, et al., Off-pump or on-pump coronary-artery bypass grafting at 30 days, *N. Engl. J. Med.* 366 (2012) 1489–1497.
- [28] M.N. Machado, M.A. Nakazone, L.N. Maia, Prognostic value of acute kidney injury after cardiac surgery according to kidney disease: improving global outcomes definition and staging (KDIGO) criteria, *PLoS One* 9 (2014) e98028.
- [29] M.H. Rosner, M.D. Okusa, Acute kidney injury associated with cardiac surgery, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 1 (2006) 19–32.
- [30] J.L. Koyner, A.X. Garg, M.G. Shlipak, U.D. Patel, K. Sint, K. Hong, et al., Urinary cystatin C and acute kidney injury after cardiac surgery, *Am. J. Kidney Dis.* 61 (2013) 730–738.
- [31] S. Uchino, J.A. Kellum, R. Bellomo, G.S. Doig, H. Morimatsu, S. Morgera, et al., Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study, *JAMA* 294 (2005) 813–818.
- [32] P. Menasche, The systemic factor: the comparative roles of cardiopulmonary bypass and off-pump surgery in the genesis of patient injury during and following cardiac surgery, *Ann. Thorac. Surg.* 72 (2001) S2260–S2265 (discussion S5–6, S7–70).
- [33] N.S. Dhalla, A.B. Elmoselhi, T. Hata, N. Makino, Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury, *Cardiovasc. Res.* 47 (2000) 446–456.
- [34] L. Lind, L. Wallentin, T. Kempf, H. Tapken, A. Quint, B. Lindahl, et al., Growth-differentiation factor-15 is an independent marker of cardiovascular dysfunction and disease in the elderly: results from the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) Study, *Eur. Heart J.* 30 (2009) 2346–2353.
- [35] M. Lajer, A. Jorsal, L. Tarnow, H.-H. Parving, P. Rossing, Plasma growth differentiation factor-15 independently predicts all-cause and cardiovascular mortality as well as deterioration of kidney function in type 1 diabetic patients with nephropathy, *Diabetes Care* 33 (2010) 1567–1572.
- [36] T.A. Zimmers, X. Jin, E.C. Hsiao, S.A. McGrath, A.F. Esqueda, L.G. Koniaris, Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury, *Shock* 23 (2005) 543–548.
- [37] J.E. Ho, S.-J. Hwang, K.C. Wollert, M.G. Larson, S. Cheng, T. Kempf, et al., Biomarkers of cardiovascular stress and incident chronic kidney disease, *Clin. Chem.* 59 (2013) 1613–1620.
- [38] C.D. Stehouwer, H.R. Fischer, A.W. van Kuijk, B.C. Polak, A.J. Donker, Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM, *Diabetes* 44 (1995) 561–564.

***DISCUSSION***

***ET***

***PERSPECTIVES GENERALES***

## A. BIOMAQUEURS ET STRATIFICATION DU RISQUE

En chirurgie cardiovasculaire, le pronostic est actuellement basé sur des formules et théories qui reposent entre autres sur des antécédents médicaux, familiaux, sur le mode de vie, les comorbidités, permettant d'établir un score de risque de mortalité. Cependant, il existe des variations interindividuelles : récupération, complications, survie... D'où la nécessité d'identifier de nouveaux moyens, les biomarqueurs, pour aider les cliniciens. La variabilité interindividuelle est très importante dans ce genre d'interventions et conditionne certainement la survenue de complications per- et postopératoires. Rentrent en compte le polymorphisme génétique qui concerne différents facteurs impliqués dans la physiopathologie peropératoire [455]. Malgré ce constat, l'un des objectifs visant à améliorer la prise en charge des patients est de mettre en évidence des biomarqueurs pertinents et disponibles par la facilité de réalisation des tests permettant une aisance d'analyse qui participera à la démarche diagnostique.

Lors d'une intervention de chirurgie cardiaque, l'objectif est de permettre au muscle myocardique de repartir avec le moins de complications possibles aussi bien au niveau cardiaque que systémique. Afin d'anticiper l'apparition ou la progression de ces complications, des indices clinico-biologiques existent déjà et attestent de l'efficacité des progrès réalisés dans le champ de la prévention. Cependant, certains patients se retrouvent dans des zones d'ombres de classification de risque, aboutissant à des choix de recours aux traitements à la discrétion du ou des opérateurs chez ces patients. Les biomarqueurs peuvent constituer une alternative objective quant à la sélection du type d'intervention, notamment grâce au fait qu'ils reflètent la présence ou l'absence d'une souffrance d'un organe, le niveau d'inflammation et de stress oxydant à un instant donné.

Cependant, la recherche et le développement de biomarqueurs dans le contexte chirurgical restent très marginaux. Pourtant, il s'agit des mêmes patients pour lesquels les diagnostics reposent sur l'évaluation du risque sur la mesure des biomarqueurs. La plupart des études publiées décrivent des variations d'un certain nombre de biomarqueurs lors de procédures chirurgicales et au cours des périodes postopératoires. Toutefois, la majorité d'entre elles ne recherche pas de liens entre les taux de ces biomarqueurs et l'évolution des patients. Bien que l'élévation de certains biomarqueurs reflète une atteinte d'un ou de plusieurs organes, il n'est pas toujours clair de savoir si ces taux élevés orientent vers (ou sont associés) à une

mauvaise récupération postopératoire des patients. De plus, devant l'offre pléthorique quasi-quotidienne de nouveaux biomarqueurs, il est évident que le choix reste difficile voire impossible à arrêter.

## B. CAS PARTICULIER DU GDF-15

L'importance du GDF-15, en tant que biomarqueur au sein des nouveaux modèles de prédiction de risque de morbi-mortalité, se révèle particulièrement dans les champs thérapeutiques et diagnostiques des spécialités cardiovasculaires et métaboliques.

D'une part, de nombreuses études pharmacologiques incluent le GDF-15 dans la prédiction de survenue de complications thromboemboliques chez des patients atteints de FA et traités par les nouveaux anticoagulants oraux directs (étude ARISTOTLE) [456, 457], de survenue d'évènements chez des patients coronariens stables (étude STABILITY) [458] ou chez des patients en SCA (études PLATO, PROVE IT-TIMI 22) [322, 459], ce qui nous conduit à inclure le GDF-15 parmi les potentiels futurs biomarqueurs « compagnons » et ainsi de l'intégrer dans le développement de nouveaux médicaments. Très récemment, le GDF-15 a été inclus dans un nouveau score de risque de saignement (*ABC-bleeding score*) ayant fait l'objet d'une validation et d'une calibration sur une large cohorte de patients atteints de FA sous traitement anticoagulant oral. En incluant aussi bien des variables cliniques (âge, antécédents, comorbidités) et biologiques (hémoglobine, troponines cardiaque hypersensible, et GDF-15 ou la cystatine C), ce score semble améliorer significativement le pronostic de saignements majeurs comparé aux scores actuellement en vigueur (HAS-BLED, ORBIT) [460].

D'autre part, des travaux s'intéressent plus largement au risque global en incluant également le GDF-15. Zhang et coll. ont réalisé une étude dont l'objectif était de mettre au point une stratégie multimarqueur dans le but de prédire les évènements cardiovasculaires chez les patients présentant des lésions coronariennes légères à modérées. Cette étude a examiné 9 cytokines inflammatoires plasmatiques, dont le GDF-15, chez 964 patients, et a évalué leurs associations avec le risque d'apparition d'évènements cardiovasculaires au cours d'un suivi de 3 ans. Il en a été conclu que le GDF-15 faisait partie des biomarqueurs intéressants dans la prédiction de pathologies cardiovasculaires. Cette étude montre qu'une

approche multimarqueur est significativement plus utile pour prédire la progression de ces pathologies par rapport à une approche avec un seul et unique biomarqueur [461]. De façon similaire, Schnabel et coll. ont étudié 12 biomarqueurs dont le GDF-15, associés à l'inflammation, au métabolisme lipidique, à la fonction rénale ainsi qu'aux fonctions et au remodelage cardiaque. Ces marqueurs sont la CRP, le GDF-15, la néoptérine, l'Apo A1, B100, la cystatine C, la créatinine, la copeptine, la C-terminal-proendotheline-1, midregional-proadrenomedulline (MR-proADM), MR-proANP et Nt-proBNP. Les échantillons sanguins ont été collectés chez 1 781 patients atteints d'angor stable. L'objectif était de mettre en relation ces biomarqueurs avec l'apparition d'IDM non-fatal et la mort d'origine cardiovasculaire. Cette étude concluait que Nt-proBNP, GDF-15, MR-proANP, cystatine C et MR-proADM étaient les prédicteurs les plus puissants des évènements cardiovasculaires chez ce type de patients [462]. Le GDF-15 est désormais bien identifié comme un marqueur pronostic puissant chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires telles que les coronaropathies, les SCA [321, 376] et l'IC [463]. Enfin, chez les patients en chirurgie cardiaque, il a été suggéré que le GDF-15 pourrait représenter un nouveau marqueur de risque en association avec l'EuroSCORE dans la stratification du risque [464]. Cette dernière étude a conclu que le taux plasmatique préopératoire de GDF-15 constituait un facteur prédictif indépendant de la mortalité et de la morbidité postopératoires. En outre, ce taux permet une meilleure stratification des patients en regard des scores de risque ou des marqueurs cardiovasculaire utilisés actuellement en clinique.

### C. DISCUSSION

C'est dans cette perspective et en parallèle de ces découvertes que notre équipe a entamé des travaux visant à mieux cerner l'apport du dosage du GDF-15 dans le contexte chirurgical. Ces recherches furent en effet motivées à la fois par l'expertise de notre équipe dans l'investigation des phénomènes inflammatoires et oxydants déclenchés au cours de l'intervention chirurgicale, et par le caractère pertinent et les propriétés séduisantes du GDF-15 abordés tout au long de ce manuscrit.

La première phase de ce travail a consisté à étudier l'évolution du GDF-15 dans un contexte chirurgical qui, par définition, possède un caractère aigu en termes de stimulation

inflammatoire et de lésions tissulaires. Notre première étude fut ainsi conçue afin d'évaluer les cinétiques plasmatiques des taux de GDF-15 chez des patients atteints de coronaropathies sévères, nécessitant une chirurgie cardiaque pour la réalisation de PAC et sous assistance extracorporelle. Cette étude préliminaire fut le premier travail rapportant des augmentations rapides des concentrations plasmatiques de GDF-15 au cours d'une chirurgie cardiaque sous CEC. De plus, cette étude prospective a permis de confirmer que les taux de GDF-15 étaient aussi bien associés à l'apparition d'atteintes postopératoires cardiaques que rénales. Cependant, de nombreux facteurs entrent en jeu lors de ce type d'intervention, tels que décrits dans la partie introductive (phénomène inflammatoires et nitro-oxydants, cascade de coagulation et fibrinolyse, hémodilution, etc.). Le GDF-15 semble être associé à chacun de ces phénomènes, ce qui peut conduire à écarter le GDF-15 en tant que candidat dans la sélection de biomarqueurs plus spécifiques d'une atteinte donnée. De plus, cette étude, restreinte par le faible nombre de patients inclus, ne prétendait pas aboutir à des conclusions robustes et à large portée. Néanmoins, malgré cette apparente faiblesse d'ordre statistique et méthodologique, la puissance fut suffisante pour mettre en évidence une relation très étroite entre les taux plasmatiques pré, per et postopératoires de GDF-15 et les résultats de l'EuroSCORE. Cette découverte a confirmé le caractère plurifactoriel du GDF-15, le définissant ainsi comme un biomarqueur intégrateur de plusieurs phénomènes et atteintes, et pouvant potentiellement aboutir à l'établissement d'un nouveau type de score clinico-biologique, tel que décrit dans l'étude d'Heringlake et coll. [464]. Ce manque de spécificité lui confère en retour sa puissance comme marqueur pronostique de gravité, capable d'intégrer différents indicateurs aussi bien cliniques que biologiques de causes et de mécanismes différents.

Bien que certaines études décrites précédemment préconisent une approche multimarqueur dans l'évaluation du risque qu'il soit de nature cardiovasculaire ou global, l'apport du GDF-15 présente l'avantage de s'affranchir d'un grand nombre de tests supplémentaires pouvant conduire à des difficultés d'interprétation et ainsi reproduire les mêmes erreurs et partager les mêmes limites que les scores cliniques (variabilité interindividuelle des cliniciens, surévaluation du risque de mortalité, zones d'incertitude...). Néanmoins, notre étude a également permis d'explorer d'autres biomarqueurs tels que la FSTL-1, le NGAL, les dérivés diméthylés de la L-Arginine, les MPO et les marqueurs du stress oxydant (pouvoir antioxydant du plasma, hydroperoxydes plasmatiques) en complément du GDF-15. Ces

critères biologiques secondaires étaient destinés à mettre en exergue les éventuelles relations que pouvaient entretenir le GDF-15 en tant que facteur biologique, mais également de dépister ses origines au cours du temps. Compte-tenu du caractère ubiquitaire et pléiotrope du GDF-15, nous avons tenté de discriminer les différentes étapes de sa libération avant, pendant et après l'intervention. Il semble ainsi que sa production dans ce laps de temps soit à la fois d'origine systémique, provoquée pour l'essentiel par l'inflammation, et tissulaire, suite aux phénomènes d'I/R au cours du déclantage aortique, sans pour autant obtenir la certitude de son origine, notamment cardiaque, au cours des phases précoces de reperfusion.

Pour le versant rénal, nous avons opté pour le NGAL qui fut à l'origine identifié dans les granules des neutrophiles, mais également exprimé dans le rein et le foie, et dont la synthèse est induite en réponse à l'inflammation, aux infections, à l'ischémie et lors d'IRA [438]. Plusieurs études, dont les investigations portaient sur les patients en chirurgie cardiaque, ont montré que les taux de NGAL urinaires et sanguins pourraient constituer des biomarqueurs précoces de l'IRA [465]. Le dosage du NGAL, notamment au niveau urinaire, permet de distinguer les patients en IRA des patients atteints d'une IRC ou encore de les différencier des situations où l'élévation de la créatinémie est d'origine extra-rénale. Les taux de NGAL semblent être également utiles dans la discrimination des autres formes d'IRA, telles que le rejet de greffe rénale [466] et les néphropathies induites par les produits de contraste iodés [467]. Nous avons mis en évidence une association étroite entre des taux élevés de GDF-15 et un mauvais DFG. Compte tenu du nombre limité de patients, peu d'évènements indésirables ont pu être enregistrés. Seuls 9 cas d'IRA ont été déclarés, et les résultats nécessitent d'être interprétés avec prudence. En particulier, nous n'étions pas capables de montrer que la valeur pronostique des mesures précoces de GDF-15 était meilleure que le modèle associant les 2 biomarqueurs les plus puissants de l'AKIN. Néanmoins, ce résultat confirme et oriente vers l'existence d'une relation très étroite entre le GDF-15 et la fonction rénale. Ainsi, la combinaison avec les marqueurs déjà connus tels que le NGAL et le DFG pourrait être utilisée dans la détection précoce de l'IRA post-chirurgicale. Ceci est en accord avec des précédentes études montrant le GDF-15 comme un nouveau marqueur sérique indépendant de la mortalité dans les IRC [468]. Les corrélations entre les taux de GDF-15 et les biomarqueurs de la fonction rénale (créatinine, l'urée ou le NGAL) devenaient significatifs au cours de la période postopératoire jusqu'au lendemain de

la chirurgie. Ceci suggère que le GDF-15 peut aussi provenir du rein et/ou est influencé par la fonction rénale. En effet, des taux urinaires élevés de GDF-15 ont été mis en évidence chez les patients atteints de diabète de type 2 avec un DFG subnormal et étaient associés à une lésion du tubule proximal [423].

Face à cette observation, nous avons décidé d'étudier plus précisément et à une plus large échelle l'intérêt potentiel des taux plasmatiques du GDF-15 dans l'identification des patients à haut risque d'IRA après PAC. Dans cette seconde étude, réalisée sur une cohorte de 134 patients, 31% d'entre eux ont déclaré une IRA après une chirurgie pour PAC avec ou sans assistance extracorporelle. Les facteurs indépendamment associés au déclenchement d'une IRA étaient les taux préopératoires plasmatiques de GDF-15, en plus du DFG préopératoire et de la chirurgie sous CEC. Le taux de GDF-15 préopératoire était plus discriminant que le DFG préopératoire, le NT-proBNP et l'EuroSCORE. Ce taux de GDF-15 était bien corrélé à la fonction rénale, et sa valeur prédictive était indépendante du DFG à l'admission et des antécédents d'IR. L'association entre le GDF-15 et la survenue d'IRA était indépendante de tout autre facteur de risque de l'IRA avec l'amélioration de la performance du modèle prédictif incluant les prédicteurs classiques d'IRA [427]. Cependant, à la différence de notre précédente étude où nous obtenions des résultats intéressants grâce à la combinaison du NGAL avec le GDF-15, nous n'avons pu vérifier cette association par défaut de mesure du NGAL. D'ailleurs, il existe d'autres biomarqueurs pertinents dans le risque d'atteinte rénale qu'il aurait été intéressant d'explorer.

Des études se focalisant sur l'IL-18 ont révélé que l'élévation de ses taux urinaires est spécifique d'une nécrose tubulaire aigue et est associée à un risque élevé d'occurrence d'évènements cliniques indésirables. Le KIM-1 (Kidney Injury Molecule 1) est une glycoprotéine transmembranaire qui est surexprimée par les cellules du tubule proximal suite à des lésions d'origine ischémique ou toxique [469, 470]. Ainsi, l'excrétion de KIM-1 dans les urines est hautement spécifique d'atteintes rénales. L'étude de l'expression de KIM-1 à partir de biopsies rénales permet de différencier les cas de nécrose tubulaire aigue des cas d'azotémie pré-rénale ou d'IRC [471]. Enfin, récemment, des résultats prometteurs concernent deux nouveaux biomarqueurs : TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2) et IGFBP7 (Insulin-like growth factor-binding protein 7). Grâce à l'établissement de valeurs seuils, il semble qu'une seule mesure urinaire précoce de ces 2 biomarqueurs permette de



classer les patients admis en soins intensifs en fonction du risque de développer une IRA quelle qu'en soit l'étiologie [472].

Néanmoins, notre objectif principal était d'évaluer l'amélioration préopératoire de la stratification du risque et pas seulement la détection précoce de l'IRA. Par conséquent, des taux plasmatiques préopératoires élevés de GDF-15 pourraient refléter une « susceptibilité » rénale à une agression aiguë, indétectable par les tests cliniques actuels, nous affranchissant ainsi de la mesure de biomarqueurs de lésions. Il a été déjà suggéré plus haut que l'association des taux de GDF-15 avec une fonction rénale abaissée pourrait refléter une combinaison d'une clairance rénale altérée de GDF-15 aussi bien qu'une augmentation de son expression dans le cadre de la dysfonction rénale, telle que démontrée dans les études portant sur des modèles animaux de lésions rénales [422]. En effet, cette cytokine est sécrétée précocement dans un contexte de dysfonction endothéliale rénale [420]. La dysfonction vasculaire est connue pour précéder le développement de la micro albuminurie [473] et peut être l'un des mécanismes plausibles par lequel l'élévation du GDF-15 est pertinente dans l'évaluation des lésions rénales.

Enfin, une autre limite qui doit être soulignée concerne le nombre restreint de patients dans notre étude (nos critères d'inclusion étaient choisis pour recruter une cohorte de patients homogène et présentant un nombre limité de comorbidités). Ainsi, ces résultats doivent être confirmés sur une plus large cohorte. Enfin, bien que les patients inclus dans l'un ou l'autre des groupes (avec ou sans assistance extracorporelle) étaient comparables, l'étude initiale ne fut pas élaborée comme un essai randomisé contrôlé dans le but de comparer l'incidence d'IRA au sein des 2 groupes.

## D. PERSPECTIVES

### ❖ GDF-15, un biomarqueur de susceptibilité rénale

Il est très important de se projeter au-delà du champ de la réanimation chirurgicale, car ces résultats prometteurs pourraient bénéficier à d'autres spécialités telles que la réanimation médicale ou encore les urgences.

En effet, les atteintes rénales aiguës affectent approximativement 35% des patients admis en soins intensifs [474]. Le sepsis et les chocs septiques demeurent la cause majeure de ces

néphropathies aiguës chez les patients gravement atteints et représentent plus de 50% des cas d'IRA dans les services de soins intensifs [231]. Malgré des progrès dans les capacités à fournir un support aux organes atteints (thérapies de remplacement rénal, médecine de réanimation), le pronostic des patients dialysés est toujours sombre [231]. L'incidence de l'IRA nécessitant une dialyse se situe entre 4 et 6% des patients hospitalisés en soins intensifs, avec un taux de mortalité qui varie de 60 à 90% [231, 475, 476]. Cette mortalité hospitalière ne s'est significativement pas améliorée au cours de ces 50 dernières années [477, 478]. L'IRA est désormais considérée comme un facteur de risque du développement ultérieur d'une insuffisance rénale chronique (IRC) et de mortalité à long terme [479-482].

Etant donné l'absence de mesures thérapeutiques suffisamment efficaces dans le traitement de l'IRA installée [483], seules des mesures préventives incluant la prédiction du risque et l'optimisation de la prise en charge peuvent permettre de réduire l'IRA et ses complications. Cette prédiction du risque se reposera en particulier sur la mesure de biomarqueurs. Il existe néanmoins toujours des obstacles à l'utilisation de ces biomarqueurs dans le diagnostic de l'IRA. Le fait que peu d'études aient évalué l'impact des informations fournies par ces biomarqueurs dans la prise de décision constitue l'une des barrières à ce transfert au lit du patient. En effet, plusieurs questions demeurent en suspens, notamment en ce qui concerne la démarche à suivre en cas de résultats positifs : une dialyse doit-elle être initiée ? Quel type d'intervention doit-on mettre en œuvre ? Ces interventions précoces permettent-elles de réduire la mortalité hospitalière et à long terme ? L'objectif est de pouvoir y répondre le plus précisément possible, afin d'inclure le dosage de ces biomarqueurs dans la pratique clinique de routine, mais également de mettre en œuvre de nouvelles recommandations qui pourraient s'ajouter à celles déjà établies dans le domaine de la prise en charge de l'IR [484].

Quelques stratégies sont déjà à l'œuvre dans la prévention du risque de complications rénales. Ces mesures préventives peuvent inclure un contrôle strict de la balance hydrique au cours des périodes per- et postopératoires, éviter les basses températures de perfusion au cours de la CEC [485], la contre-indication des médicaments ou substances néphrotoxiques ou encore motiver l'administration d'érythropoïétine après la chirurgie chez les patients à risque [486].

### ❖ **GDF-15, un biomarqueur cardiométabolique**

Il est également très important de prendre en considération le statut cardiométabolique des patients candidats à ce type d'intervention chirurgicale. Parmi les résultats issus de notre seconde étude, nous avons pu constater que les patients diabétiques étaient significativement plus à risque de développer une IRA postopératoire (52% vs. 30% ;  $p=0,02$ ). Ces résultats sont en totale adéquation avec les précédentes études déjà citées et qui mettaient en relation les taux de GDF-15 et le risque de développement ou de complications de néphropathies diabétiques. En outre, nous avons observé que les patients traités par des inhibiteurs de l'HMG-CoA- Reductase (statines) étaient significativement plus protégés de la survenue d'IRA postopératoire (88% vs. 100% ;  $p=0,001$ ). Ces mêmes patients présentaient donc des taux préopératoires de GDF-15 significativement plus faibles.

Ce constat est particulièrement intéressant, car il ouvre la voie vers de nouveaux moyens d'évaluation de la protection systémique. En effet, depuis de nombreuses années, les statines ont été identifiées comme des médicaments aux propriétés anti-inflammatoires, au-delà de leur action hypolipémiante, en améliorant la fonction endothéliale vasculaire mais également en modulant les réponses inflammatoires systémiques, contribuant à leur caractère pléiotrope. Bien que l'ensemble des études épidémiologiques sur de grands effectifs de patients suggère que l'administration de statines a un impact favorable sur l'évolution postopératoire des patients à risque cardiovasculaire, aucune d'entre elles ne s'est intéressée ou n'a démontré d'effet sur les marqueurs de l'inflammation [487-491].

Le profil pléiotrope que partagent d'une part les statines en tant qu'agent pharmacologique et d'autre part le GDF-15 en tant que facteur et biomarqueur de l'inflammation méritent réflexion sur leurs potentielles relations dans l'équilibre du statut inflammatoire chez les patients candidats à la chirurgie cardiaque et non-cardiaque. Afin de mieux mettre en valeur ce probable lien de l'effet d'un traitement par statines sur les taux circulants de GDF-15, des travaux prospectifs, randomisés et contrôlés devront être menés.

### ❖ **Réflexions autour du développement futur du GDF-15**

Si nos observations sont confirmées à une plus large échelle, le GDF-15 pourrait entrer dans un processus de validation de critère de substitution (mesure d'un biomarqueur en remplacement d'un événement clinique reconnu, généralement utilisé comme critère d'évaluation de l'efficacité ou de la tolérance) qui constitue l'étape ultime de validation d'un

biomarqueur [492]. L'autre alternative est de développer le GDF-15 en tant que facteur d'enrichissement en incluant sa mesure dans un modèle ou un score clinique et/ou biologique afin d'améliorer la capacité de discriminer les patients à risque de complications [493]. Ceci est déjà le cas avec la validation du score de risque hémorragique, déjà abordé plus haut [460]. Dans les deux cas, le GDF-15 est inclus dans un processus qui débute par le diagnostic en passant par le choix du traitement et jusqu'au suivi de la réponse au traitement.

Ce dernier concept porte le nom de théranostique (contraction des mots thérapeutique et diagnostique) et comprend un large éventail de notions incluant aussi bien la médecine personnalisée que la pharmacogénomique ou encore l'imagerie moléculaire ; l'objectif est le développement de thérapies ciblées. La notion d'approche ciblée implique le dosage de « biomarqueurs » pour sélectionner, avant l'instauration de traitement ou la mise en place d'une procédure thérapeutique, les patients répondeurs ou pour écarter les patients à risque de développer une complication ou un effet indésirable [494].

Ce concept peut encore évoluer vers une nouvelle définition, dans laquelle plusieurs biomarqueurs compilés dans un score biologique peuvent constituer à la fois un outil de prédiction du risque et un moyen de sélectionner les répondeurs à un certain type de traitement. Nous sommes encore à l'aube de la théranostique, mais l'accélération des découvertes de nouvelles méthodes diagnostiques nous amènent déjà à envisager les nouvelles pistes à explorer. L'actualité des biomarqueurs est bousculée par l'avènement des micro-ARN dont l'essor ne cesse de croître de jour en jour, y compris dans le domaine de la chirurgie cardiovasculaire [495, 496]. Bientôt, leur nombre va supplanter celui des biomarqueurs « classiques » en majorité sériques utilisés actuellement en pratique clinique. En effet, les « Omiques » dont font partie les micro-ARNs s'invitent de plus en plus dans la clinique, grâce notamment aux progrès des technologies de biologie moléculaire dont les instruments et réactifs sont déjà disponibles pour une activité de routine, notamment dans le domaine hospitalier. Cependant, les coûts restent encore assez élevés, les personnels insuffisamment sensibilisés et formés, mais le plus préoccupant reste l'absence de validation de ces nouveaux outils de diagnostic biologique, leur permettant d'intégrer d'une part les recommandations de pratique clinique, d'autre part d'être pris en charge par les caisses d'assurance maladie. L'absence de validation résulte du fait que la grande majorité des études sur les biomarqueurs ne rentre pas dans les critères tels que ceux défini dans les

recommandations (recommandations STARD, STROBE-ME, CONSORT...) [497-499]. Il en résulte des études portant sur tel ou tel biomarqueur, dont les conclusions peuvent être parfois contradictoires. Les méta-analyses peinent à inclure une quantité suffisante d'essais publiés à cause de ce défaut de résultats validés selon les « gold-standard » en vigueur pour les études sur de nouveaux biomarqueurs ou d'épidémiologie moléculaire.

En attendant, le test Elecsys GDF-15 (Roche Diagnostics) a obtenu très récemment une autorisation CE en tant que Diagnostic In Vitro (DIV) et dont l'indication est l'aide à la stratification du risque chez les patients présentant un SCA ou une IC. La commercialisation de ce test diagnostic intervient 10 ans après la publication des travaux majeurs de l'équipe de Kempf et coll. sur le rôle cardioprotecteur du GDF-15 [336]. Son utilisation et sa pertinence en clinique doivent encore être prouvées avant de bénéficier d'une plus large utilisation au même titre que les cTnT et cTnI, le BNP ou encore le Nt-proBNP.

Enfin, concernant nos projets en cours et futurs, nous conduisons actuellement des travaux autour de la cardioprotection peropératoire, aussi bien de nature anesthésique (préconditionnement et postconditionnement au sévoflurane) que métabolique (préconditionnement au GIK). Ces protocoles incluent la mesure du GDF-15 entre autres à différents temps, dans l'objectif d'évaluer les réponses aux traitements cardioprotecteurs cités. Nous espérons que ces études participeront à une meilleure compréhension des mécanismes impliquant le GDF-15 aussi bien en tant que biomarqueur du risque chirurgical qu'en tant que facteur cardioprotecteur. A l'heure actuelle, aucun changement de pratique n'a été opéré suite à la publication de nos travaux mais des collaborations, aussi bien académiques qu'industrielles et pluridisciplinaires, seront nécessaires pour élaborer des études à plus grande échelle, seules garantes d'une potentielle ascension du GDF-15 en pratique clinique.

## E. CONCLUSIONS

Aujourd'hui, la stratification du risque chez les patients « médicaux » atteints de pathologies cardiaques est habituellement définie conjointement à l'évaluation des taux circulants de biomarqueurs à l'inverse des patients « chirurgicaux ». Le GDF-15, de la même manière que ces biomarqueurs, semble être aussi utile dans le diagnostic de certaines pathologies ou complications. L'interprétation des taux circulants de GDF-15 pourrait également participer au choix de la thérapie. Nous confirmons ici le rôle important du GDF-15 comme biomarqueur de lésions cardiaques et rénales chez des patients en situation de chirurgie cardiaque. Compte-tenu de la valeur potentielle du GDF-15 en tant que biomarqueur de pathologies cardiaques et de risque cardiovasculaire, et de la prévalence des complications majeures postopératoires, la mesure de ces taux chez ces patients contribuerait à améliorer le diagnostic et le suivi. Si cela est confirmé sur une plus large cohorte de patients, le GDF-15 préopératoire pourrait constituer un test sanguin d'intérêt dans l'amélioration de la stratification du risque et dans la discrimination parmi les candidats à la chirurgie. Il sera indispensable d'établir et de valider des intervalles de référence des taux circulants de GDF-15, dans le but d'identifier de manière objective la sévérité d'une atteinte et d'élaborer une grille de stratification du risque. A l'avenir, le GDF-15 pourrait se révéler être pertinent dans l'identification des patients au cours de l'élaboration de futures stratégies thérapeutiques.

## ***BIBLIOGRAPHIE***

1. Gibbon, J.H., Jr., *The development of the heart-lung apparatus*. Am J Surg, 1978. **135**(5): p. 608-19.
2. Stammers, A.H., *Historical aspects of cardiopulmonary bypass: from antiquity to acceptance*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 1997. **11**(3): p. 266-74.
3. Gibbon, J.H., Jr., *Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery*. Minn Med, 1954. **37**(3): p. 171-85; passim.
4. Dobson, G.P., *Membrane polarity: a target for myocardial protection and reduced inflammation in adult and pediatric cardiothoracic surgery*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010. **140**(6): p. 1213-7.
5. Edmunds, L.H., Jr., *Advances in the heart-lung machine after John and Mary Gibbon*. Ann Thorac Surg, 2003. **76**(6): p. S2220-3.
6. Wahba, A., *Centrifugal blood pump use in routine cardiac surgery*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2006. **5**(3): p. 299-300.
7. Janvier, G. and J.J. Lehot, *Circulation extracorporelle: principes et pratique*. 2004: Arnette.
8. Russell, J.A., R.J. Navickis, and M.M. Wilkes, *Albumin versus crystalloid for pump priming in cardiac surgery: meta-analysis of controlled trials*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2004. **18**(4): p. 429-37.
9. Lange, M., et al., *Intravascular volume therapy with colloids in cardiac surgery*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2011. **25**(5): p. 847-55.
10. Boldt, J., *Volume therapy in cardiac surgery: are Americans different from Europeans?* J Cardiothorac Vasc Anesth, 2006. **20**(1): p. 98-105.
11. Edmunds, L.H., Jr., *Why cardiopulmonary bypass makes patients sick: strategies to control the blood-synthetic surface interface*. Adv Card Surg, 1995. **6**: p. 131-67.
12. Dobson, G.P., et al., *Hyperkalemic cardioplegia for adult and pediatric surgery: end of an era?* Front Physiol, 2013. **4**: p. 228.
13. Kirklin, J.K., et al., *Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1983. **86**(6): p. 845-57.
14. Cleland, J., et al., *Blood volume and body fluid compartment changes soon after closed and open intracardiac surgery*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1966. **52**(5): p. 698-705.
15. Pacifico, A.D., S. Digerness, and J.W. Kirklin, *Acute alterations of body composition after open intracardiac operations*. Circulation, 1970. **41**(2): p. 331-41.
16. Smith, E.E., et al., *Microvascular permeability after cardiopulmonary bypass. An experimental study*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1987. **94**(2): p. 225-33.
17. Edmunds, L.H., Jr., *Inflammatory response to cardiopulmonary bypass*. Ann Thorac Surg, 1998. **66**(5 Suppl): p. S12-6; discussion S25-8.
18. Wachtfogel, Y.T., et al., *Thrombin and human plasma kallikrein inhibition during simulated extracorporeal circulation block platelet and neutrophil activation*. Thromb Haemost, 1998. **80**(4): p. 686-91.
19. te Velthuis, H., et al., *Heparin coating of extracorporeal circuits inhibits contact activation during cardiac operations*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1997. **114**(1): p. 117-22.
20. Saatvedt, K., et al., *Activation of the fibrinolytic, coagulation and plasma kallikrein-kinin systems during and after open heart surgery in children*. Scand J Clin Lab Invest, 1995. **55**(4): p. 359-67.
21. Valen, G., et al., *Release of von Willebrand factor by cardiopulmonary bypass, but not by cardioplegia in open heart surgery*. Thromb Res, 1994. **73**(1): p. 21-9.
22. Edmunds, L.H., Jr. and R.W. Colman, *Thrombin during cardiopulmonary bypass*. Ann Thorac Surg, 2006. **82**(6): p. 2315-22.
23. Khan, M.M., et al., *Truncated and microparticle-free soluble tissue factor bound to peripheral monocytes preferentially activate factor VII*. Thromb Haemost, 2006. **95**(3): p. 462-8.
24. Diamant, M., et al., *Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus*. Circulation, 2002. **106**(19): p. 2442-7.



25. Giesen, P.L., et al., *Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2311-5.
26. Engelmann, B., *Initiation of coagulation by tissue factor carriers in blood*. Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(2): p. 188-90.
27. Rauch, U. and Y. Nemerson, *Circulating tissue factor and thrombosis*. Curr Opin Hematol, 2000. **7**(5): p. 273-7.
28. Nieuwland, R., et al., *Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant*. Circulation, 1997. **96**(10): p. 3534-41.
29. Nijziel, M., et al., *Tissue factor activity in human monocytes is regulated by plasma: implications for the high and low responder phenomenon*. Br J Haematol, 2001. **112**(1): p. 98-104.
30. Maugeri, N., et al., *Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(6): p. 1323-30.
31. Hattori, T., et al., *Plasma tissue factor plus activated peripheral mononuclear cells activate factors VII and X in cardiac surgical wounds*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(4): p. 707-13.
32. Hunt, B.J., et al., *Activation of coagulation and fibrinolysis during cardiothoracic operations*. Ann Thorac Surg, 1998. **65**(3): p. 712-8.
33. Pixley, R.A., M. Schapira, and R.W. Colman, *Effect of heparin on the inactivation rate of human activated factor XII by antithrombin III*. Blood, 1985. **66**(1): p. 198-203.
34. Arnoletti, J.P. and G.J. Whitman, *Heparin-induced thrombocytopenia in coronary bypass surgery*. Ann Thorac Surg, 1999. **68**(2): p. 576-8.
35. Edes, T.E. and E.V. Sunderrajan, *Heparin-induced hyperkalemia*. Arch Intern Med, 1985. **145**(6): p. 1070-2.
36. Philippou, H., et al., *Two-chain factor VIIa generated in the pericardium during surgery with cardiopulmonary bypass : relationship to increased thrombin generation and heparin concentration*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(2): p. 248-54.
37. Warkentin, T.E., *Anticoagulation for cardiopulmonary bypass: is a replacement for heparin on the horizon?* J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **131**(3): p. 515-6.
38. Warkentin, T.E., A. Greinacher, and A. Koster, *Bivalirudin*. Thromb Haemost, 2008. **99**(5): p. 830-9.
39. Roberts, H.R., D.M. Monroe, and M.A. Escobar, *Current concepts of hemostasis: implications for therapy*. Anesthesiology, 2004. **100**(3): p. 722-30.
40. Walport, M.J., *Complement. Second of two parts*. N Engl J Med, 2001. **344**(15): p. 1140-4.
41. Walport, M.J., *Complement. First of two parts*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1058-66.
42. Day, J.R. and K.M. Taylor, *The systemic inflammatory response syndrome and cardiopulmonary bypass*. Int J Surg, 2005. **3**(2): p. 129-40.
43. Wan, S., J.L. LeClerc, and J.L. Vincent, *Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies*. Chest, 1997. **112**(3): p. 676-92.
44. Carr, J.A. and N. Silverman, *The heparin-protamine interaction. A review*. J Cardiovasc Surg (Torino), 1999. **40**(5): p. 659-66.
45. Downing, S.W. and L.H. Edmunds, Jr., *Release of vasoactive substances during cardiopulmonary bypass*. Ann Thorac Surg, 1992. **54**(6): p. 1236-43.
46. Walker, J.B. and M.E. Nesheim, *The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin*. J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 5201-12.
47. Khalil, P.N., et al., *Activation of fibrinolysis in the pericardial cavity after cardiopulmonary bypass*. Thromb Haemost, 2004. **92**(3): p. 568-74.
48. Tabuchi, N., et al., *Activation of fibrinolysis in the pericardial cavity during cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1993. **106**(5): p. 828-33.
49. Stibbe, J., et al., *Enhanced fibrinolytic activity during cardiopulmonary bypass in open-heart surgery in man is caused by extrinsic (tissue-type) plasminogen activator*. Eur J Clin Invest, 1984. **14**(5): p. 375-82.

50. Levin, E.G. and L. Santell, *Stimulation and desensitization of tissue plasminogen activator release from human endothelial cells*. J Biol Chem, 1988. **263**(19): p. 9360-5.
51. Gram, J., et al., *Enhanced effective fibrinolysis following the neutralization of heparin in open heart surgery increases the risk of post-surgical bleeding*. Thromb Haemost, 1990. **63**(2): p. 241-5.
52. Boyle, E.M., Jr., et al., *Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response*. Ann Thorac Surg, 1997. **63**(1): p. 277-84.
53. Ranucci, M., *The endothelial function in cardiac surgery*. Minerva Anesthesiol, 2006. **72**(6): p. 503-6.
54. Cardigan, R.A., I.J. Mackie, and S.J. Machin, *Hemostatic-endothelial interactions: a potential anticoagulant role of the endothelium in the pulmonary circulation during cardiac surgery*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 1997. **11**(3): p. 329-36.
55. Asimakopoulos, G., *Mechanisms of the systemic inflammatory response*. Perfusion, 1999. **14**(4): p. 269-77.
56. Collard, C.D. and S. Gelman, *Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury*. Anesthesiology, 2001. **94**(6): p. 1133-8.
57. Ratliff, N.B., et al., *Pulmonary injury secondary to extracorporeal circulation. An ultrastructural study*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1973. **65**(3): p. 425-32.
58. Ng, C.S., et al., *Inflammatory response to pulmonary ischemia-reperfusion injury*. Surg Today, 2006. **36**(3): p. 205-14.
59. Clark, S.C., *Lung injury after cardiopulmonary bypass*. Perfusion, 2006. **21**(4): p. 225-8.
60. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 481-97.
61. Wakayama, F., et al., *Neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, attenuates acute lung injury after cardiopulmonary bypass in the rabbit endotoxemia model*. Ann Thorac Surg, 2007. **83**(1): p. 153-60.
62. Ando, M., T. Murai, and Y. Takahashi, *The effect of sivelestat sodium on post-cardiopulmonary bypass acute lung injury in a neonatal piglet model*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2008. **7**(5): p. 785-8.
63. Chung, J.H., et al., *Pericardial blood activates the extrinsic coagulation pathway during clinical cardiopulmonary bypass*. Circulation, 1996. **93**(11): p. 2014-8.
64. Weerasinghe, A., et al., *Platelet-monocyte pro-coagulant interactions in on-pump coronary surgery*. Eur J Cardiothorac Surg, 2006. **29**(3): p. 312-8.
65. DePalma, L., et al., *Changes in lymphocyte subpopulations as a result of cardiopulmonary bypass. The effect of blood transfusion*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1991. **101**(2): p. 240-4.
66. Roth, J.A., et al., *Cell-mediated immunity is depressed following cardiopulmonary bypass*. Ann Thorac Surg, 1981. **31**(4): p. 350-6.
67. Holloway, D.S., et al., *Decreased platelet number and function and increased fibrinolysis contribute to postoperative bleeding in cardiopulmonary bypass patients*. Thromb Haemost, 1988. **59**(1): p. 62-7.
68. Paparella, D., T.M. Yau, and E. Young, *Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update*. Eur J Cardiothorac Surg, 2002. **21**(2): p. 232-44.
69. Gikakis, N., et al., *Effect of factor Xa inhibitors on thrombin formation and complement and neutrophil activation during in vitro extracorporeal circulation*. Circulation, 1996. **94**(9 Suppl): p. II341-6.
70. Sims, P.J., et al., *Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity*. J Biol Chem, 1988. **263**(34): p. 18205-12.
71. Larsen, E., et al., *PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes*. Cell, 1989. **59**(2): p. 305-12.
72. Celi, A., et al., *P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 8767-71.

73. Weerasinghe, A. and K.M. Taylor, *The platelet in cardiopulmonary bypass*. Ann Thorac Surg, 1998. **66**(6): p. 2145-52.
74. Edmunds, L.H., Jr., et al., *Platelet function during cardiac operation: comparison of membrane and bubble oxygenators*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1982. **83**(6): p. 805-12.
75. Despotis, G.J. and L.T. Goodnough, *Management approaches to platelet-related microvascular bleeding in cardiothoracic surgery*. Ann Thorac Surg, 2000. **70**(2 Suppl): p. S20-32.
76. Frangogiannis, N.G., *The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling*. Nat Rev Cardiol, 2014. **11**(5): p. 255-65.
77. Rossi, M., et al., *Cardiopulmonary bypass in man: role of the intestine in a self-limiting inflammatory response with demonstrable bacterial translocation*. Ann Thorac Surg, 2004. **77**(2): p. 612-8.
78. Clermont, G., et al., *Systemic free radical activation is a major event involved in myocardial oxidative stress related to cardiopulmonary bypass*. Anesthesiology, 2002. **96**(1): p. 80-7.
79. Krishnadasan, B.G.-E., J.; Aldea, G.S.; Verrier, E.D. , *Reperfusion injury during cardiopulmonary bypass, in Leukocyte Depletion in Cardiac*. 2002. p. 54-77.
80. De Hert, S. and A. Moerman, *Myocardial injury and protection related to cardiopulmonary bypass*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2015. **29**(2): p. 137-49.
81. Opal, S.M., *The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis*. Int J Med Microbiol, 2007. **297**(5): p. 365-77.
82. Aydin, N.B., et al., *Endotoxemia in coronary artery bypass surgery: a comparison of the off-pump technique and conventional cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **125**(4): p. 843-8.
83. Ohri, S.K., et al., *Cardiopulmonary bypass impairs small intestinal transport and increases gut permeability*. Ann Thorac Surg, 1993. **55**(5): p. 1080-6.
84. Andersen, L.W., et al., *Association between gastric intramucosal pH and splanchnic endotoxin, antibody to endotoxin, and tumor necrosis factor-alpha concentrations in patients undergoing cardiopulmonary bypass*. Crit Care Med, 1993. **21**(2): p. 210-7.
85. Riddington, D.W., et al., *Intestinal permeability, gastric intramucosal pH, and systemic endotoxemia in patients undergoing cardiopulmonary bypass*. JAMA, 1996. **275**(13): p. 1007-12.
86. Oudemans-van Straaten, H.M., et al., *Intestinal permeability, circulating endotoxin, and postoperative systemic responses in cardiac surgery patients*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 1996. **10**(2): p. 187-94.
87. Replogle, R.L., A.B. Gazzaniga, and R.E. Gross, *Use of corticosteroids during cardiopulmonary bypass: possible lysosome stabilization*. Circulation, 1966. **33**(4 Suppl): p. 186-92.
88. Sambhi, M.P., M.H. Weil, and V.N. Udhoji, *Acute Pharmacodynamic Effects of Glucocorticoids; Cardiac Output and Related Hemodynamic Changes in Normal Subjects and Patients in Shock*. Circulation, 1965. **31**: p. 523-30.
89. Christman, J.W., E.P. Holden, and T.S. Blackwell, *Strategies for blocking the systemic effects of cytokines in the sepsis syndrome*. Crit Care Med, 1995. **23**(5): p. 955-63.
90. von Spiegel, T., et al., *Effects of dexamethasone on intravascular and extravascular fluid balance in patients undergoing coronary bypass surgery with cardiopulmonary bypass*. Anesthesiology, 2002. **96**(4): p. 827-34.
91. Cronstein, B.N., et al., *A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 9991-5.
92. Tennenberg, S.D., et al., *The effects of methylprednisolone on complement-mediated neutrophil activation during cardiopulmonary bypass*. Surgery, 1986. **100**(2): p. 134-42.
93. Teoh, K.H., et al., *Steroid inhibition of cytokine-mediated vasodilation after warm heart surgery*. Circulation, 1995. **92**(9 Suppl): p. 11347-53.

94. Kawamura, T., et al., *Influence of methylprednisolone on cytokine balance during cardiac surgery*. Crit Care Med, 1999. **27**(3): p. 545-8.
95. Jansen, N.J., et al., *Inhibition by dexamethasone of the reperfusion phenomena in cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1991. **102**(4): p. 515-25.
96. El Azab, S.R., et al., *Dexamethasone decreases the pro- to anti-inflammatory cytokine ratio during cardiac surgery*. Br J Anaesth, 2002. **88**(4): p. 496-501.
97. Toft, P., et al., *Effect of methylprednisolone on the oxidative burst activity, adhesion molecules and clinical outcome following open heart surgery*. Scand Cardiovasc J, 1997. **31**(5): p. 283-8.
98. Kawamura, T., et al., *Methylprednisolone inhibits increase of interleukin 8 and 6 during open heart surgery*. Can J Anaesth, 1995. **42**(5 Pt 1): p. 399-403.
99. Fillinger, M.P., et al., *Glucocorticoid effects on the inflammatory and clinical responses to cardiac surgery*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2002. **16**(2): p. 163-9.
100. Halonen, J., et al., *Corticosteroids for the prevention of atrial fibrillation after cardiac surgery: a randomized controlled trial*. JAMA, 2007. **297**(14): p. 1562-7.
101. Augoustides, J.G., *Use of corticosteroids to prevent atrial fibrillation after cardiac surgery*. JAMA, 2007. **298**(3): p. 283; author reply 283-4.
102. Chaney, M.A., *Corticosteroids and cardiopulmonary bypass : a review of clinical investigations*. Chest, 2002. **121**(3): p. 921-31.
103. Morariu, A.M., et al., *Dexamethasone: benefit and prejudice for patients undergoing on-pump coronary artery bypass grafting: a study on myocardial, pulmonary, renal, intestinal, and hepatic injury*. Chest, 2005. **128**(4): p. 2677-87.
104. Robertson-Malt, S., B. Afrane, and M. El Barbary, *Prophylactic steroids for pediatric open heart surgery*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(4): p. CD005550.
105. Eagle, K.A., et al., *ACC/AHA 2004 guideline update for coronary artery bypass graft surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Update the 1999 Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery)*. Circulation, 2004. **110**(14): p. e340-437.
106. Castiglioni, G.C., L. Lojacono, and G. Tamborini, *[Effects of trypsin and kallikrein inhibition in acute pancreatitis]*. Arch Ital Chir, 1965. **91**(4): p. 365-76.
107. Bidstrup, B.P., et al., *Effect of aprotinin on need for blood transfusion in patients with septic endocarditis having open-heart surgery*. Lancet, 1988. **1**(8581): p. 366-7.
108. Royston, D., et al., *Effect of aprotinin on need for blood transfusion after repeat open-heart surgery*. Lancet, 1987. **2**(8571): p. 1289-91.
109. Poullis, M., et al., *The antithrombotic effect of aprotinin: actions mediated via the proteaseactivated receptor 1*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000. **120**(2): p. 370-8.
110. Greilich, P.E., et al., *Antifibrinolytic therapy during cardiopulmonary bypass reduces proinflammatory cytokine levels: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of epsilon-aminocaproic acid and aprotinin*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **126**(5): p. 1498-503.
111. Hill, G.E., et al., *Aprotinin reduces interleukin-8 production and lung neutrophil accumulation after cardiopulmonary bypass*. Anesth Analg, 1996. **83**(4): p. 696-700.
112. Ege, T., et al., *The importance of aprotinin and pentoxifylline in preventing leukocyte sequestration and lung injury caused by protamine at the end of cardiopulmonary bypass surgery*. Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **52**(1): p. 10-5.
113. Wendel, H.P., et al., *Lower cardiac troponin T levels in patients undergoing cardiopulmonary bypass and receiving high-dose aprotinin therapy indicate reduction of perioperative myocardial damage*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1995. **109**(6): p. 1164-72.
114. Levi, M., et al., *Pharmacological strategies to decrease excessive blood loss in cardiac surgery: a meta-analysis of clinically relevant endpoints*. Lancet, 1999. **354**(9194): p. 1940-7.
115. Mangano, D.T., R.D. Rieves, and K.D. Weiss, *Judging the safety of aprotinin*. N Engl J Med, 2006. **355**(21): p. 2261-2.

116. Sedrakyan, A., T. Treasure, and J.A. Elefteriades, *Effect of aprotinin on clinical outcomes in coronary artery bypass graft surgery: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **128**(3): p. 442-8.
117. Sedrakyan, A., D. Atkins, and T. Treasure, *The risk of aprotinin: a conflict of evidence*. Lancet, 2006. **367**(9520): p. 1376-7.
118. Fergusson, D.A., et al., *A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery*. N Engl J Med, 2008. **358**(22): p. 2319-31.
119. McMullan, V. and R.P. Alston, III. *Aprotinin and cardiac surgery: a sorry tale of evidence misused*. Br J Anaesth, 2013. **110**(5): p. 675-8.
120. Verstraete, M., et al., *Double-blind trials with ethamsylate, batroxobin or tranexamic acid on blood loss after adenotonsillectomy*. Acta Clin Belg, 1977. **32**(2): p. 136-41.
121. Karkouti, K., et al., *The risk-benefit profile of aprotinin versus tranexamic acid in cardiac surgery*. Anesth Analg, 2010. **110**(1): p. 21-9.
122. Martin, K., et al., *The risks of aprotinin and tranexamic acid in cardiac surgery: a one-year follow-up of 1188 consecutive patients*. Anesth Analg, 2008. **107**(6): p. 1783-90.
123. Martin, K., et al., *Seizures after open heart surgery: comparison of epsilon-aminocaproic acid and tranexamic acid*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2011. **25**(1): p. 20-5.
124. Murkin, J.M., et al., *High-dose tranexamic Acid is associated with nonischemic clinical seizures in cardiac surgical patients*. Anesth Analg, 2010. **110**(2): p. 350-3.
125. Sander, M., et al., *Mortality associated with administration of high-dose tranexamic acid and aprotinin in primary open-heart procedures: a retrospective analysis*. Crit Care, 2010. **14**(4): p. R148.
126. Ray, W.A. and C.M. Stein, *The aprotinin story--is BART the final chapter?* N Engl J Med, 2008. **358**(22): p. 2398-400.
127. Ray, W.A., *Learning from aprotinin--mandatory trials of comparative efficacy and safety needed*. N Engl J Med, 2008. **358**(8): p. 840-2.
128. Pintar, T. and C.D. Collard, *The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass*. Anesthesiol Clin North America, 2003. **21**(3): p. 453-64.
129. Sun, S.C., et al., *Improved recovery of heart transplants by combined use of oxygen-derived free radical scavengers and energy enhancement*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1992. **104**(3): p. 830-7.
130. Julia, P.L., et al., *Studies of controlled reperfusion after ischemia. XXI. Reperfusate composition: superiority of blood cardioplegia over crystalloid cardioplegia in limiting reperfusion damage--importance of endogenous oxygen free radical scavengers in red blood cells*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1991. **101**(2): p. 303-13.
131. Yau, T.M., et al., *Vitamin E for coronary bypass operations. A prospective, double-blind, randomized trial*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1994. **108**(2): p. 302-10.
132. Sisto, T., et al., *Pretreatment with antioxidants and allopurinol diminishes cardiac onset events in coronary artery bypass grafting*. Ann Thorac Surg, 1995. **59**(6): p. 1519-23.
133. Shernan, S.K., et al., *Impact of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, on total mortality and adverse cardiovascular outcomes in cardiac surgical patients undergoing cardiopulmonary bypass*. Ann Thorac Surg, 2004. **77**(3): p. 942-9; discussion 949-50.
134. Smith, P.K., et al., *Effect of pexelizumab in coronary artery bypass graft surgery with extended aortic cross-clamp time*. Ann Thorac Surg, 2006. **82**(3): p. 781-8; discussion 788-9.
135. Carrier, M., et al., *Inhibition of complement activation by pexelizumab reduces death in patients undergoing combined aortic valve replacement and coronary artery bypass surgery*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **131**(2): p. 352-6.
136. Verrier, E.D., et al., *Terminal complement blockade with pexelizumab during coronary artery bypass graft surgery requiring cardiopulmonary bypass: a randomized trial*. JAMA, 2004. **291**(19): p. 2319-27.

137. Mollhoff, T., et al., *Milrinone modulates endotoxemia, systemic inflammation, and subsequent acute phase response after cardiopulmonary bypass (CPB)*. *Anesthesiology*, 1999. **90**(1): p. 72-80.
138. Hayashida, N., et al., *Inhibitory effect of milrinone on cytokine production after cardiopulmonary bypass*. *Ann Thorac Surg*, 1999. **68**(5): p. 1661-7.
139. Massoudy, P., et al., *Sodium nitroprusside during coronary artery bypass grafting: evidence for an antiinflammatory action*. *Ann Thorac Surg*, 1999. **67**(4): p. 1059-64.
140. Murphy, G.S., et al., *The effects of morphine and fentanyl on the inflammatory response to cardiopulmonary bypass in patients undergoing elective coronary artery bypass graft surgery*. *Anesth Analg*, 2007. **104**(6): p. 1334-42, table of contents.
141. Stammberger, U., et al., *sCR1sLe(X) reduces lung allograft ischemia-reperfusion injury but does not ameliorate acute rejection*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002. **22**(3): p. 368-72.
142. Gott, V.L., J.D. Whiffen, and R.C. Dutton, *Heparin Bonding on Colloidal Graphite Surfaces*. *Science*, 1963. **142**(3597): p. 1297-8.
143. Gott, V.L. and R.L. Daggett, *Serendipity and the development of heparin and carbon surfaces*. *Ann Thorac Surg*, 1999. **68**(3 Suppl): p. S19-22.
144. Mollnes, T.E., et al., *Formation of C5a during cardiopulmonary bypass: inhibition by precoating with heparin*. *Ann Thorac Surg*, 1991. **52**(1): p. 92-7.
145. Ovrum, E., et al., *Complete heparin-coated cardiopulmonary bypass and low heparin dose reduce complement and granulocyte activation*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1996. **10**(1): p. 54-60.
146. Steinberg, B.M., et al., *Heparin bonding of bypass circuits reduces cytokine release during cardiopulmonary bypass*. *Ann Thorac Surg*, 1995. **60**(3): p. 525-9.
147. Xiao, Z. and P. Theroux, *Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor*. *Circulation*, 1998. **97**(3): p. 251-6.
148. Mahoney, C.B. and G.M. Lemole, *Transfusion after coronary artery bypass surgery: the impact of heparin-bonded circuits*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1999. **16**(2): p. 206-10.
149. Ranucci, M., et al., *Beneficial effects of Duraflo II heparin-coated circuits on postperfusion lung dysfunction*. *Ann Thorac Surg*, 1996. **61**(1): p. 76-81.
150. Mongero, L.B., et al., *Cardiac surgical patients exposed to heparin-bonded circuits develop less postoperative cerebral dysfunction than patients exposed to non-heparin-bonded circuits*. *Perfusion*, 2001. **16**(2): p. 107-11.
151. Belboul, A., et al., *Heparin-coated circuits reduce occult myocardial damage during CPB: a randomized, single blind clinical trial*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2000. **17**(5): p. 580-6.
152. Ranucci, M., et al., *Heparin-coated circuits for high-risk patients: a multicenter, prospective, randomized trial*. *Ann Thorac Surg*, 1999. **67**(4): p. 994-1000.
153. Fosse, E., et al., *Duraflo II coating of cardiopulmonary bypass circuits reduces complement activation, but does not affect the release of granulocyte enzymes : a European multicentre study*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1997. **11**(2): p. 320-7.
154. Boonstra, P.W., et al., *Heparin coating of an extracorporeal circuit partly improves hemostasis after cardiopulmonary bypass*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1994. **107**(1): p. 289-92.
155. Mangoush, O., et al., *Heparin-bonded circuits versus nonheparin-bonded circuits: an evaluation of their effect on clinical outcomes*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2007. **31**(6): p. 1058-69.
156. Angelini, G.D., et al., *Early and midterm outcome after off-pump and on-pump surgery in Beating Heart Against Cardioplegic Arrest Studies (BHACAS 1 and 2): a pooled analysis of two randomised controlled trials*. *Lancet*, 2002. **359**(9313): p. 1194-9.
157. Nathoe, H.M., et al., *A comparison of on-pump and off-pump coronary bypass surgery in low-risk patients*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(5): p. 394-402.
158. Straka, Z., et al., *Off-pump versus on-pump coronary surgery: final results from a prospective randomized study PRAGUE-4*. *Ann Thorac Surg*, 2004. **77**(3): p. 789-93.

159. Cheng, D.C., et al., *Does off-pump coronary artery bypass reduce mortality, morbidity, and resource utilization when compared with conventional coronary artery bypass? A meta-analysis of randomized trials.* Anesthesiology, 2005. **102**(1): p. 188-203.
160. Lee, J.D., et al., *Benefits of off-pump bypass on neurologic and clinical morbidity: a prospective randomized trial.* Ann Thorac Surg, 2003. **76**(1): p. 18-25; discussion 25-6.
161. Parolari, A., et al., *Off-pump versus on-pump coronary artery bypass: meta-analysis of currently available randomized trials.* Ann Thorac Surg, 2003. **76**(1): p. 37-40.
162. Raja, S.G. and G.D. Dreyfus, *Impact of off-pump coronary artery bypass surgery on graft patency: current best available evidence.* J Card Surg, 2007. **22**(2): p. 165-9.
163. Matata, B.M., A.W. Sosnowski, and M. Galinanes, *Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation.* Ann Thorac Surg, 2000. **69**(3): p. 785-91.
164. Diegeler, A., et al., *Humoral immune response during coronary artery bypass grafting: A comparison of limited approach, "off-pump" technique, and conventional cardiopulmonary bypass.* Circulation, 2000. **102**(19 Suppl 3): p. III95-100.
165. Wan, I.Y., et al., *Beating heart revascularization with or without cardiopulmonary bypass: evaluation of inflammatory response in a prospective randomized study.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **127**(6): p. 1624-31.
166. Wehlin, L., et al., *Activation of complement and leukocyte receptors during on- and off pump coronary artery bypass surgery.* Eur J Cardiothorac Surg, 2004. **25**(1): p. 35-42.
167. Al-Ruzzeh, S., et al., *Off-Pump Coronary Artery Bypass (OPCAB) surgery reduces risk-stratified morbidity and mortality: a United Kingdom Multi-Center Comparative Analysis of Early Clinical Outcome.* Circulation, 2003. **108 Suppl 1**: p. II1-8.
168. Dorman, B.H., et al., *A prospective, randomized study of endothelin and postoperative recovery in off-pump versus conventional coronary artery bypass surgery.* J Cardiothorac Vasc Anesth, 2004. **18**(1): p. 25-9.
169. Nalysnyk, L., et al., *Adverse events in coronary artery bypass graft (CABG) trials: a systematic review and analysis.* Heart, 2003. **89**(7): p. 767-72.
170. Weisel, R.D., *Myocardial stunning after coronary bypass surgery.* J Card Surg, 1993. **8**(2 Suppl): p. 242-4.
171. Mangano, D.T., *Cardiovascular morbidity and CABG surgery--a perspective: epidemiology, costs, and potential therapeutic solutions.* J Card Surg, 1995. **10**(4 Suppl): p. 366-8.
172. Spinale, F.G., *Cellular and molecular therapeutic targets for treatment of contractile dysfunction after cardioplegic arrest.* Ann Thorac Surg, 1999. **68**(5): p. 1934-41.
173. Aranki, S.F., et al., *Predictors of atrial fibrillation after coronary artery surgery. Current trends and impact on hospital resources.* Circulation, 1996. **94**(3): p. 390-7.
174. Forman, M.B., D.W. Puett, and R. Virmani, *Endothelial and myocardial injury during ischemia and reperfusion: pathogenesis and therapeutic implications.* J Am Coll Cardiol, 1989. **13**(2): p. 450-9.
175. Zaugg, M., et al., *Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms.* Br J Anaesth, 2003. **91**(4): p. 551-65.
176. Honda, H.M., P. Korge, and J.N. Weiss, *Mitochondria and ischemia/reperfusion injury.* Ann N Y Acad Sci, 2005. **1047**: p. 248-58.
177. Laffey, J.G., J.F. Boylan, and D.C. Cheng, *The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist.* Anesthesiology, 2002. **97**(1): p. 215-52.
178. Warren, O.J., et al., *The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1--mechanisms of pathogenesis.* J Cardiothorac Vasc Anesth, 2009. **23**(2): p. 223-31.
179. Warren, O.J., et al., *The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 2--anti-inflammatory therapeutic strategies.* J Cardiothorac Vasc Anesth, 2009. **23**(3): p. 384-93.
180. Ng, C.S. and S. Wan, *Limiting inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pharmaceutical strategies.* Curr Opin Pharmacol, 2012. **12**(2): p. 155-9.

181. Sonnenblick, E.H., J. Ross, Jr., and E. Braunwald, *Oxygen consumption of the heart. Newer concepts of its multifactorial determination*. Am J Cardiol, 1968. **22**(3): p. 328-36.
182. Buckberg, G.D., et al., *Studies of the effects of hypothermia on regional myocardial blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. I. The adequately perfused beating, fibrillating, and arrested heart*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1977. **73**(1): p. 87-94.
183. Cordell, A.R., *Milestones in the development of cardioplegia*. Ann Thorac Surg, 1995. **60**(3): p. 793-6.
184. Cleveland, J.C., Jr., et al., *Optimal myocardial preservation: cooling, cardioplegia, and conditioning*. Ann Thorac Surg, 1996. **61**(2): p. 760-8.
185. Guru, V., et al., *Is blood superior to crystalloid cardioplegia? A meta-analysis of randomized clinical trials*. Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I331-8.
186. Jacob, S., et al., *Is blood cardioplegia superior to crystalloid cardioplegia?* Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2008. **7**(3): p. 491-8.
187. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
188. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H579-88.
189. Birnbaum, Y., S.L. Hale, and R.A. Kloner, *Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit*. Circulation, 1997. **96**(5): p. 1641-6.
190. Andreka, G., et al., *Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs*. Heart, 2007. **93**(6): p. 749-52.
191. Yellon, D.M., A.M. Alkhulaifi, and W.B. Pugsley, *Preconditioning the human myocardium*. Lancet, 1993. **342**(8866): p. 276-7.
192. Jenkins, D.P., et al., *Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery*. Heart, 1997. **77**(4): p. 314-8.
193. Wu, Z.K., et al., *Ischemic preconditioning suppresses ventricular tachyarrhythmias after myocardial revascularization*. Circulation, 2002. **106**(24): p. 3091-6.
194. Durdu, S., et al., *The efficacies of modified mechanical post conditioning on myocardial protection for patients undergoing coronary artery bypass grafting*. J Cardiothorac Surg, 2012. **7**: p. 73.
195. Pouzet, B., et al., *Is there a place for preconditioning during cardiac operations in humans?* Ann Thorac Surg, 2002. **73**(3): p. 843-8.
196. Hausenloy, D.J., et al., *Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial*. Lancet, 2007. **370**(9587): p. 575-9.
197. Venugopal, V., et al., *Remote ischaemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery with cold-blood cardioplegia: a randomised controlled trial*. Heart, 2009. **95**(19): p. 1567-71.
198. Rahman, I.A., et al., *Remote ischemic preconditioning in human coronary artery bypass surgery: from promise to disappointment?* Circulation, 2010. **122**(11 Suppl): p. S53-9.
199. Brevoord, D., et al., *Effect of remote ischemic conditioning on atrial fibrillation and outcome after coronary artery bypass grafting (RICO-trial)*. BMC Anesthesiol, 2011. **11**: p. 11.
200. Kaneko, T., et al., *Dose-dependent prophylactic effect of nicorandil, an ATP-sensitive potassium channel opener, on intra-operative myocardial ischaemia in patients undergoing major abdominal surgery*. Br J Anaesth, 2001. **86**(3): p. 332-7.
201. Chinnan, N.K., G.D. Puri, and S.K. Thingnam, *Myocardial protection by nicorandil during open-heart surgery under cardiopulmonary bypass*. Eur J Anaesthesiol, 2007. **24**(1): p. 26-32.
202. Zaugg, M., et al., *Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part II. Clinical implications*. Br J Anaesth, 2003. **91**(4): p. 566-76.



203. Bienengraeber, M.W., et al., *Cardioprotection by volatile anesthetics*. *Vascul Pharmacol*, 2005. **42**(5-6): p. 243-52.
204. De Hert, S.G., et al., *Cardioprotection with volatile anesthetics: mechanisms and clinical implications*. *Anesth Analg*, 2005. **100**(6): p. 1584-93.
205. Pagel, P.S., *Postconditioning by volatile anesthetics: salvaging ischemic myocardium at reperfusion by activation of prosurvival signaling*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2008. **22**(5): p. 753-65.
206. Frassdorf, J., S. De Hert, and W. Schlack, *Anaesthesia and myocardial ischaemia/reperfusion injury*. *Br J Anaesth*, 2009. **103**(1): p. 89-98.
207. Nader, N.D., et al., *Anesthetic myocardial protection with sevoflurane*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2004. **18**(3): p. 269-74.
208. Nader, N.D., et al., *Inclusion of sevoflurane in cardioplegia reduces neutrophil activity during cardiopulmonary bypass*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2006. **20**(1): p. 57-62.
209. Kortekaas, K.A., et al., *Cardiospecific sevoflurane treatment quenches inflammation but does not attenuate myocardial cell damage markers: a proof-of-concept study in patients undergoing mitral valve repair*. *Br J Anaesth*, 2014. **112**(6): p. 1005-14.
210. Zuo, Y., et al., *Effect of aortic root infusion of sufentanil on ischemia-reperfusion injury in patients undergoing mitral valve replacement*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2014. **28**(6): p. 1474-8.
211. Xia, Z., Z. Huang, and D.M. Ansley, *Large-dose propofol during cardiopulmonary bypass decreases biochemical markers of myocardial injury in coronary surgery patients: a comparison with isoflurane*. *Anesth Analg*, 2006. **103**(3): p. 527-32.
212. Plummer, Z.E., et al., *The effects of propofol cardioplegia on blood and myocardial biomarkers of stress and injury in patients with isolated coronary artery bypass grafting or aortic valve replacement using cardiopulmonary bypass: protocol for a single-center randomized controlled trial*. *JMIR Res Protoc*, 2014. **3**(3): p. e35.
213. De Hert, S.G., et al., *Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration*. *Anesthesiology*, 2004. **101**(2): p. 299-310.
214. Huang, Z., et al., *Synergy of isoflurane preconditioning and propofol postconditioning reduces myocardial reperfusion injury in patients*. *Clin Sci (Lond)*, 2011. **121**(2): p. 57-69.
215. De Hert, S.G., et al., *Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients*. *Anesthesiology*, 2002. **97**(1): p. 42-9.
216. Julier, K., 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**(6): p. 1315-27.
217. Garcia, C., et al., *Preconditioning with sevoflurane decreases PECAM-1 expression and improves one-year cardiovascular outcome in coronary artery bypass graft surgery*. *Br J Anaesth*, 2005. **94**(2): p. 159-65.
218. De Hert, S., et al., *A comparison of volatile and non volatile agents for cardioprotection during on-pump coronary surgery*. *Anaesthesia*, 2009. **64**(9): p. 953-60.
219. De Hert, S.G., *Is anaesthetic cardioprotection clinically relevant? Another futile search for a magic bullet?* *Eur J Anaesthesiol*, 2011. **28**(9): p. 616-7.
220. Bein, B., *Clinical application of the cardioprotective effects of volatile anaesthetics: PRO--get an extra benefit from a proven anaesthetic free of charge*. *Eur J Anaesthesiol*, 2011. **28**(9): p. 620-2.
221. Van Rompaey, N. and L. Barvais, *Clinical application of the cardioprotective effects of volatile anaesthetics: CON--total intravenous anaesthesia or not total intravenous anaesthesia to anaesthetise a cardiac patient?* *Eur J Anaesthesiol*, 2011. **28**(9): p. 623-7.
222. Sodi-Pallares, D., et al., *Effects of an intravenous infusion of a potassium-glucose-insulin solution on the electrocardiographic signs of myocardial infarction. A preliminary clinical report*. *Am J Cardiol*, 1962. **9**: p. 166-81.

223. Howell, N.J., et al., *Glucose-insulin-potassium reduces the incidence of low cardiac output episodes after aortic valve replacement for aortic stenosis in patients with left ventricular hypertrophy: results from the Hypertrophy, Insulin, Glucose, and Electrolytes (HINGE) trial*. *Circulation*, 2011. **123**(2): p. 170-7.
224. Girard, C., et al., *Glucose and insulin supply before cardiopulmonary bypass in cardiac surgery: a double-blind study*. *Ann Thorac Surg*, 1992. **54**(2): p. 259-63.
225. Bothe, W., et al., *Glucose-insulin-potassium in cardiac surgery: a meta-analysis*. *Ann Thorac Surg*, 2004. **78**(5): p. 1650-7.
226. Fan, Y., et al., *Glucose-insulin-potassium therapy in adult patients undergoing cardiac surgery: a meta-analysis*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2011. **40**(1): p. 192-9.
227. Rabi, D., et al., *Effect of perioperative glucose-insulin-potassium infusions on mortality and atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting: a systematic review and meta-analysis*. *Can J Cardiol*, 2010. **26**(6): p. 178-84.
228. Wallin, M., et al., *The influence of glucose-insulin-potassium (GIK) on the GH/IGF-1/IGFBP-1 axis during elective coronary artery bypass surgery*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2003. **17**(4): p. 470-7.
229. Shaw, A., *Update on acute kidney injury after cardiac surgery*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2012. **143**(3): p. 676-81.
230. Zakeri, R., et al., *Relation between mild renal dysfunction and outcomes after coronary artery bypass grafting*. *Circulation*, 2005. **112**(9 Suppl): p. I270-5.
231. Uchino, S., et al., *Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study*. *JAMA*, 2005. **294**(7): p. 813-8.
232. Noyez, L., *Influence of the definition of acute renal failure post-cardiac surgery on incidence, patient identification, and identification of risk factors*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2011. **39**(3): p. e8-12.
233. Karkouti, K., et al., *Acute kidney injury after cardiac surgery: focus on modifiable risk factors*. *Circulation*, 2009. **119**(4): p. 495-502.
234. D'Onofrio, A., et al., *RIFLE criteria for cardiac surgery-associated acute kidney injury: risk factors and outcomes*. *Congest Heart Fail*, 2010. **16 Suppl 1**: p. S32-6.
235. Englberger, L., et al., *Clinical accuracy of RIFLE and Acute Kidney Injury Network (AKIN) criteria for acute kidney injury in patients undergoing cardiac surgery*. *Crit Care*, 2011. **15**(1): p. R16.
236. Robert, A.M., et al., *Cardiac surgery-associated acute kidney injury: a comparison of two consensus criteria*. *Ann Thorac Surg*, 2010. **90**(6): p. 1939-43.
237. Grayson, A.D., et al., *Valvular heart operation is an independent risk factor for acute renal failure*. *Ann Thorac Surg*, 2003. **75**(6): p. 1829-35.
238. Conlon, P.J., et al., *Acute renal failure following cardiac surgery*. *Nephrol Dial Transplant*, 1999. **14**(5): p. 1158-62.
239. Lassnigg, A., et al., *Minimal changes of serum creatinine predict prognosis in patients after cardiothoracic surgery: a prospective cohort study*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(6): p. 1597-605.
240. Kolli, H., et al., *Mild acute kidney injury is associated with increased mortality after cardiac surgery in patients with eGFR < 60 mL/min/1.73 m(2)*. *Ren Fail*, 2010. **32**(9): p. 1066-72.
241. Brown, J.R., et al., *Duration of acute kidney injury impacts long-term survival after cardiac surgery*. *Ann Thorac Surg*, 2010. **90**(4): p. 1142-8.
242. Swaminathan, M., et al., *Impact of early renal recovery on survival after cardiac surgery-associated acute kidney injury*. *Ann Thorac Surg*, 2010. **89**(4): p. 1098-104.
243. Bellomo, R., et al., *The pathophysiology of cardiac surgery-associated acute kidney injury (CSA-AKI)*. *Int J Artif Organs*, 2008. **31**(2): p. 166-78.
244. Rosner, M.H. and M.D. Okusa, *Acute Kidney Injury Associated with Cardiac Surgery*. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2006. **1**(1): p. 19-32.

245. Lameire, N., W. Van Biesen, and R. Vanholder, *Acute renal failure*. Lancet, 2005. **365**(9457): p. 417-30.
246. Li, S.Y., et al., *Acute kidney injury network classification predicts in-hospital and long-term mortality in patients undergoing elective coronary artery bypass grafting surgery*. Eur J Cardiothorac Surg, 2011. **39**(3): p. 323-8.
247. Kramer, R.S., et al., *Same admission cardiac catheterization and cardiac surgery: is there an increased incidence of acute kidney injury?* Ann Thorac Surg, 2010. **90**(5): p. 1418-23; discussion 1423-4.
248. Rosner, M.H., D. Portilla, and M.D. Okusa, *Cardiac surgery as a cause of acute kidney injury: pathogenesis and potential therapies*. J Intensive Care Med, 2008. **23**(1): p. 3-18.
249. Rosner, M.H. and M.D. Okusa, *Acute kidney injury associated with cardiac surgery*. Clin J Am Soc Nephrol, 2006. **1**(1): p. 19-32.
250. Arora, P., et al., *Preoperative use of angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin receptor blockers is associated with increased risk for acute kidney injury after cardiovascular surgery*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3**(5): p. 1266-73.
251. Ouzounian, M., et al., *Impact of preoperative angiotensin-converting enzyme inhibitor use on clinical outcomes after cardiac surgery*. Ann Thorac Surg, 2012. **93**(2): p. 559-64.
252. Haase, M., et al., *Cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury: a pigment nephropathy?* Contrib Nephrol, 2007. **156**: p. 340-53.
253. Haase, M., et al., *Sodium bicarbonate to prevent increases in serum creatinine after cardiac surgery: a pilot double-blind, randomized controlled trial*. Crit Care Med, 2009. **37**(1): p. 39-47.
254. Heringlake, M., et al., *A perioperative infusion of sodium bicarbonate does not improve renal function in cardiac surgery patients: a prospective observational cohort study*. Crit Care, 2012. **16**(4): p. R156.
255. Welten, G.M., et al., *Statin use is associated with early recovery of kidney injury after vascular surgery and improved long-term outcome*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(12): p. 3867-73.
256. Billings, F.T.t., et al., *Early postoperative statin therapy is associated with a lower incidence of acute kidney injury after cardiac surgery*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2010. **24**(6): p. 913-20.
257. Argalious, M., et al., *Preoperative statin therapy is not associated with a reduced incidence of postoperative acute kidney injury after cardiac surgery*. Anesth Analg, 2010. **111**(2): p. 324-30.
258. Prowle, J.R., et al., *Pilot double-blind, randomized controlled trial of short-term atorvastatin for prevention of acute kidney injury after cardiac surgery*. Nephrology (Carlton), 2012. **17**(3): p. 215-24.
259. Ranucci, M., et al., *Effects of fenoldopam infusion in complex cardiac surgical operations: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study*. Minerva Anestesiol, 2010. **76**(4): p. 249-59.
260. Zangrillo, A., et al., *Fenoldopam and acute renal failure in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2012. **26**(3): p. 407-13.
261. Smith, M.N., et al., *The effect of mannitol on renal function after cardiopulmonary bypass in patients with established renal dysfunction*. Anaesthesia, 2008. **63**(7): p. 701-4.
262. Yallop, K.G., S.V. Sheppard, and D.C. Smith, *The effect of mannitol on renal function following cardio-pulmonary bypass in patients with normal pre-operative creatinine*. Anaesthesia, 2008. **63**(6): p. 576-82.
263. Bragadottir, G., B. Redfors, and S.E. Ricksten, *Mannitol increases renal blood flow and maintains filtration fraction and oxygenation in postoperative acute kidney injury: a prospective interventional study*. Crit Care, 2012. **16**(4): p. R159.
264. Ambwani, J., et al., *Could atrial natriuretic peptide be a useful drug therapy for high-risk patients after cardiac surgery?* Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2009. **8**(4): p. 474-8.

265. Lingegowda, V., et al., *Long-term outcome of patients treated with prophylactic nesiritide for the prevention of acute kidney injury following cardiovascular surgery*. Clin Cardiol, 2010. **33**(4): p. 217-21.
266. Mitaka, C., et al., *Cardiovascular and renal effects of carperitide and nesiritide in cardiovascular surgery patients: a systematic review and meta-analysis*. Crit Care, 2011. **15**(5): p. R258.
267. Patel, N.N., et al., *Pharmacological therapies for the prevention of acute kidney injury following cardiac surgery: a systematic review*. Heart Fail Rev, 2011. **16**(6): p. 553-67.
268. Mentzer, R.M., Jr., et al., *Effects of perioperative nesiritide in patients with left ventricular dysfunction undergoing cardiac surgery:the NAPA Trial*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(6): p. 716-26.
269. Ejaz, A.A., et al., *Prophylactic nesiritide does not prevent dialysis or all-cause mortality in patients undergoing high-risk cardiac surgery*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **138**(4): p. 959-64.
270. McCullough, P.A., *Multimodality prevention of contrast-induced acute kidney injury*. Am J Kidney Dis, 2008. **51**(2): p. 169-72.
271. Shavit, L., et al., *Sodium bicarbonate versus sodium chloride and oral N-acetylcysteine for the prevention of contrast-induced nephropathy in advanced chronic kidney disease*. J Interv Cardiol, 2009. **22**(6): p. 556-63.
272. Hafiz, A.M., et al., *Prevention of contrast-induced acute kidney injury in patients with stable chronic renal disease undergoing elective percutaneous coronary and peripheral interventions: randomized comparison of two preventive strategies*. Catheter Cardiovasc Interv, 2012. **79**(6): p. 929-37.
273. Brown, J.R., et al., *Sodium bicarbonate plus N-acetylcysteine prophylaxis: a meta-analysis*. JACC Cardiovasc Interv, 2009. **2**(11): p. 1116-24.
274. Lameire, N., J.A. Kellum, and K.A.G.W. Group, *Contrast-induced acute kidney injury and renal support for acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 2)*. Crit Care, 2013. **17**(1): p. 205.
275. Ashworth, A. and S.T. Webb, *Does the prophylactic administration of N-acetylcysteine prevent acute kidney injury following cardiac surgery?* Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2010. **11**(3): p. 303-8.
276. Schetz, M., et al., *Prevention of cardiac surgery-associated acute kidney injury*. Int J Artif Organs, 2008. **31**(2): p. 179-89.
277. Jencks, S.F., et al., *Interpreting hospital mortality data. The role of clinical risk adjustment*. JAMA, 1988. **260**(24): p. 3611-6.
278. Nashef, S.A., et al., *European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE)*. Eur J Cardiothorac Surg, 1999. **16**(1): p. 9-13.
279. Parsonnet, V., D. Dean, and A.D. Bernstein, *A method of uniform stratification of risk for evaluating the results of surgery in acquired adult heart disease*. Circulation, 1989. **79**(6 Pt 2): p. 13-12.
280. Higgins, T.L., et al., *Stratification of morbidity and mortality outcome by preoperative risk factors in coronary artery bypass patients. A clinical severity score*. JAMA, 1992. **267**(17): p. 2344-8.
281. Collins, G.S. and D.G. Altman, *Design flaws in EuroSCORE II*. Eur J Cardiothorac Surg, 2013. **43**(4): p. 871.
282. Collins, G.S. and D.G. Altman, *Calibration of EuroSCORE II*. Eur J Cardiothorac Surg, 2013. **43**(3): p. 654.
283. Moons, K.G., et al., *Prognosis and prognostic research: what, why, and how?* BMJ, 2009. **338**: p. b375.
284. Steyerberg, E.W., et al., *Assessing the performance of prediction models: a framework for traditional and novel measures*. Epidemiology, 2010. **21**(1): p. 128-38.

285. Ad, N., S.D. Barnett, and A.M. Speir, *The performance of the EuroSCORE and the Society of Thoracic Surgeons mortality risk score: the gender factor*. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2007. **6**(2): p. 192-5.
286. Nashef, S.A., et al., *EuroSCORE II and the art and science of risk modelling*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2013. **43**(4): p. 695-6.
287. Chertow, G.M., et al., *Preoperative renal risk stratification*. *Circulation*, 1997. **95**(4): p. 878-84.
288. Biomarkers Definitions Working, G., *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. *Clin Pharmacol Ther*, 2001. **69**(3): p. 89-95.
289. Eikvar, L., et al., *Serum cardio-specific troponin T after open heart surgery in patients with and without perioperative myocardial infarction*. *Scand J Clin Lab Invest*, 1994. **54**(4): p. 329-35.
290. Ranasinghe, A.M., et al., *Which troponometric best predicts midterm outcome after coronary artery bypass graft surgery?* *Ann Thorac Surg*, 2011. **91**(6): p. 1860-7.
291. Ruifrok, W.T., et al., *Apoptosis during CABG surgery with the use of cardiopulmonary bypass is prominent in ventricular but not in atrial myocardium*. *Neth Heart J*, 2010. **18**(5): p. 236-42.
292. Morimoto, K., et al., *Perioperative changes in plasma brain natriuretic peptide concentrations in patients undergoing cardiac surgery*. *Surg Today*, 1998. **28**(1): p. 23-9.
293. Ustunsoy, H., et al., *The effects of pentoxifylline on the myocardial inflammation and ischemia-reperfusion injury during cardiopulmonary bypass*. *J Card Surg*, 2006. **21**(1): p. 57-61.
294. Sablotzki, A., et al., *The systemic inflammatory response syndrome following cardiac surgery: different expression of proinflammatory cytokines and procalcitonin in patients with and without multiorgan dysfunctions*. *Perfusion*, 2002. **17**(2): p. 103-9.
295. Gulielmos, V., et al., *Interleukin-1, interleukin-6 and myocardial enzyme response after coronary artery bypass grafting - a prospective randomized comparison of the conventional and three minimally invasive surgical techniques*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2000. **18**(5): p. 594-601.
296. Ray, P., et al., *Statistical evaluation of a biomarker*. *Anesthesiology*, 2010. **112**(4): p. 1023-40.
297. Hlatky, M.A., et al., *Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association*. *Circulation*, 2009. **119**(17): p. 2408-16.
298. Youden, W.J., *Index for rating diagnostic tests*. *Cancer*, 1950. **3**(1): p. 32-5.
299. Pencina, M.J., et al., *Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond*. *Stat Med*, 2008. **27**(2): p. 157-72; discussion 207-12.
300. Thakar, C.V., et al., *A clinical score to predict acute renal failure after cardiac surgery*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(1): p. 162-8.
301. Heise, D., et al., *Validation of a clinical score to determine the risk of acute renal failure after cardiac surgery*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2010. **37**(3): p. 710-6.
302. Mehta, R.H., et al., *Bedside tool for predicting the risk of postoperative dialysis in patients undergoing cardiac surgery*. *Circulation*, 2006. **114**(21): p. 2208-16; quiz 2208.
303. Wijeyesundera, D.N., et al., *Derivation and validation of a simplified predictive index for renal replacement therapy after cardiac surgery*. *JAMA*, 2007. **297**(16): p. 1801-9.
304. Candela-Toha, A., et al., *Predicting acute renal failure after cardiac surgery: external validation of two new clinical scores*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008. **3**(5): p. 1260-5.
305. Englberger, L., et al., *Validation of clinical scores predicting severe acute kidney injury after cardiac surgery*. *Am J Kidney Dis*, 2010. **56**(4): p. 623-31.
306. Parolari, A., et al., *Risk factors for perioperative acute kidney injury after adult cardiac surgery: role of perioperative management*. *Ann Thorac Surg*, 2012. **93**(2): p. 584-91.
307. Parikh, C.R., et al., *Postoperative biomarkers predict acute kidney injury and poor outcomes after adult cardiac surgery*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(9): p. 1748-57.

308. Mishra, J., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery*. The Lancet, 2005. **365**(9466): p. 1231-1238.
309. Han, W.K., et al., *Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(5): p. 873-82.
310. Go, A.S., et al., *The assessment, serial evaluation, and subsequent sequelae of acute kidney injury (ASSESS-AKI) study: design and methods*. BMC Nephrol, 2010. **11**: p. 22.
311. McIlroy, D.R., G. Wagener, and H.T. Lee, *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute kidney injury after cardiac surgery: the effect of baseline renal function on diagnostic performance*. Clin J Am Soc Nephrol, 2010. **5**(2): p. 211-9.
312. Haase, M., et al., *The outcome of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-positive subclinical acute kidney injury: a multicenter pooled analysis of prospective studies*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(17): p. 1752-61.
313. Haase-Fielitz, A., et al., *The predictive performance of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) increases with grade of acute kidney injury*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(11): p. 3349-54.
314. Haase, M., et al., *Novel biomarkers early predict the severity of acute kidney injury after cardiac surgery in adults*. Ann Thorac Surg, 2009. **88**(1): p. 124-30.
315. Koyner, J.L., et al., *Urinary cystatin C as an early biomarker of acute kidney injury following adult cardiothoracic surgery*. Kidney Int, 2008. **74**(8): p. 1059-69.
316. Parikh, C.R., et al., *Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery*. Kidney Int, 2006. **70**(1): p. 199-203.
317. Parikh, C.R., et al., *Postoperative biomarkers predict acute kidney injury and poor outcomes after pediatric cardiac surgery*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(9): p. 1737-47.
318. Spahillari, A., et al., *Serum cystatin C- versus creatinine-based definitions of acute kidney injury following cardiac surgery: a prospective cohort study*. Am J Kidney Dis, 2012. **60**(6): p. 922-9.
319. Patel, U.D., et al., *Preoperative Serum Brain Natriuretic Peptide and Risk of Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery*. Circulation, 2012. **125**(11): p. 1347-1355.
320. Lind, L., et al., *Growth-differentiation factor-15 is an independent marker of cardiovascular dysfunction and disease in the elderly: results from the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) Study*. Eur Heart J, 2009.
321. Wollert, K.C., et al., *Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome*. Circulation, 2007. **115**(8): p. 962-71.
322. Bonaca, M.P., et al., *Growth differentiation factor-15 and risk of recurrent events in patients stabilized after acute coronary syndrome: observations from PROVE IT-TIMI 22*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(1): p. 203-10.
323. Blobe, G.C., W.P. Schiemann, and H.F. Lodish, *Role of transforming growth factor beta in human disease*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1350-8.
324. Massague, J., S.W. Blain, and R.S. Lo, *TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders*. Cell, 2000. **103**(2): p. 295-309.
325. Massague, J. and D. Wotton, *Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system*. EMBO J, 2000. **19**(8): p. 1745-54.
326. Piek, E., C.H. Heldin, and P. Ten Dijke, *Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling*. FASEB J, 1999. **13**(15): p. 2105-24.
327. Feng, X.H. and R. Derynck, *Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 659-93.
328. Bernabeu, C., J.M. Lopez-Novoa, and M. Quintanilla, *The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(10): p. 954-73.
329. Soderberg, S.S., G. Karlsson, and S. Karlsson, *Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1176**: p. 55-69.
330. Trombly, D.J., T.K. Woodruff, and K.E. Mayo, *Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis*. Semin Reprod Med, 2009. **27**(1): p. 14-23.

331. Bootcov, M.R., et al., *MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11514-9.
332. Lawton, L.N., et al., *Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta*. Gene, 1997. **203**(1): p. 17-26.
333. Bottner, M., et al., *Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues*. Cell Tissue Res, 1999. **297**(1): p. 103-10.
334. Moore, A.G., et al., *The transforming growth factor-ss superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(12): p. 4781-8.
335. Strelau, J., et al., *Progressive postnatal motoneuron loss in mice lacking GDF-15*. J Neurosci, 2009. **29**(43): p. 13640-8.
336. Kempf, T., et al., *The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury*. Circ Res, 2006. **98**(3): p. 351-60.
337. Zimmers, T.A., et al., *Growth differentiation factor-15: induction in liver injury through p53 and tumor necrosis factor-independent mechanisms*. J Surg Res, 2006. **130**(1): p. 45-51.
338. Ago, T. and J. Sadoshima, *GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein*. Circ Res, 2006. **98**(3): p. 294-7.
339. Paralkar, V.M., et al., *Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13760-7.
340. Detmer, K., et al., *Lineage-restricted expression of bone morphogenetic protein genes in human hematopoietic cell lines*. Blood Cells Mol Dis, 1999. **25**(5-6): p. 310-23.
341. Ding, Q., et al., *Identification of macrophage inhibitory cytokine-1 in adipose tissue and its secretion as an adipokine by human adipocytes*. Endocrinology, 2009. **150**(4): p. 1688-96.
342. Xu, J., et al., *GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation*. Circ Res, 2006. **98**(3): p. 342-50.
343. Duong Van Huyen, J.P., et al., *GDF15 triggers homeostatic proliferation of acid-secreting collecting duct cells*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(10): p. 1965-74.
344. Tong, S., et al., *Serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC 1) as a predictor of miscarriage*. Lancet, 2004. **363**(9403): p. 129-30.
345. Tanno, T., et al., *High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin*. Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1096-101.
346. Tamary, H., et al., *Elevated growth differentiation factor 15 expression in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I*. Blood, 2008. **112**(13): p. 5241-4.
347. Bauskin, A.R., et al., *Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(10): p. 4983-6.
348. Brown, D.A., et al., *Serum macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15): a potential screening tool for the prevention of colon cancer?* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(2): p. 337-46.
349. Karan, D., J. Holzbeierlein, and J.B. Thrasher, *Macrophage inhibitory cytokine-1: possible bridge molecule of inflammation and prostate cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(1): p. 2-5.
350. Johnen, H., et al., *Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1*. Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1333-40.
351. Adela, R. and S.K. Banerjee, *GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective*. J Diabetes Res, 2015. **2015**: p. 490842.
352. Bauskin, A.R., et al., *The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1*. EMBO J, 2000. **19**(10): p. 2212-20.

353. Fairlie, W.D., et al., *MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(1): p. 2-5.
354. Tsuji, A., et al., *Secretory proprotein convertases PACE4 and PC6A are heparin-binding proteins which are localized in the extracellular matrix. Potential role of PACE4 in the activation of proproteins in the extracellular matrix*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1645**(1): p. 95-104.
355. Mimeault, M. and S.K. Batra, *Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer*. J Cell Physiol, 2010. **224**(3): p. 626-35.
356. Unsicker, K., B. Spittau, and K. Krieglstein, *The multiple facets of the TGF-beta family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1*. Cytokine Growth Factor Rev, 2013. **24**(4): p. 373-84.
357. Albertoni, M., et al., *Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1*. Oncogene, 2002. **21**(27): p. 4212-9.
358. Akiyama, M., et al., *Macrophage inhibitory cytokine MIC-1 is upregulated by short-wavelength light in cultured normal human dermal fibroblasts*. FEBS Lett, 2009. **583**(5): p. 933-7.
359. Li, P.X., et al., *Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 20127-35.
360. Schober, A., et al., *Expression of growth differentiation factor-15/ macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in the perinatal, adult, and injured rat brain*. J Comp Neurol, 2001. **439**(1): p. 32-45.
361. Kim, K.S., et al., *Expression and regulation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) in human and mouse tissue*. Gastroenterology, 2002. **122**(5): p. 1388-98.
362. Marjono, A.B., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 in gestational tissues and maternal serum in normal and pre-eclamptic pregnancy*. Placenta, 2003. **24**(1): p. 100-6.
363. Brown, D.A., et al., *Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: a nested case-control study*. Lancet, 2002. **359**(9324): p. 2159-63.
364. Kelly, J.A., M.S. Lucia, and J.R. Lambert, *p53 controls prostate-derived factor/macrophage inhibitory cytokine/NSAID-activated gene expression in response to cell density, DNA damage and hypoxia through diverse mechanisms*. Cancer Lett, 2009. **277**(1): p. 38-47.
365. Tan, M., et al., *PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 109-14.
366. Yang, H., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(10): p. 1023-9.
367. Yamaguchi, K., et al., *Identification of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) as a novel downstream target of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3beta pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 49617-23.
368. Baek, S.J., et al., *Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(2): p. 356-64.
369. Levy, L. and C.S. Hill, *Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(1-2): p. 41-58.
370. Reissmann, E., et al., *The orphan receptor ALK7 and the Activin receptor ALK4 mediate signaling by Nodal proteins during vertebrate development*. Genes Dev, 2001. **15**(15): p. 2010-22.
371. Gouedard, L., et al., *Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Mullerian hormone and its type II receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 27973-8.



372. Oh, S.P., et al., *Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2626-31.
373. Ago, T., et al., *Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes*. Circ Res, 2010. **106**(7): p. 1253-64.
374. Schmierer, B. and C.S. Hill, *TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(12): p. 970-82.
375. Wollert, K.C. and T. Kempf, *Growth differentiation factor 15 in heart failure: an update*. Curr Heart Fail Rep, 2012. **9**(4): p. 337-45.
376. Khan, S.Q., et al., *Growth differentiation factor-15 as a prognostic marker in patients with acute myocardial infarction*. Eur Heart J, 2009. **30**(9): p. 1057-65.
377. Schaub, N., et al., *Growth differentiation factor-15 in the early diagnosis and risk stratification of patients with acute chest pain*. Clin Chem, 2012. **58**(2): p. 441-9.
378. Eggers, K.M., et al., *Growth-differentiation factor-15 for long-term risk prediction in patients stabilized after an episode of non-ST-segment-elevation acute coronary syndrome*. Circ Cardiovasc Genet, 2010. **3**(1): p. 88-96.
379. Schopfer, D.W., et al., *Growth differentiation factor 15 and cardiovascular events in patients with stable ischemic heart disease (The Heart and Soul Study)*. Am Heart J, 2014. **167**(2): p. 186-192 e1.
380. Shibamura, M., et al., *Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide*. Eur J Biochem, 1993. **217**(1): p. 13-9.
381. Oshima, Y., et al., *Follistatin-like 1 is an Akt-regulated cardioprotective factor that is secreted by the heart*. Circulation, 2008. **117**(24): p. 3099-108.
382. Ogura, Y., et al., *Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models*. Circulation, 2012. **126**(14): p. 1728-38.
383. Widera, C., et al., *Circulating concentrations of follistatin-like 1 in healthy individuals and patients with acute coronary syndrome as assessed by an immunoluminometric sandwich assay*. Clin Chem, 2009. **55**(10): p. 1794-800.
384. El-Armouche, A., et al., *Follistatin-like 1 in chronic systolic heart failure: a marker of left ventricular remodeling*. Circ Heart Fail, 2011. **4**(5): p. 621-7.
385. Widera, C., et al., *Identification of follistatin-like 1 by expression cloning as an activator of the growth differentiation factor 15 gene and a prognostic biomarker in acute coronary syndrome*. Clin Chem, 2012. **58**(8): p. 1233-41.
386. Kempf, T., et al., *GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice*. Nat Med, 2011. **17**(5): p. 581-8.
387. Bonaterra, G.A., et al., *Growth differentiation factor-15 deficiency inhibits atherosclerosis progression by regulating interleukin-6-dependent inflammatory response to vascular injury*. J Am Heart Assoc, 2012. **1**(6): p. e002550.
388. Lamouille, S., et al., *Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4495-501.
389. Huh, S.J., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 regulates melanoma vascular development*. Am J Pathol, 2010. **176**(6): p. 2948-57.
390. Topper, J.N., *TGF-beta in the cardiovascular system: molecular mechanisms of a context-specific growth factor*. Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(3): p. 132-7.
391. Bobik, A., et al., *Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development*. Circulation, 1999. **99**(22): p. 2883-91.
392. Hutter, R., et al., *Caspase-3 and tissue factor expression in lipid-rich plaque macrophages: evidence for apoptosis as link between inflammation and atherothrombosis*. Circulation, 2004. **109**(16): p. 2001-8.

393. Wintergerst, E.S., et al., *Apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein in human monocyte-derived macrophages involves CD36 and activation of caspase-3*. Eur J Biochem, 2000. **267**(19): p. 6050-9.
394. Kinscherf, R., et al., *Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase in macrophages by oxidized LDL: its relevance in atherosclerosis of humans and heritable hyperlipidemic rabbits*. FASEB J, 1997. **11**(14): p. 1317-28.
395. Kinscherf, R., et al., *Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide dismutase and p53 dependent*. FASEB J, 1998. **12**(6): p. 461-7.
396. Mallat, Z., et al., *Colocalization of CPP-32 with apoptotic cells in human atherosclerotic plaques*. Circulation, 1997. **96**(2): p. 424-8.
397. Schlittenhardt, D., et al., *Involvement of growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in oxLDL-induced apoptosis of human macrophages in vitro and in arteriosclerotic lesions*. Cell Tissue Res, 2004. **318**(2): p. 325-33.
398. de Jager, S.C., et al., *Growth differentiation factor 15 deficiency protects against atherosclerosis by attenuating CCR2-mediated macrophage chemotaxis*. J Exp Med, 2011. **208**(2): p. 217-25.
399. Kempf, T. and K.C. Wollert, *Growth differentiation factor-15: a new biomarker in cardiovascular disease*. Herz, 2009. **34**(8): p. 594-9.
400. Allender, S., et al., *Patterns of coronary heart disease mortality over the 20th century in England and Wales: Possible plateaus in the rate of decline*. BMC Public Health, 2008. **8**: p. 148.
401. Wollert, K.C., et al., *Growth differentiation factor 15 for risk stratification and selection of an invasive treatment strategy in non ST-elevation acute coronary syndrome*. Circulation, 2007. **116**(14): p. 1540-8.
402. Rohatgi, A., et al., *Association of growth differentiation factor-15 with coronary atherosclerosis and mortality in a young, multiethnic population: observations from the Dallas Heart Study*. Clin Chem, 2012. **58**(1): p. 172-82.
403. Cuspidi, C., et al., *Prevalence of left-ventricular hypertrophy in hypertension: an updated review of echocardiographic studies*. J Hum Hypertens, 2012. **26**(6): p. 343-9.
404. Schillaci, G., et al., *Continuous relation between left ventricular mass and cardiovascular risk in essential hypertension*. Hypertension, 2000. **35**(2): p. 580-6.
405. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. N Engl J Med, 1990. **322**(22): p. 1561-6.
406. Xu, X.Y., et al., *Growth differentiation factor (GDF)-15 blocks norepinephrine-induced myocardial hypertrophy via a novel pathway involving inhibition of epidermal growth factor receptor transactivation*. J Biol Chem, 2014. **289**(14): p. 10084-94.
407. Hanatani, S., et al., *Growth differentiation factor 15 can distinguish between hypertrophic cardiomyopathy and hypertensive hearts*. Heart Vessels, 2014. **29**(2): p. 231-7.
408. Wang, J., et al., *Targeted disruption of Smad4 in cardiomyocytes results in cardiac hypertrophy and heart failure*. Circ Res, 2005. **97**(8): p. 821-8.
409. Jurczyk, J., D. Brown, and K.K. Stanley, *Polarised secretion of cytokines in primary human microvascular endothelial cells is not dependent on N-linked glycosylation*. Cell Biol Int, 2003. **27**(12): p. 997-1003.
410. Bueno, O.F. and J.D. Molkentin, *Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death*. Circ Res, 2002. **91**(9): p. 776-81.
411. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature, 2003. **425**(6958): p. 577-84.
412. Heger, J., et al., *Growth differentiation factor 15 acts anti-apoptotic and pro-hypertrophic in adult cardiomyocytes*. J Cell Physiol, 2010. **224**(1): p. 120-6.
413. Stahrenberg, R., et al., *The novel biomarker growth differentiation factor 15 in heart failure with normal ejection fraction*. Eur J Heart Fail, 2010. **12**(12): p. 1309-16.

414. Lok, S.I., et al., *Circulating growth differentiation factor-15 correlates with myocardial fibrosis in patients with non-ischaemic dilated cardiomyopathy and decreases rapidly after left ventricular assist device support*. Eur J Heart Fail, 2012. **14**(11): p. 1249-56.
415. Anand, I.S., et al., *Serial Measurement of Growth-Differentiation Factor-15 in Heart Failure Relation to Disease Severity and Prognosis in the Valsartan Heart Failure Trial*. Circulation, 2010. **122**(14): p. 1387-1395.
416. Chen, B., et al., *Olmесartan prevents cardiac rupture in mice with myocardial infarction by modulating growth differentiation factor 15 and p53*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(15): p. 3741-53.
417. Frank, D., et al., *Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program*. Hypertension, 2008. **51**(2): p. 309-18.
418. van Dokkum, R.P., et al., *Myocardial infarction enhances progressive renal damage in an experimental model for cardio-renal interaction*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(12): p. 3103-10.
419. Desai, A.S., et al., *Association between cardiac biomarkers and the development of ESRD in patients with type 2 diabetes mellitus, anemia, and CKD*. Am J Kidney Dis, 2011. **58**(5): p. 717-28.
420. Ho, J.E., et al., *Biomarkers of Cardiovascular Stress and Incident Chronic Kidney Disease*. Clin Chem, 2013. **59**(11): p. 1613-1620.
421. Lajer, M., et al., *Plasma Growth Differentiation Factor-15 Independently Predicts All-Cause and Cardiovascular Mortality As Well As Deterioration of Kidney Function in Type 1 Diabetic Patients With Nephropathy*. Diabetes Care, 2010. **33**(7): p. 1567-1572.
422. Zimmers, T.A., et al., *Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury*. Shock (Augusta, Ga.), 2005. **23**(6): p. 543-548.
423. Simonson, M.S., et al., *The renal transcriptome of db/db mice identifies putative urinary biomarker proteins in patients with type 2 diabetes: a pilot study*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **302**(7): p. F820-9.
424. Mogensen, C.E., C.K. Christensen, and E. Vittinghus, *The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy*. Diabetes, 1983. **32 Suppl 2**: p. 64-78.
425. Li, H., et al., *[Value of plasma growth differentiation factor-15 in diagnosis and evaluation of type 2 diabetic nephropathy]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2014. **34**(3): p. 387-90.
426. Kahli, A., et al., *Growth differentiation factor-15 (GDF-15) levels are associated with cardiac and renal injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e105759.
427. Guenancia, C., et al., *Pre-operative growth differentiation factor 15 as a novel biomarker of acute kidney injury after cardiac bypass surgery*. Int J Cardiol, 2015. **197**: p. 66-71.
428. Goudeau, J.J., et al., *In high-risk patients, combination of antiinflammatory procedures during cardiopulmonary bypass can reduce incidences of inflammation and oxidative stress*. J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **49**(1): p. 39-45.
429. Dominguez-Rodriguez, A., P. Abreu-Gonzalez, and P. Avanzas, *Relation of growth-differentiation factor 15 to left ventricular remodeling in ST-segment elevation myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2011. **108**(7): p. 955-8.
430. Ganem, F., et al., *Preoperative B-type natriuretic peptide, and not the inflammation status, predicts an adverse outcome for patients undergoing heart surgery*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2011. **12**(5): p. 778-83.
431. American Society of Anesthesiologists Task Force on Perioperative Blood, T. and T. Adjuvant, *Practice guidelines for perioperative blood transfusion and adjuvant therapies: an updated report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Perioperative Blood Transfusion and Adjuvant Therapies*. Anesthesiology, 2006. **105**(1): p. 198-208.
432. Levey, A.S., et al., *A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group*. Ann Intern Med, 1999. **130**(6): p. 461-70.

433. Machado, M.N., M.A. Nakazone, and L.N. Maia, *Prognostic value of acute kidney injury after cardiac surgery according to kidney disease: improving global outcomes definition and staging (KDIGO) criteria*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e98028.
434. Kempf, T., et al., *Circulating concentrations of growth-differentiation factor 15 in apparently healthy elderly individuals and patients with chronic heart failure as assessed by a new immunoradiometric sandwich assay*. Clin Chem, 2007. **53**(2): p. 284-91.
435. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
436. Doise, J.M., et al., *Plasma antioxidant status in septic critically ill patients: a decrease over time*. Fundam Clin Pharmacol, 2008. **22**(2): p. 203-9.
437. Lorgis, L., et al., *The free oxygen radicals test (FORT) to assess circulating oxidative stress in patients with acute myocardial infarction*. Atherosclerosis, 2010. **213**(2): p. 616-621.
438. Mishra, J., et al., *Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(10): p. 2534-43.
439. Wagener, G., et al., *Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery*. Anesthesiology, 2006. **105**(3): p. 485-91.
440. Mehta, R.L., et al., *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury*. Crit Care, 2007. **11**(2): p. R31.
441. DeLong, E.R., D.M. DeLong, and D.L. Clarke-Pearson, *Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach*. Biometrics, 1988. **44**(3): p. 837-845.
442. Lorin, J., et al., *Arginine and nitric oxide synthase: regulatory mechanisms and cardiovascular aspects*. Mol Nutr Food Res, 2014. **58**(1): p. 101-16.
443. Rochette, L., et al., *Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets?* Pharmacol Ther, 2013. **140**(3): p. 239-57.
444. Cavalca, V., et al., *Circulating levels of dimethylarginines, chronic kidney disease and long-term clinical outcome in non-ST-elevation myocardial infarction*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e48499.
445. Zoccali, C., *Asymmetric dimethylarginine in end-stage renal disease patients: a biomarker modifiable by calcium blockade and angiotensin II antagonism?* Kidney Int, 2006. **70**(12): p. 2053-5.
446. Cooke, J.P. and Y.T. Ghebremariam, *DDAH says NO to ADMA*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(7): p. 1462-4.
447. Ivanova, M., et al., *HPLC determination of plasma dimethylarginines: method validation and preliminary clinical application*. Clin Chim Acta, 2010. **411**(21-22): p. 1632-6.
448. Servillo, L., et al., *Determination of Homoarginine, Arginine, NMMA, ADMA, and SDMA in Biological Samples by HPLC-ESI-Mass Spectrometry*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(10): p. 20131-8.
449. Raptis, V., S. Kapoulas, and D. Grekas, *Role of asymmetrical dimethylarginine in the progression of renal disease*. Nephrology (Carlton), 2013. **18**(1): p. 11-21.
450. Mihout, F., et al., *Asymmetric dimethylarginine (ADMA) induces chronic kidney disease through a mechanism involving collagen and TGF-beta1 synthesis*. J Pathol, 2011. **223**(1): p. 37-45.
451. Hassinger, A.B., et al., *Elevated preoperative serum asymmetrical dimethylarginine (ADMA) is associated with poor outcomes after pediatric cardiac surgery*. Intensive Care Med, 2012. **38**(10): p. 1697-704.
452. Bode-Boger, S.M., F. Scalera, and L.J. Ignarro, *The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio*. Pharmacol Ther, 2007. **114**(3): p. 295-306.
453. Anderssohn, M., et al., *The L-Arginine-asymmetrical dimethylarginine ratio is an independent predictor of mortality in dilated cardiomyopathy*. J Card Fail, 2012. **18**(12): p. 904-11.
454. Boger, R.H., et al., *Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community*. Circulation, 2009. **119**(12): p. 1592-600.

455. Ziegeler, S., B.E. Tsusaki, and C.D. Collard, *Influence of genotype on perioperative risk and outcome*. *Anesthesiology*, 2003. **99**(1): p. 212-9.
456. Wallentin, L., et al., *Growth differentiation factor 15, a marker of oxidative stress and inflammation, for risk assessment in patients with atrial fibrillation: insights from the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) trial*. *Circulation*, 2014. **130**(21): p. 1847-58.
457. Hijazi, Z., et al., *Biomarkers of inflammation and risk of cardiovascular events in anticoagulated patients with atrial fibrillation*. *Heart*, 2016.
458. Wallentin, L., *Growth Differentiation Factor-15 (Gdf-15) For Prognostication Of Outcomes In Stable Coronary Artery Disease: Experiences From The STABILITY Trial*. 2015, JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY.
459. Hagstrom, E., et al., *Growth differentiation factor-15 level predicts major bleeding and cardiovascular events in patients with acute coronary syndromes: results from the PLATO study*. *Eur Heart J*, 2015.
460. Hijazi, Z., et al., *The novel biomarker-based ABC (age, biomarkers, clinical history)-bleeding risk score for patients with atrial fibrillation: a derivation and validation study*. *Lancet*, 2016. **387**(10035): p. 2302-11.
461. Zhang, M., et al., *Multimarker approach for the prediction of cardiovascular events in patients with mild to moderate coronary artery lesions. A 3-year follow-up study*. *Int Heart J*, 2012. **53**(2): p. 85-90.
462. Schnabel, R.B., et al., *Multiple marker approach to risk stratification in patients with stable coronary artery disease*. *Eur Heart J*, 2010. **31**(24): p. 3024-31.
463. Kempf, T., et al., *Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **50**(11): p. 1054-60.
464. Heringlake, M., et al., *Growth differentiation factor 15: a novel risk marker adjunct to the EuroSCORE for risk stratification in cardiac surgery patients*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **61**(6): p. 672-81.
465. Wagener, G., et al., *Increased incidence of acute kidney injury with aprotinin use during cardiac surgery detected with urinary NGAL*. *Am J Nephrol*, 2008. **28**(4): p. 576-82.
466. Parikh, C.R., et al., *Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation*. *Am J Transplant*, 2006. **6**(7): p. 1639-45.
467. Hirsch, R., et al., *NGAL is an early predictive biomarker of contrast-induced nephropathy in children*. *Pediatr Nephrol*, 2007. **22**(12): p. 2089-95.
468. Breit, S.N., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) and mortality in end-stage renal disease*. *Nephrol Dial Transplant*, 2012. **27**(1): p. 70-5.
469. Ichimura, T., et al., *Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **286**(3): p. F552-63.
470. Zhang, Z., B.D. Humphreys, and J.V. Bonventre, *Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by MAP kinases and juxtamembrane region*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(10): p. 2704-14.
471. Han, W.K., et al., *Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury*. *Kidney Int*, 2002. **62**(1): p. 237-44.
472. Bihorac, A., et al., *Validation of cell-cycle arrest biomarkers for acute kidney injury using clinical adjudication*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. **189**(8): p. 932-9.
473. Stehouwer, C.D., et al., *Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM*. *Diabetes*, 1995. **44**(5): p. 561-4.
474. Ostermann, M. and R.W. Chang, *Acute kidney injury in the intensive care unit according to RIFLE*. *Crit Care Med*, 2007. **35**(8): p. 1837-43; quiz 1852.
475. Metnitz, P.G., et al., *Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients*. *Crit Care Med*, 2002. **30**(9): p. 2051-8.
476. Mehta, R.L., et al., *Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience*. *Kidney Int*, 2004. **66**(4): p. 1613-21.

477. Schiffl, H. and S.M. Lang, *Update on biomarkers of acute kidney injury: moving closer to clinical impact?* Mol Diagn Ther, 2012. **16**(4): p. 199-207.
478. Dennen, P., I.S. Douglas, and R. Anderson, *Acute kidney injury in the intensive care unit: an update and primer for the intensivist.* Crit Care Med, 2010. **38**(1): p. 261-75.
479. Chawla, L.S. and P.L. Kimmel, *Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome.* Kidney Int, 2012. **82**(5): p. 516-24.
480. Ishani, A., et al., *Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly.* J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(1): p. 223-8.
481. Lo, L.J., et al., *Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease.* Kidney Int, 2009. **76**(8): p. 893-9.
482. Coca, S.G. and C.R. Parikh, *Urinary biomarkers for acute kidney injury: perspectives on translation.* Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3**(2): p. 481-90.
483. Jo, S.K., M.H. Rosner, and M.D. Okusa, *Pharmacologic treatment of acute kidney injury: why drugs haven't worked and what is on the horizon.* Clin J Am Soc Nephrol, 2007. **2**(2): p. 356-65.
484. Ad-hoc working group of, E., et al., *A European Renal Best Practice (ERBP) position statement on the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) clinical practice guidelines on acute kidney injury: part 1: definitions, conservative management and contrast-induced nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(12): p. 4263-72.
485. Kourliouros, A., et al., *Low cardiopulmonary bypass perfusion temperatures are associated with acute kidney injury following coronary artery bypass surgery.* Eur J Cardiothorac Surg, 2010. **37**(3): p. 704-9.
486. Song, Y.R., et al., *Prevention of acute kidney injury by erythropoietin in patients undergoing coronary artery bypass grafting: a pilot study.* Am J Nephrol, 2009. **30**(3): p. 253-60.
487. Post Coronary Artery Bypass Graft Trial, I., *The effect of aggressive lowering of low-density lipoprotein cholesterol levels and low-dose anticoagulation on obstructive changes in saphenous-vein coronary-artery bypass grafts.* N Engl J Med, 1997. **336**(3): p. 153-62.
488. Frick, M.H., et al., *Prevention of the angiographic progression of coronary and vein-graft atherosclerosis by gemfibrozil after coronary bypass surgery in men with low levels of HDL cholesterol.* Lipid Coronary Angiography Trial (LOCAT) Study Group. Circulation, 1997. **96**(7): p. 2137-43.
489. Christenson, J.T., *Preoperative lipid control with simvastatin protects coronary artery bypass grafts from obstructive graft disease.* Am J Cardiol, 2001. **88**(8): p. 896-9, A8.
490. Dotani, M.I., et al., *Effect of preoperative statin therapy and cardiac outcomes after coronary artery bypass grafting.* Am J Cardiol, 2000. **86**(10): p. 1128-30, A6.
491. Pan, W., et al., *Statins are associated with a reduced incidence of perioperative mortality after coronary artery bypass graft surgery.* Circulation, 2004. **110**(11 Suppl 1): p. II45-9.
492. Fleming, T.R., *Surrogate endpoints and FDA's accelerated approval process.* Health Aff (Millwood), 2005. **24**(1): p. 67-78.
493. Freidlin, B. and E.L. Korn, *Biomarker-adaptive clinical trial designs.* Pharmacogenomics, 2010. **11**(12): p. 1679-82.
494. Pene, F., et al., *Toward theragnostics.* Crit Care Med, 2009. **37**(1 Suppl): p. S50-8.
495. Duong Van Huyen, J.P., et al., *MicroRNAs as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection.* Eur Heart J, 2014. **35**(45): p. 3194-202.
496. Bloch, S.A., et al., *Increased expression of GDF-15 may mediate ICU-acquired weakness by down-regulating muscle microRNAs.* Thorax, 2015. **70**(3): p. 219-28.
497. Bossuyt, P.M., et al., *Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative.* Ann Clin Biochem, 2003. **40**(Pt 4): p. 357-63.
498. Gallo, V., et al., *Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology--Molecular Epidemiology STROBE-ME: an extension of the STROBE statement.* J Clin Epidemiol, 2011. **64**(12): p. 1350-63.

499. Altman, D.G., et al., *The revised CONSORT statement for reporting randomized trials: explanation and elaboration*. Ann Intern Med, 2001. **134**(8): p. 663-94.

# *ANNEXES*



## Liste des travaux :

### Publications en rapport avec la thématique de la thèse d'Université :

**Kahli A**, Guenancia C, Zeller M, Grosjean S, Stamboul K, Rochette L, Girard C, Vergely C.  
Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) Levels Are Associated with Cardiac and Renal Injury in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting with Cardiopulmonary Bypass.  
PLoS One. 2014 Aug 29;9(8):e105759. doi: 10.1371/journal.pone.0105759. PMID: 25171167

Bouchot O, Guenancia C, **Kahli A**, Pujos C, Malapert G, Vergely C, Laurent G.  
Low Circulating Levels of Growth Differentiation Factor-15 Before Coronary Artery Bypass Surgery May Predict Postoperative Atrial Fibrillation.  
J Cardiothorac Vasc Anesth. 2015 Jan 9. doi: 10.1053/j.jvca.2015.01.023. PMID: 25990268

Guenancia C, **Kahli A**, Laurent G, Hachet O, Malapert G, Grosjean S, Girard C, Vergely C, Bouchot O  
Pre-operative growth differentiation factor 15 as a novel biomarker of acute kidney injury after cardiac bypass surgery.  
International Journal of Cardiology 197 (2015) 66–71. doi:10.1016/j.ijcard.2015.06.012 PMID: 26113476

### Publications en dehors de la thématique de la thèse d'Université :

Rochette L, **Kahli A**, Zeller M, Cottin Y, Bejot Y and Vergely C.  
Rejuvenation of aging heart, muscle and brain by growth differentiation factor-11 (GDF-11): a reality for regenerative medicine? Soumis à Journal of Gerontology: Biological Sciences.

## Communications affichées

### 1. Congrès nationaux

#### *Congrès national Printemps de la Cardiologie, Marseille, Avril 2013*

Evaluation of the release of Growth Differentiation Factor 15 during cardiopulmonary bypass.  
Abdelkader Kahli, Marianne Zeller, Sandrine Grosjean, Luc Rochette, Claude Girard, Catherine Vergely

#### *Congrès national Printemps de la Cardiologie, Strasbourg, Avril 2014*

Cardiac surgery associated with cardiopulmonary bypass in patients with stable coronary disease: Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) as a predictive factor of adverse events?  
Abdelkader Kahli, Marianne Zeller, Sandrine Grosjean, Luc Rochette, Claude Girard, Catherine Vergely

#### *Congrès national Printemps de la Cardiologie, Toulouse, Avril 2015*

Preoperative Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) as a novel and powerful biomarker of acute kidney injury after cardiac bypass surgery  
Abdelkader Kahli, Charles Guenancia, Gabriel Laurent, Claude Girard, Catherine Vergely, Olivier Bouchot

Low Circulating Levels of Growth Differentiation Factor-15 Before Coronary Artery Bypass Surgery May Predict Postoperative Atrial Fibrillation.

Bouchot Olivier, Guenancia Charles, Kahli Abdelkader, Pujos Charline, Malapert Ghislain, Vergely Catherine, Laurent Gabriel.

### 2. Congrès internationaux

#### *Congrès international IVBM (International Vascular Biology Meeting), Kyoto, Avril 2014*

Titre: Cardiac surgery associated with cardiopulmonary bypass in patients with stable coronary disease: Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) as a predictive factor of adverse events?  
Abdelkader Kahli, Marianne Zeller, Sandrine Grosjean, Luc Rochette, Claude Girard, Catherine Vergely

#### *Congrès international de l'ESC (European Society of Cardiology), Londres, Septembre 2015*

Titre: Preoperative Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) as a novel and powerful biomarker of acute kidney injury after cardiac bypass surgery  
Abdelkader Kahli, Charles Guenancia, Gabriel Laurent, Claude Girard, Catherine Vergely, Olivier Bouchot

# **Chirurgie cardiaque sous circulation extracorporelle et ses biomarqueurs :**

## **Rôle du Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15)**

Les cardiopathies ischémiques sont des pathologies fréquentes et graves, responsables d'une part importante des décès d'origine cardiovasculaire. Une des alternatives pour la prise en charge des patients atteints de cardiopathie ischémique est la chirurgie cardiaque. La circulation extracorporelle compte parmi les progrès techniques majeurs associés à la chirurgie cardiaque, mais elle constitue aussi l'une des causes de complications principales car responsable d'une réponse inflammatoire généralisée. Cette réponse inflammatoire qui résulte de la conjugaison des effets du stress oxydant et des cytokines libérés, contribuerait à la dysfonction multi-organe aboutissant aux complications myocardiques et rénales survenant au cours des périodes per- et post-opératoires.

La première partie de notre travail avait pour objectif d'explorer l'évolution des taux circulants du GDF-15, cytokine associée au stress oxydant et à l'inflammation, dans ce contexte de chirurgie cardiaque. Notre étude prospective a démontré pour la première fois que cette procédure est accompagnée de l'augmentation du GDF-15 dont les taux plasmatiques sont associés aux lésions post-opératoires cardiaques et rénales.

L'évaluation du risque opératoire repose actuellement sur un ensemble de scores dont le calcul est basé essentiellement sur des caractéristiques cliniques. Bien qu'étant largement utilisés, ces scores présentent toutefois un certain nombre de limitations. A l'inverse, en dehors de tout contexte chirurgical, la stratification du risque chez les patients « médicaux » atteints de pathologies cardiovasculaires, est habituellement définie en associant des caractéristiques cliniques à l'évaluation des taux circulants de biomarqueurs (troponines cardiaques, BNP, Nt-proBNP). L'objectif de cette seconde partie a donc été de mettre en évidence le pouvoir prédictif du GDF-15 en tant que biomarqueur circulant dans la survenue de complications rénales au cours de la chirurgie cardiaque sous CEC. Nous avons mis en évidence que les patients présentant des taux préopératoires élevés de GDF-15 sont à risque de développer une insuffisance rénale aiguë postopératoire.

### **Mots clés :**

Biomarqueur, chirurgie cardiaque, circulation extracorporelle, GDF-15, inflammation, insuffisance rénale aiguë, stratification du risque