Etude de la ventilation liquide totale hypothermisante sur le syndrome post-arrêt cardiaque chez le lapin

Lys Darbera

▶ **To cite this version:**

Lys Darbera. Etude de la ventilation liquide totale hypothermisante sur le syndrome post-arrêt cardiaque chez le lapin. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2013. Français. NNT : 2013PEST0105 . tel-01139335

HAL Id: tel-01139335

https://theses.hal.science/tel-01139335

Submitted on 4 Apr 2015

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-EST

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE ET PHARMACOLOGIE

ANNÉE : 2013

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 29 novembre 2013

À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE

FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-EST-CRÉTEIL

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-EST

par

Lys DARBÉRA

ÉTUDE DE LA VENTILATION LIQUIDE TOTALE HYPOTHERMISANTE SUR LE SYNDROME POST-ARRET CARDIAQUE CHEZ LE LAPIN

JURY :

Mr. le Pr A. BERDEAUX	Président du jury
Mr. le Pr A. CARIOU	Rapporteur
Mr. le Pr J. DURANTEAU	Rapporteur
Mme le Pr P. JABRE	Examinateur
Mr. le Pr J-L. DUBOIS-RANDÉ	Examinateur
Mr. le Pr P. CARLI	Examinateur
Mr. le Dr R. TISSIER	Directeur de thèse

SOMMAIRE

Sommaire **2**

Table des illustrations **4**

PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE **7**

I. Physiopathologie de l'arrêt cardiaque **10**

A. Définitions et importance clinique 10
B. Anomalies cellulaires au cours de l'ischémie-reperfusion 13
C. Importance de la défaillance cardio-circulatoire 17
D. Particularité de l'atteinte neurologique 20
E. Dysfonction multiviscérale et syndrome « *sepsis-like* » 21
F. Stratégies thérapeutiques lors du syndrome post arrêt cardiaque 23

II. L'hypothermie thérapeutique **30**

A. Rappels sur la thermorégulation 30
B. Définitions de l'hypothermie 32
C. Conséquences de l'hypothermie contrôlée 33
D. L'hypothermie thérapeutique 33
E. Mécanismes d'action de l'hypothermie 48

III. La ventilation liquide **56**

A. Historique 56
B. Techniques de ventilation liquide 57
C. Propriétés physico-chimiques des PFC 58
D. Le PFC et le respirateur liquidien idéaux 60
E. Applications médicales 61

DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE 69

I. Objectifs de la thèse 70

II. Matériel et méthodes 71

A. Conditions générales des expériences 71
B. Modèle d'infarctus du myocarde 71
C. Modèle d'arrêt cardiaque sur cœur « sain » 76
D. Modèle d'arrêt cardiaque sur cœur ischémique 80
E. Procédure de ventilation liquide totale 82
F. Analyses histologiques 83
G. Analyses statistiques 83

III. Résultats 85

A. Etude du mécanisme cardioprotecteur de l'hypothermie. 85
B. Effet de la ventilation liquide totale sur la déficience neurologique post-arrêt cardiaque 93
C. Effet de la ventilation liquide totale sur la défaillance hémodynamique post-arrêt cardiaque 103

IV. Discussion générale 113

CONCLUSION 118

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 119

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Temps approximatif d'apparition des lésions irréversibles consécutives à une anoxie tissulaire en fonction des organes. 13
Figure 2 : Principaux échangeurs ioniques impliqués dans l'apparition d'une surcharge calcique et sodique intracellulaire au cours d'un épisode d'ischémie-reperfusion. 14
Figure 3 : Schéma simplifié des voies de signalisations intracellulaires impliquées dans l'apoptose par l'activation des caspases 16
Figure 4 : Représentation schématique résumant les différents mécanismes intervenant dans le développement du no-reflow et des modifications ultrastructurales du lit microvasculaire. D'après Reffelmann et al. [43] 19
Figure 5 : Évolution des concentrations sanguines d'IL-6 chez des patients survivants et non survivants après un arrêt cardiaque. Adapté d'après [52]. 22
Figure 6 : Coupes histologiques de cerveaux de porcs soumis à 4 minutes d'arrêt cardiaque asphyxique (agrandissement x 200). (Adapté d'après [71]). 26
Figure 7 : Dérivée de la pression ventriculaire gauche en fonction du temps (dP/dt) maximale (A) et minimale (B) dans différents groupes expérimentaux de lapins soumis à un arrêt cardiaque asphyxique de 15 minutes. (Adapté d'après [84]) 28
Figure 8 : Enregistrement type de l'expérience visant à évaluer la capacité de rétention calcique mitochondriale *in vitro* de prélèvements de myocarde de lapins soumis à un arrêt cardiaque de 15 min. (Adapté d'après [1]).
Figure 9 : Représentation schématique de l'énergie dépensée pour la thermorégulation en fonction de la température ambiante chez les homéothermes. 30
Figure 10 : Relation entre la réduction de la taille d'infarctus permise par une hypothermie modérée (32°C) et le moment d'instauration de cette hypothermie au cours d'une ischémie myocardique expérimentale. 37
Figure 11 : Illustration du système de refroidissement Arctic Sun®. 45
Figure 12 : Illustration du système de refroidissement endovasculaire par l'application d'une thermode dans la veine fémorale (Alsius, Irvine, CA, USA). 46
Figure 13 : Formule chimique développée d'un perfluorocarbone, le perfluorooctane. 47
Figure 14 : Illustration schématique du mode de fonctionnement du système Rhinochill©. . 48

Figure 15 : Comparaison des niveaux d'expression cérébrale de différentes cytokines pro-inflammatoires chez des porcs soumis à un arrêt cardiaque de 7 min en conditions normotherme ou hypotherme. (Adapté d'après [198]) 51
Figure 16 : Photographie d'une souris totalement immergée dans un perfluorocarbone au-dessus duquel nagent des poissons dans de l'eau. 57
Figure 17 : Représentation schématique du mode de fonctionnement de la ventilation liquide totale (A) et de la ventilation liquide partielle (B) 58
Figure 18 : Représentation schématique du phénomène de « *trapping* »..... 60
Figure 19 : Prototype de ventilateur liquidien INOLIVENT®. 61
Figure 20 : Pourcentage d'obtention d'une RACS dans les différents groupes expérimentaux de porcs soumis à 11 minutes d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire, sous ventilation gazeuse (Témoin) ou liquide normotherme ou hypotherme (respectivement VLT-normo et VLT-hypo). Adapté d'après [289]. 66
Figure 21 : Pourcentage d'obtention d'une RACS dans les différents groupes expérimentaux de porcs soumis à 11 minutes d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire en conditions Témoin ou avec une hypothermie induite par ventilation liquide totale (VLT) ou par une perfusion d'une solution de NaCl à 4°C (NaCl) à partir de la 8ème minute d'arrêt cardiaque, (Adapté d'après [168]). 67
Figure 22 : Schéma illustrant la localisation du lasso d'occlusion coronaire autour d'une artère coronaire gauche d'un cœur de lapin. 72
Figure 23 : Représentation schématique du protocole chirurgical d'occlusion-reperfusion coronaire. 73
Figure 24 : Analyse post-mortem pour la détermination des tailles de l'aire à risque et de l'infarctus 75
Figure 25 : Photographie sous lumière normale (à gauche) et sous lumière UV (à droite) d'une coupe transversale de ventricule gauche provenant d'un lapin soumis à une occlusion-reperfusion coronaire après administration dans l'atrium gauche de thioflavine S. 76
Figure 26 : Représentation schématique de l'instrumentation chirurgicale des animaux. 80
Figure 27 : Schéma illustrant le prototype de ventilateur liquide total. 82
Figure 28 : Protocole expérimental 87
Figure 29 : Tailles d'infarctus exprimées en pourcentage de l'aire à risque dans les différents groupes expérimentaux 90
Figure 30 : Tailles du *no-reflow* exprimées en pourcentage de l'infarctus dans les différents groupes expérimentaux 90

Figure 31: Protocole expérimental 95
Figure 32 : Températures oesophagienne, tympanique et rectale au cours du protocole expérimental 97
Figure 33 : Panneaux A et B, scores de dysfonction neurologique dans les différents groupes expérimentaux respectivement soumis à 5 ou 10 min d'arrêt cardiaque dans les jours suivant l'arrêt cardiaque. Panneaux C et D, courbes de survie de Kaplan-Meyer dans les différents groupes expérimentaux soumis respectivement à 5 min ou 10 min d'arrêt cardiaque, chez les animaux réanimés avec succès après l'arrêt cardiaque 100
Figure 34 : pH sanguin, pCO_2 et pO_2 sanguines dans les différents groupes expérimentaux 101
Figure 35 : Protocole expérimental 104
Figure 36 : Températures corporelles 105
Figure 37 : Pourcentage de survie et causes de mort 106
Figure 38 : Paramètres hémodynamiques 108
Figure 39 : Tailles d'infarctus et scores de nécrose en dehors de l'aire à risque 110
Figure 40 : Scores de dysfonction neurologique 111
Figure 41 : Histologie cérébrale. 111

Tableau 1 : Étiologie générale des arrêts cardiaques extra-hospitaliers (d'après 11). 11
Tableau 2 : Résumé des résultats de plusieurs études expérimentales ayant évalué l'effet réducteur de la taille de l'infarctus d'un refroidissement cardiaque débuté au cours d'une occlusion coronaire (OC) chez des animaux de laboratoire 36
Tableau 3 : Résumé des résultats de plusieurs études expérimentales ayant évalué l'effet réducteur de la taille de l'infarctus d'un refroidissement cardiaque débuté au cours de la reperfusion coronaire (RC) chez l'animal de laboratoire 38
Tableau 4 : Résumé de plusieurs études expérimentales étudiant l'effet neuroprotecteur d'un refroidissement systémique avant, pendant et après une réanimation cardiopulmonaire (RCP) d'un arrêt cardiaque (AC) 43
Tableau 5 : Résumé de plusieurs études expérimentales récentes étudiant le mécanisme cardioprotecteur de l'hypothermie (>30°C) dans des modèles expérimentaux d'ischémie myocardique. (Adapté d'après [69]). 53
Tableau 6 : Propriétés physico-chimiques de différents PFC par rapport à l'eau. 59
Tableau 7 : Grille d'évaluation neurologique chez le lapin [293]. 79
Tableau 8 : Analyse de la fonction cardiaque 109

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Chaque année, l'arrêt cardiaque extra-hospitalier, plus communément appelé mort subite, est responsable de plus de 40 000 décès en France. Le plus souvent, cela constitue l'ultime complication d'un infarctus du myocarde ou d'autres maladies cardiovasculaires. Le développement des méthodes de réanimation cardio-pulmonaire (RCP), leur diffusion publique et l'amélioration de la prise en charge pré-hospitalière (« chaîne de survie ») ont permis une forte augmentation du pourcentage de patients réanimés après un arrêt cardiaque depuis une trentaine d'années. Malheureusement, la reprise d'une activité circulatoire spontanée ne constitue que la première étape de cette prise en charge et la majorité des patients décèdent dans les jours suivants de défaillances multiviscérales regroupées sous le nom de « syndrome post-arrêt cardiaque » [2]. Seule une minorité de patients peut i fine survivire et sortirt de l'hôpital après une bonne récupération neurologique. Depuis de nombreuses années, les chercheurs tentent donc de découvrir des stratégies cardioprotectrices et neuroprotectrices dont l'application permettrait d'améliorer le pronostic de ces patients.

Parmi les stratégies proposées, l'hypothermie thérapeutique et la revascularisation coronaire (en cas d'infarctus du myocarde sous-jacent) sont les seules à avoir clairement montré leur aptitude à améliorer le pronostic des patients [3]. L'hypothermie thérapeutique consiste à abaisser la température corporelle des patients jusqu'à 32-34°C pendant 24 à 36 heures [4]. Cela est aujourd'hui largement recommandé par les sociétés savantes au décours d'un arrêt cardiaque [4, 5]. Un enjeu majeur de la recherche sur l'hypothermie est actuellement d'en comprendre et d'en maîtriser les mécanismes d'action protecteurs afin de pouvoir les mimer pharmacologiquement. Par ailleurs, les travaux expérimentaux sur l'hypothermie thérapeutique ont montré que l'ampleur du bénéfice dépendait surtout de sa rapidité d'instauration [6]. Un enjeu majeur de la recherche dans ce domaine est donc de développer des approches hypothermisantes permettant un refroidissement très rapide de l'organisme.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressé à une procédure expérimentale capable de fournir un refroidissement corporel très rapide. Il s'agit de la « ventilation liquide totale » (VLT) par des liquides aux propriétés physico-chimiques particulières, les perfluorocarbones. Ces liquides sont instillés dans les poumons à l'aide d'un respirateur spécifique adapté à la « ventilation liquidienne ». L'équipe de recherche dans

laquelle j'ai effectué cette thèse avait déjà apporté la preuve de concept de l'intérêt de cette stratégie hypothermisante dans la protection contre l'infarctus du myocarde chez le lapin [7]. Dans ce travail de thèse, nous avons dans un premier temps étudié les mécanismes cardioprotecteurs de la VLT hypothermisante dans un modèle identique chez le lapin. Parallèlement, j'ai pu participer à un travail correspondant à une autre thèse en cours dans notre équipe de recherche. Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de la VLT au décours d'un arrêt cardiaque provoqué par l'induction d'une fibrillation ventriculaire sur des cœurs « sains ». Cela aboutissait à une puissante neuroprotection associée à une augmentation de la survie chez les lapins soumis à la VLT hypothermisante. Dans un second temps, nous avons étudié l'effet de la VLT hypothermisante dans une situation alliant une défaillance cardiaque et une déficience neurologique sur cœur « ischémique », et non plus sur cœur sain, chez des lapins chroniquement instrumentés. Cette dernière étude a constitué la plus grande partie de notre travail de thèse.

I. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ARRET CARDIAQUE

A. Définitions et importance clinique

1. Définitions

L'arrêt cardiaque extra-hospitalier, aussi appelé mort subite, se caractérise par la cessation brutale de la circulation sanguine causée par des battements cardiaques inefficaces ou absents. Dans près de 50% des cas, le rythme cardiaque sous-jacent est une fibrillation ventriculaire [8]. Les autres rythmes rencontrés sont l'asystolie, qui peut aussi être l'évolution naturelle d'une fibrillation ventriculaire, et la dissociation électro-mécanique. Au moment de l'arrêt cardiaque, la victime s'effondre inconsciente et la respiration cesse. Cela induit une anoxo-ischémie généralisée au cours de laquelle l'ensemble des cellules de l'organisme souffrent de la disparition de l'apport en oxygène.

2. Épidémiologie

Avec une incidence annuelle de 0,91‰ à 1,89‰ aux Etats-Unis [9] et environ 0,37‰ en Europe [10], l'arrêt cardiaque extra-hospitalier est un problème majeur de santé publique. En France, cela est responsable d'environ 35-40 000 décès par an selon le Centre d'Expertise Mort Subite de Paris (données non publiées). Moins de 10% des patients ayant présenté un arrêt cardiaque extra-hospitalier peuvent être réanimés et sortir de l'hôpital avec peu ou pas de séquelles neurologiques [11]. Parmi les nombreux facteurs de risque d'arrêt cardiaque, certains ne peuvent pas être contrôlés comme l'âge et le sexe. Les hommes sont plus touchés que les femmes et les personnes âgées sont plus susceptibles que les jeunes. D'autres peuvent être maîtrisés par un changement de comportement ou un traitement médical comme le tabac, l'hypertension, le cholestérol, le diabète sucré et l'obésité.

3. Étiologie

Comme le montre le Tableau 1, plus de 80% des arrêts cardiaques ont pour cause une pathologie cardiaque sous-jacente [12]. Parmi les affections cardiaques pouvant provoquer la mort subite, l'infarctus du myocarde représente plus de 60% des cas [13]. Les causes non cardiaques peuvent être un traumatisme, une asphyxie, une intoxication, une noyade ou une électrocution.

Cause de l'arrêt cardiaque	N (%) (n=21 175)	N (%) (n=21 175)
Pathologie cardiaque	17 451 (82,4)	17 451 (82,4)
Pathologie interne d'origine non cardiaque	1814 (8,6)	
Pathologies pulmonaires		901 (4,3)
Pathologies cerebrovasculaires		457 (2,2)
Cancers		190 (0,9)
Hémorragies gastrointestinales		71 (0,3)
Obstétrique / pédiatrique		50 (0,2)
Embolie pulmonaire		38 (0,2)
Epilepsie		36 (0,2)
Diabète sucré		30 (0,1)
Pathologie rénale		23 (0,1)
Autres pathologies internes		18 (0,1)
Pathologie externe d'origine non cardiaque	1910 (9,0)	
Traumatisme		657 (3,1)
Asphyxie		465 (2,2)
Surdosage médicamenteux		411 (1,9)
Noyade		105 (0,5)
Choc électrique / foudre		28 (0,1)
Autres suicides		194 (0,9)
Autres pathologies externes		50 (0,2)

Tableau 1 : Etiologie générale des arrêts cardiaques extra-hospitaliers (d'après [12]).

4. Les bases de la réanimation cardio-pulmonaire

Au cours d'un arrêt cardiaque, les chances de survie baissent chaque minute de 10 % en l'absence de réanimation, et de 3 à 4 % si une réanimation est entreprise. Le pronostic dépend essentiellement de la rapidité de la prise en charge et de la réalisation des gestes efficaces de réanimation. La présence de la famille du patient au moment de la réanimation cardiopulmonaire n'affecte pas son efficacité [14].

La « chaine de survie » introduite en 1990 par l'American Heart Association a décrit dans un ordre précis les gestes à accomplir pour améliorer les chances de survie des victimes d'arrêt cardiaque [15]. Le plus important est d'abord d'alerter les services d'urgence et d'entreprendre un massage cardiaque en attendant leur intervention. En cas d'arrêt cardiaque « choquable » (fibrillation ventriculaire), il faut ensuite procéder le plus rapidement possible à une défibrillation. Il s'agit d'une décharge électrique qui permet au cœur de retrouver un rythme organisé. En cas d'arrêt cardiaque « non choquable » (asystolie et dissociation électro-mécanique), le choc électrique est inutile et seul le massage cardiaque et l'administration d'agents vasopresseurs peuvent faire « repartir » le cœur.

La recherche expérimentale et clinique dans le domaine de la réanimation cardio-pulmonaire a permis l'élaboration de recommandations internationales (« *guidelines* ») indiquant la démarche thérapeutique à adopter en cas d'arrêt cardiaque extra-hospitalier [16, 17]. Cette prise en charge se divise en trois phases : la réanimation cardio-pulmonaire de base (*basic life support* ou BLS) qui correspond à la prise en charge immédiate par les témoins de l'accident sans support médical, puis la réanimation avancée (*advanced life support* ou ALS) correspondant à la prise en charge médicalisée pré-hospitalière et enfin les soins post-arrêt cardiaque qui s'imposent après la reprise d'une activité circulatoire spontanée (RACS).

5. Le syndrome post-arrêt cardiaque

Une fois les patients réanimés d'un arrêt cardiaque, ils restent le plus souvent dans un état comateux et souffrent de lésions sévères qui sont les conséquences de l'interruption circulatoire globale. Dans les années 1970, le Dr Vladimir Negovsky a décrit l'ensemble des symptômes généraux pouvant être observés après un arrêt cardiaque sous le terme de « pathologie post-ressuscitation » [18] : hypotension, hyperthermie, défaillance multiviscérale et neurologique. Depuis 2008, cette entité clinique complexe a été renommée « syndrome post-arrêt cardiaque » selon les recommandations de l'International Liaison Commitee On Resuscitation (ILCOR) [2]. La sévérité de ce syndrome dépend du déroulement de la réanimation (durée, nombre de chocs électriques, doses d'adrénaline nécessaires), de l'étiologie de l'arrêt cardiaque mais aussi des conditions générales de santé du patient avant l'arrêt [2, 19]. La majorité des dommages sont initiés lors de la phase de « *no-flow* » qui correspond à l'absence totale de flux sanguin durant l'arrêt cardiaque proprement dit. Ces lésions s'aggravent et se propagent pendant la phase de « *low-flow* » qui correspond à la restauration artificielle d'un flux sanguin par le massage cardiaque. D'une manière générale, cela représente donc une situation d'ischémie-reperfusion généralisée à l'ensemble de l'organisme, aboutissant à une inflammation systémique s'apparentant cliniquement et biologiquement à un choc septique et entraînant la défaillance de plusieurs organes avec une chronologie dépendant de la susceptibilité des différents organes à l'ischémie. Une atteinte neurologique et une défaillance cardiaque dominent dans tous les cas le tableau clinique. La mortalité précoce est ainsi souvent la conséquence de l'instabilité hémodynamique. Chez les patients qui survivent à cette phase aigüe, c'est le pronostic neurologique qui est responsable d'une deuxième vague de décès plus tardive [20]. Dans les paragraphes suivants, nous allons

décrire plus en détail la physiopathologie des lésions induites par un arrêt cardiaque, tout d'abord à l'échelle cellulaire puis à l'échelle des principaux organes.

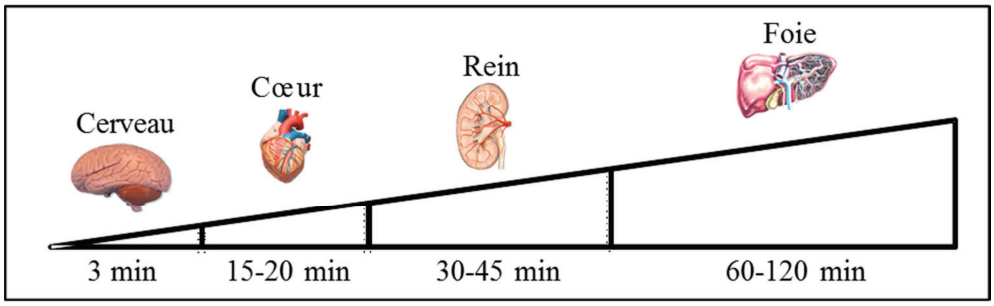

Figure 1 : Temps approximatif d'apparition des lésions irréversibles consécutives à une anoxie tissulaire en fonction des organes.

B. Anomalies cellulaires au cours de l'ischémie-reperfusion

Pendant l'arrêt cardiaque, la cessation de la perfusion sanguine (*no-flow*) entraîne l'arrêt de l'approvisionnement des cellules en oxygène. La respiration mitochondriale à l'origine de la production d'adénosine tri-phosphate (ATP) ne peut donc plus s'effectuer. Le métabolisme cellulaire dévie alors vers la voie anaérobie qui permet de produire, à partir d'une molécule de glucose, 3 molécules d'ATP et une d'acide lactique. Cependant, le rendement énergétique de cet ensemble de réactions est relativement faible (3 ATP contre 36 dans la respiration mitochondriale) [21] et la consommation des substrats conduit rapidement à une déplétion énergétique dans tous les tissus. Des études expérimentales ont montré chez l'animal que trois minutes d'arrêt circulatoire suffisent à engendrer une diminution de 88% des concentrations initiales en ATP dans le cœur et le cerveau [22, 23]. L'accumulation d'acide lactique par mise en route du métabolisme anaérobie entraîne secondairement une diminution du pH. Cette acidose et la chute des concentrations en ATP bouleversent l'homéostasie cellulaire.

Durant l'ischémie, l'accumulation d'ions H^+ du fait de la baisse de pH est compensée par l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ [24] qui entraîne une augmentation du sodium intracellulaire aggravée par l'arrêt de fonctionnement de la pompe ATPasique Na^+/K^+. La surcharge sodique active alors l'échangeur Na^+/Ca^{2+} qui tend à éliminer du sodium de la cellule au profit d'une surcharge calcique [25]. Cette surcharge calcique est de surcroît aggravée par l'arrêt de fonctionnement des pompes ATPasiques calciques. Cette accumulation de calcium intracellulaire engendre un déséquilibre osmotique à l'origine d'une turgescence cellulaire. À

l'échelle de l'organisme, ce gonflement tissulaire peut entraîner une hypoperfusion par compression des tissus alentours [26] lors de la reperfusion par massage cardiaque puis par reprise d'une activité contractile cardiaque spontanée.

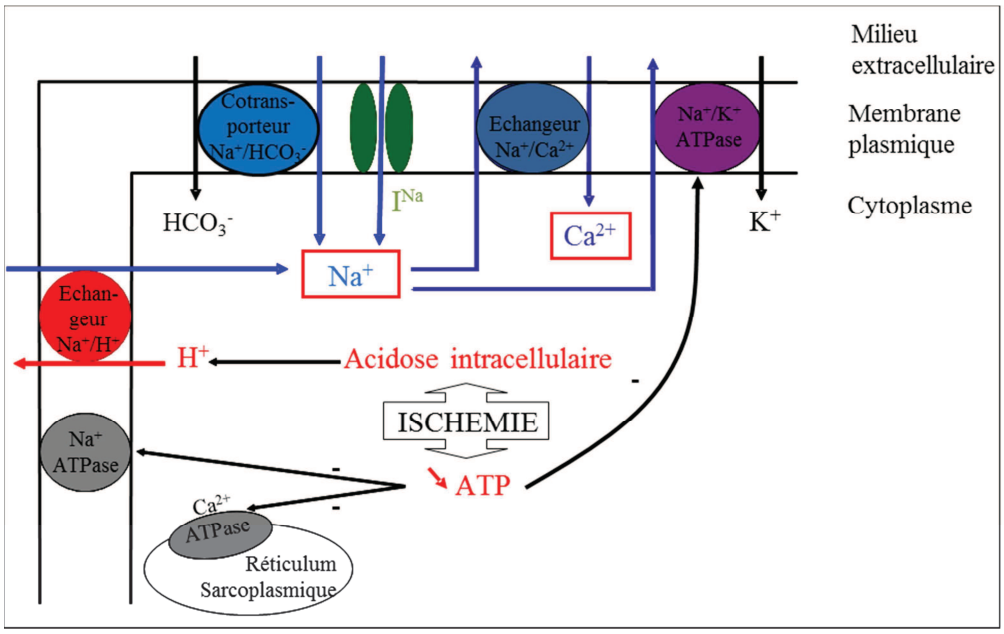

Figure 2 : Principaux échangeurs ioniques impliqués dans l'apparition d'une surcharge calcique et sodique intracellulaire au cours d'un épisode d'ischémie-reperfusion.

Pendant la phase de bas débit (*low-flow*) induite par la réanimation et correspondant à la reperfusion, l'apport soudain et massif d'oxygène provoque une forte production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) à l'origine d'un stress oxydant défavorable à l'intégrité de la cellule et responsable de l'activation de voies de mort cellulaire [27]. Les ERO incriminés sont l'anion superoxyde ($O2^{\cdot-}$), le radical hydroxyl ($OH^{\cdot}$), le monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$) et le péroxyde d'hydrogène (H_2O_2), dont la production en conditions physiologiques est régulée par des défenses cellulaires anti-oxydantes que sont entre autres la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion péroxydase et la catalase. Lors de la reperfusion, ces systèmes de contrôle sont dépassés. De plus, leur activation est coûteuse en ATP et aggrave la déplétion énergétique initiée par l'anoxie [28]. Les ERO ainsi formées en excès entraînent la transcription de multiples cytokines pro-inflammatoires.

Les modifications biochimiques et ioniques intervenant dans la cellule provoquent l'ouverture du pore de perméabilité de transition mitochondrial (PPTm). Son ouverture est principalement provoquée par une augmentation de la concentration mitochondriale en

calcium, par la carence énergétique ou par la perte du potentiel membranaire de la mitochondrie [29]. Le stress oxydant, lui aussi, est à l'origine d'une ouverture du PPTm lors de la reperfusion, par l'intermédiaire de deux sites sensibles à l'oxydation (le site S et le site P). Il est généralement admis que le PPTm reste majoritairement fermé au cours de l'ischémie mais que, lors de la reperfusion, l'augmentation du calcium cytosolique et le stress oxydant entrainent une ouverture de ce pore qui joue alors un rôle crucial dans la physiopathologie menant à la mort cellulaire par nécrose, apoptose ou autophagie [30].

La mort par nécrose peut être causée par le gonflement de la cellule, lui-même consécutif aux phénomènes de surcharges ioniques. L'ouverture du PPTm provoque par ailleurs un effondrement du potentiel de membrane mitochondrial et la disparition du gradient de protons [31]. La chute du gradient de protons entraine une réversion du mode de fonctionnement de l'ATP synthétase mitochondriale qui hydrolyse alors l'ATP en ADP et accentue la déplétion énergétique. L'ouverture du PPTm est aussi à l'origine d'une entrée massive d'eau dans la mitochondrie causant un gonflement important de cet organite. La mort par nécrose survient lorsque cet œdème touche la plupart des mitochondries de la cellule.

La mort cellulaire par apoptose peut être activée par deux voies (Figure 3). La voie intrinsèque, d'une part et la voie extrinsèque d'autre part [32]. L'élévation de la concentration en calcium déclenche l'activation du BH3 *interacting domain death agonist* (Bid) qui, lors de sa fixation à la membrane mitochondriale, entraine l'ouverture du PPTm. La mitochondrie relargue alors dans le cytoplasme des facteurs pro-apoptotiques parmi lesquels *l'Apoptosis Inducing Factor* (AIF) ou encore le cytochrome c. Ce dernier est à l'origine de la formation d'un apoptosome activant la voie des caspases qui aboutit à la condensation de la chromatine et la fragmentation fine de l'ADN. L'AIF, quant à lui, déclenche l'apoptose sans passer par la voie des caspases, en causant une condensation périphérique de la chromatine associée à une fragmentation large de l'ADN. La voie intrinsèque de l'apoptose peut donc passer ou non par l'activation des caspases. La voie extrinsèque est induite par l'activation paracrine d'un récepteur « à domaine de mort », comme celui du *Tumor Necrosis Factor* (TNF). Ce récepteur active la voie des caspases (caspase 8 puis caspase 3) et aboutit à l'apoptose par les mêmes mécanismes que la voie intrinsèque [32]. La caspase 8 peut ensuite cliver Bid, à l'origine d'un relargage de cytochrome c par la mitochondrie, activant la caspase 9.

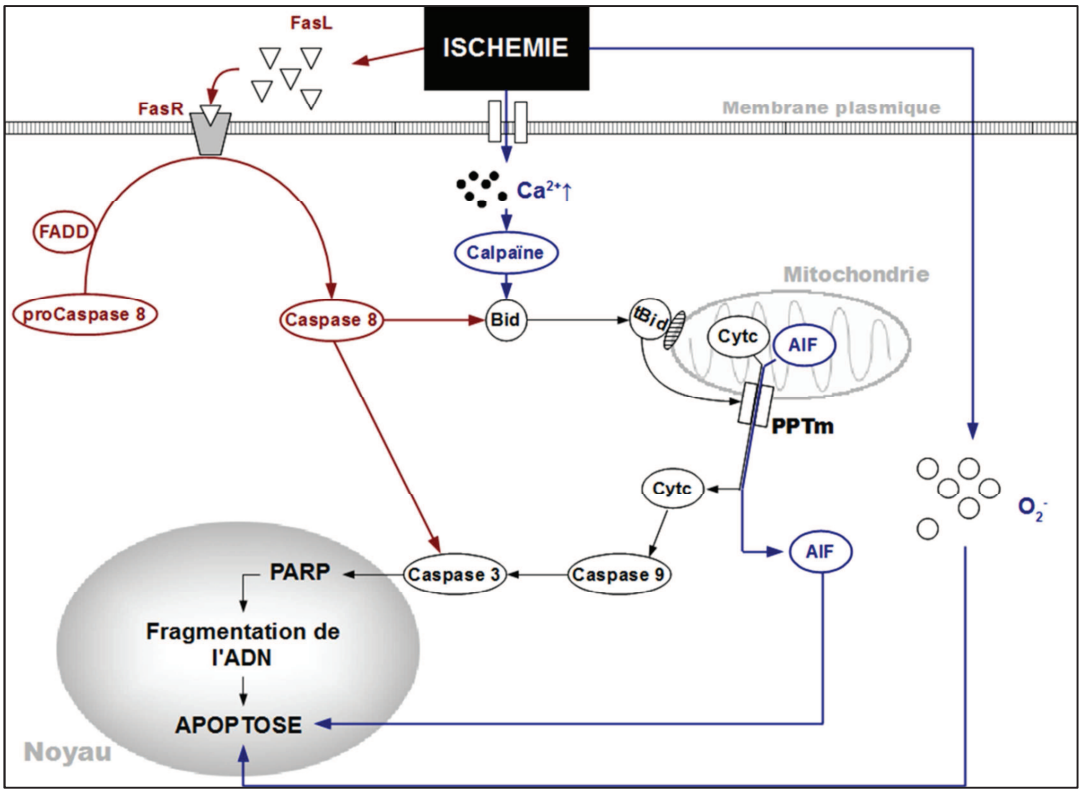

Figure 3 : Schéma simplifié des voies de signalisations intracellulaires impliquées dans l'apoptose par l'activation des caspases. *En bleu, les mécanismes spécifiques de la voie intrinsèque. En rouge, les mécanismes spécifiques de la voie extrinsèque. Les mécanismes en noirs sont ceux impliqués simultanément dans chacune des deux voies (modifié d'après [32]). AIF, Apoptosis Inducing Factor ; PPTm, pore de transition mitochondrial.*

Un autre mécanisme de mort cellulaire existe avec l'autophagie. Initialement, ce processus correspond au recyclage des protéines ou des organites endommagés ou déficients [33]. Ainsi, l'autophagie semble être un processus plutôt impliqué dans la survie que dans la mort cellulaire, bien que l'autophagie incontrôlée soit à l'origine de la destruction des cellules [34]. Un autophagosome enveloppe complètement l'organite endommagé avant sa fusion avec un lysosome et sa destruction. L'inactivation de la protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*) par le stress joue un rôle initiateur dans ce processus [30]. Dans le cas particulier de l'ischémie-reperfusion, l'autophagie est déclenchée par la privation de nutriments et l'hypoxie. Cela entraine une importante lyse cellulaire.

Récemment, un autre processus de mort cellulaire a été décrit par Andrabi et al. dans les neurones [35]. Il s'agit du phénomène de « parpthanatos ». Physiologiquement, il s'agit d'un mécanisme de réparation de l'ADN qui est suractivé dans les situations pathologiques. La poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) suractivée conduit à une forte production de

poly(ADP-ribose) (PAR) provoquant la translocation nucléaire de AIF. Ce dernier provoque la fragmentation de l'ADN par une voie indépendante des caspases.

A l'échelle de l'organe, ces bouleversements cellulaires conduisent à l'apparition de séquelles pouvant provoquer la mort du patient.

C. Importance de la défaillance cardio-circulatoire

1. Arythmies

Dans les cellules excitables du myocarde, les dérèglements de l'homéostasie ionique et la perte de stabilité du potentiel de membrane entraînent un risque accru de troubles du rythme responsables de presque un tiers des décès relatifs à une dysfonction hémodynamique post-arrêt cardiaque [36]. Ces arythmies sont le résultat d'altérations locales de la conduction de l'influx électrique entraînant des circuits de réentrée et des troubles de l'excitabilité. Un autre mécanisme incriminé est l'ouverture des canaux potassiques K_{ATP} par la déplétion cellulaire en ATP [37]. Il en résulte un raccourcissement des potentiels d'action et des troubles du rythme ventriculaire.

2. Sidération myocardique

Après les travaux de Heyndrickx et al. [38], Braunwald et Kloner ont défini en 1992 le concept de sidération myocardique (« *myocardial stunning* ») comme étant une altération réversible de la contraction du myocarde au cours de la reperfusion, malgré une normalisation de la perfusion coronaire et l'absence de nécrose cellulaire [39]. Les patients réanimés d'un arrêt cardiaque présentent donc nécessairement une dysfonction myocardique à la fois systolique et diastolique, et ceci quelle que soit la cause de l'arrêt cardiaque [40, 41]. Les manifestations hémodynamiques de la sidération sont un effondrement de l'index cardiaque avec une réduction de la fraction d'éjection ventriculaire et un débit cardiaque faible [42]. Cette défaillance cardiaque est réversible entre 48 et 72 heures après la réanimation. À titre d'exemple, Kern et al. ont montré dans un modèle porcin d'arrêt cardiaque qu'une sidération myocardique apparaîssait après la réanimation et se caractérisait par une fraction d'éjection diminuée de plus de la moitié de sa valeur pré-ischémique [43]. Cela était associé à une élévation de la pression télédiastolique ventriculaire gauche de 8 à 20 mmHg. Dans cette étude, ces anomalies ont totalement disparu après 24 à 48 heures. Le myocarde sidéré répond

par ailleurs à l'usage d'agents pharmacologiques inotropes positifs comme l'adrénaline, la dobutamine et la noradrénaline [42], traduisant l'existence d'une réserve de contractilité.

3. Composante vasculaire et no-reflow

Malgré le caractère rapidement réversible du phénomène de sidération myocardique, l'administration d'agents vasopresseurs et le remplissage vasculaire restent souvent nécessaires pendant plus de 72 heures chez les patients réanimés d'un arrêt cardiaque. Cela traduit une composante vasculaire [42] en conséquence directe du phénomène d'inflammation systémique induit par l'ischémie-reperfusion généralisée. Ainsi, des altérations vasculaires liées à l'inflammation entretiennent la défaillance hémodynamique par le biais d'anomalies microcirculatoires.

Le phénomène de *no-reflow*, décrit pour la première fois par Majno et al. dans l'ischémie cérébrale, correspond à une altération persistante de la microcirculation en dépit de la reprise de la circulation macroscopique [44]. Ce phénomène a également été décrit dans d'autres organes comme la peau, le muscle squelettique, le rein et surtout le cœur. En fait, dans le cas de l'arrêt cardiaque, ce phénomène peut se produire dans tous les tissus et organes. Il s'agit de zones à très faible débit de perfusion causé par une obstruction des capillaires. Comme l'illustre la Figure 4, cette obstruction s'explique d'une part par l'œdème tissulaire environnant qui comprime les microvaisseaux [45] et d'autre part par l'œdème du vaisseau lui-même dans les cellules endothéliales. Ces œdèmes sont le résultat des perturbations ioniques intracellulaires intervenant lors de la période ischémique et engendrent une réduction de la lumière microvasculaire pouvant aller jusqu'à l'oblitération totale. C'est également au cours de la période ischémique que l'accumulation de cellules inflammatoires et la production d'ERO induisent une dysfonction endothéliale qui contribue à entretenir et aggraver ce phénomène de *no-reflow*. En effet, celui-ci arrive de façon progressive au cours du temps. Ainsi, dans un modèle d'occlusion-reperfusion du myocarde chez le chien, Ambrosio et al. ont montré que le *no-reflow* était trois fois plus étendu après trois heures de reperfusion qu'après 2 minutes de reperfusion [46].

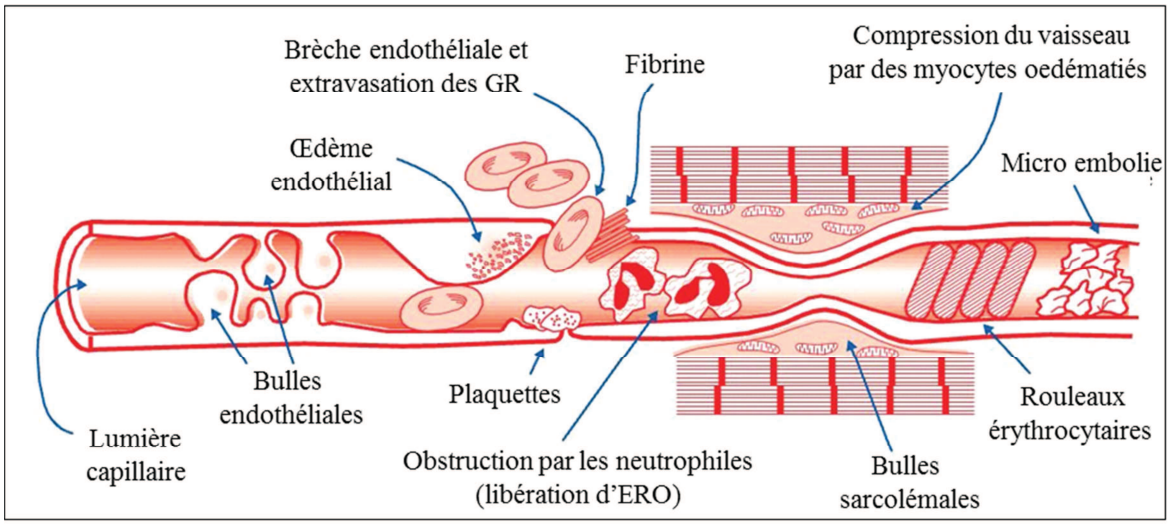

Figure 4 : Représentation schématique résumant les différents mécanismes intervenant dans le développement du no-reflow et des modifications ultrastructurales du lit microvasculaire. D'après Reffelmann et al. [45]. *GR, globules rouges ; ERO, espèces réactives de l'oxygène.*

4. Infarctus du myocarde

Dans le cœur, le phénomène de *no-reflow* est souvent associé à l'apparition d'un infarctus du myocarde par mort des cardiomyocytes. Les territoires concernés sont hypokinétiques et responsables d'une altération de la fonction cardiaque. Ces lésions sont irréversibles et la taille des zones touchées conditionne l'ampleur de la perte de fonction cardiaque et l'apparition ultérieure d'une insuffisance cardiaque. Des stratégies cardioprotectrices limitant la nécrose cellulaire, telles que la revascularisation coronaire, peuvent ainsi améliorer la fonction cardiaque [47]. A titre d'exemple, l'administration d'angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) a récemment montré un effet réducteur sur les zones d'infarctus et de *no-reflow* dans des modèles d'infarctus du myocarde chez la souris et le lapin [48]. Dans cette étude, les conséquences de l'épisode d'ischémie-reperfusion myocardique telles que l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'œdème, le *no-reflow*, l'hémorragie et l'infarctus étaient d'une part majorées chez les souris déficientes pour ANGPTL4 et d'autre part réduites par l'administration de la protéine recombinante.

D. Particularité de l'atteinte neurologique

1. Particularités de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale

Dans le cerveau comme dans les autres tissus, les perturbations ioniques per ischémiques et l'accumulation de déchets métaboliques induisent un œdème intracellulaire. Il s'y ajoute un œdème d'origine vasogénique par la perte d'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) lors de la reperfusion. Cet œdème cérébral ainsi que la migration de cellules inflammatoires augmentent la pression intracrânienne et diminuent la perfusion cérébrale, amplifiant la dysfonction neurologique.

Il existe un autre phénomène particulier aux tissus nerveux appelé excitotoxicité. Les perturbations ioniques neuronales entraînent en effet une dépolarisation à l'origine de la libération de neurotransmetteurs excitateurs. Le principal neurotransmetteur incriminé dans ce phénomène d'excitotoxicité est le glutamate qui est libéré de façon massive lors d'une ischémie cérébrale [49]. Sa recapture post-synaptique est inhibée par la diminution du gradient de concentration sodique nécessaire à l'entrée passive du glutamate dans la cellule [26]. L'accumulation de glutamate extracellulaire active les récepteurs membranaires N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate (AMPA) [32], à l'origine d'une entrée supplémentaire de Na^+ et de Ca^{2+}. Cette augmentation de la surcharge ionique en Na^+ et en Ca^{2+} participe à l'induction d'une nécrose des cellules ou d'un appel d'eau supplémentaire aggravant l'œdème cérébral.

2. Effets hémodynamiques cérébraux

Lors de la reperfusion, des altérations hémodynamiques régionales sont observées dans le cerveau malgré une pression de perfusion cérébrale normale. Des zones de *no-reflow* apparaissent et induisent des petits infarctus cérébraux [50]. De façon paradoxale, ces défauts de perfusion microcirculatoire s'accompagnent généralement d'une hyperémie macroscopique transitoire dans les premiers instants suivant la reperfusion [51]. Cela aggrave l'œdème cérébral et les phénomènes de *no-reflow* secondaires. Après cette phase hyperémique, on observe une diminution du débit sanguin cérébral accompagnée d'une augmentation des résistances vasculaires cérébrales. De façon concomitante, une réduction de l'extraction en oxygène est observée. Cette phase est transitoire puisqu'après 72 heures le débit cérébral ainsi que l'extraction du tissu cérébral en oxygène sont rétablis [52]. Chez les

patients qui décèdent d'une dysfonction neurologique grave après arrêt cardiaque, ce découplage entre débit et extraction ne se rétablit pas et empire même parfois avec une perfusion cérébrale « de luxe ». Ces effets hémodynamiques cérébraux seraient dus à la perte de l'autorégulation des flux sanguins cérébraux [53] conduisant à des zones hypoperfusées et d'autres hyperperfusées.

E. Dysfonction multiviscérale et syndrome « *sepsis-like* »

1. Réponse inflammatoire systémique

La formation d'ERO et la libération de cytokines proinflammatoires survenant lors de la reperfusion conduisent à l'expression exagérée de molécules d'adhésion leucocytaire à la surface des cellules endothéliales, qui activent et attirent les polynucléaires neutrophiles [54]. Ces derniers sont à l'origine d'une production d'ERO supplémentaires et d'enzymes protéolytiques aggravant les dommages cellulaires [55]. Leur extravasation vers les tissus périphériques cause une perte de l'intégrité de l'endothélium vasculaire et entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire responsable de l'apparition de microthrombi. De plus, leur présence en grand nombre dans le compartiment vasculaire participe à l'encombrement de la lumière microvasculaire à l'origine de zones de *no-reflow* [56]. Une étude expérimentale de Niemann et al. a montré une augmentation du taux sanguin de *Tumor Necrosis Factor* α (TNF-α) après un arrêt cardiaque de 7 minutes par fibrillation ventriculaire chez le porc [57]. Cela était associé à une altération de la fonction cardiaque. En 2002, une étude clinique de Adrie et al. [58] a montré que les patients admis à l'hôpital après un arrêt cardiaque extra-hospitalier présentaient des taux sanguins de cytokines élevés par rapport à des volontaires sains. De plus, des taux élevés d'interleukine 6 (IL-6) et de TNF-α dans les deux premiers jours après l'arrêt cardiaque étaient des facteurs prédictifs de décès. Ces résultats ont été confirmés par une étude plus récente de Samborska et al. [59].

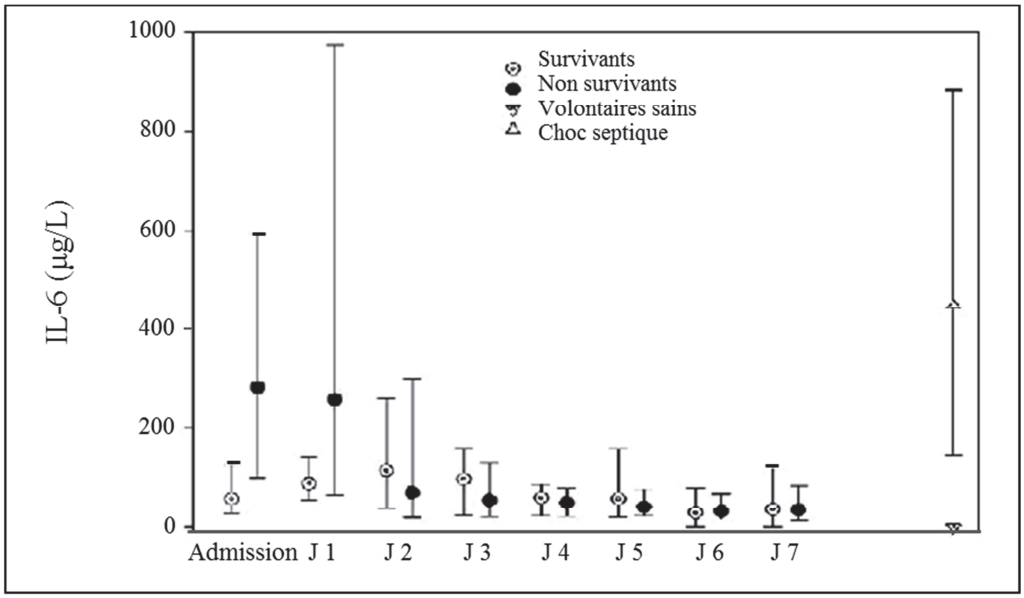

Figure 5 : Evolution des concentrations sanguines d'IL-6 chez des patients survivants et non survivants après un arrêt cardiaque. Adapté d'après [54].

Dans le tube digestif, des altérations de l'épithélium peuvent provoquer la translocation de bactéries et d'endotoxines dans le compartiment vasculaire [60], contribuant à donner une dimension multiviscérale à ce phénomène d'inflammation et ainsi une certaine similitude entre choc septique et syndrome post-arrêt cardiaque [58, 61].

2. Coagulopathie

Les cytokines proinflammatoires libérées au moment de la reperfusion sont associées à une activation des voies de la coagulation. Une élévation de la concentration plasmatique en thrombine activée est observée, provoquant l'activation du fibrinogène et l'agrégation plaquettaire [62]. Ces voies de la coagulation ne semblent pas compensées par l'activation de voies anticogulantes puisque l'antithrombine et les protéines C et S voient leurs concentrations diminuées [54]. La fibrinolyse n'est pas non plus activée en réponse à l'activité des voies de coagulation [63].

Ces troubles de la coagulation entraînent la formation de thrombi et d'infarctus disséminés aggravant les perturbations de la perfusion tissulaire.

3. Dysfonction surrénalienne

Une insuffisance surrénalienne est observée chez 42% des patients dans les suites d'un arrêt cardiaque [64]. La libération de cytokines proinflammatoires explique cette

insuffisance par une action inhibitrice directe sur la production de cortisol par les surrénales. Ces modifications d'activité de l'axe corticotrope entraînent des perturbations hémodynamiques responsables de la mort des patients dont les taux de cortisol sont les plus faibles après l'arrêt cardiaque [54].

F. Stratégies thérapeutiques lors du syndrome post arrêt cardiaque

Afin d'améliorer le pronostic vital et la récupération neurologique après un arrêt cardiaque, il est impératif de stabiliser l'état cardio-respiratoire des patients et de normaliser la perfusion tissulaire, notamment cérébrale. L'identification de la cause de l'arrêt et son traitement jouent également un rôle majeur dans l'amélioration du pronostic, ainsi que le traitement du syndrome post-arrêt cardiaque *stricto sensu*. Nous envisagerons ici deux axes principaux que sont le traitement de la défaillance cardio-circulatoire et la protection contre les lésions cérébrales. En effet, il a été montré que les lésions cérébrales consécutives à un arrêt cardiaque apparaissent de façon progressive au cours du temps et que cette progression ne s'arrête pas lors de la reperfusion. Cela explique les effets bénéfiques que peuvent avoir certaines stratégies neuroprotectrices débutées même relativement tardivement après la réanimation.

1. Traitement de l'état de choc hémodynamique

Dans deux études différentes, Laurent et al. [42], puis Sunde et al. [65] ont montré que le volume de fluide optimal pour stabiliser le statut hémodynamique des patients réanimés après un arrêt cardiaque était compris entre 3,5 et 6,5 litres au cours des 24 premières heures après l'arrêt cardiaque. L'utilisation d'agents inotropes et/ou vasopresseurs doit être envisagée si le remplissage vasculaire ne suffit pas à rectifier la fonction systolique myocardique. L'échocardiographie permet de mesurer la défaillance cardiaque et ainsi d'adapter le traitement [66]. Une combinaison de dobutamine et de noradrénaline peut être utilisée et leurs doses relatives varient selon les besoins. Toutefois, l'utilisation de substances inotropes augmente la consommation en oxygène du cœur et peut aggraver l'évolution des foyers ischémiques résiduels. Des techniques invasives peuvent être envisagées si la défaillance cardio-circulatoire est résistante à ces traitements de base. Ainsi, une assistance circulatoire

par ECMO (*extracorporal membrane oxygenation*) peut par exemple être envisagée dans l'attente d'une récupération [67]. Il s'agit d'une forme simplifiée de la dérivation cardio-pulmonaire (*cardio-pulmonary bypass*, CPB). Pour une assistance circulatoire, son implantation est de type artério-veineuse périphérique ou centrale. L'implantation centrale est très invasive puisqu'elle nécessite une sternotomie. Ces effets indésirables limitent l'utilisation de cette technique au décours d'un arrêt cardiaque. La pose d'un ballon à contrepulsion intra-aortique a aussi été proposée pour diminuer le travail cardiaque en diminuant la post-charge.

2. Traitement de la cause de l'arrêt cardiaque

Le traitement spécifique de l'arrêt cardiaque peut varier selon la cause supposée [2, 68]. La principale cause d'arrêt cardiaque extra-hospitalier étant l'infarctus du myocarde (dans plus de 60% des cas) [12], nous n'évoquerons ici que cette étiologie.

Lorsqu'il n'y a pas de cause extra-cardiaque évidente, une angiographie coronaire devrait être pratiquée de manière systématique [69]. Le traitement de référence dans le cas de l'infarctus du myocarde est la revascularisation mécanique par angioplastie percutanée. La revascularisation est alors associée à un meilleur pronostic vital et neurologique lorsqu'elle est appliquée de façon systématique [70]. Une alternative à cette intervention invasive pourrait théoriquement être la thrombolyse par des agents pharmacologiques, mais leur usage est remis en question car ils augmentent le risque d'hémorragie dans cette situation [71].

De nombreuses stratégies cardioprotectrices comme le postconditionnement ischémique ou pharmacologique ont été étudiées dans des modèles expérimentaux d'infarctus du myocarde afin d'optimiser et d'accroitre les bénéfices de la revascularisation. L'hypothermie thérapeutique à laquelle nous allons consacrer le prochain chapitre a également montré des résultats très encourageants dans l'infarctus du myocarde expérimental mais cette technique ne peut apporter un bénéfice que lorsqu'elle est mise en place très rapidement, c'est-à-dire avant la revascularisation coronaire [72].

3. Neuroprotection

Le caractère progressif de l'apparition des lésions cérébrales après la réanimation permet d'envisager des stratégies neuroprotectrices limitant les dommages cérébraux après la reperfusion. En plus d'un contrôle attentif de l'hématose et de la glycémie [68], la seule stratégie ayant montré un réel bénéfice neurologique chez l'homme dans le syndrome post-arrêt

cardiaque est l'instauration d'une hypothermie modérée. Un autre aspect important est l'optimisation de la ventilation artificielle pour éviter l'aggravation des lésions neurologiques par une éventuelle hypocapnie [66]. En effet, le contrôle rigoureux de la capnie est essentiel. Alors qu'une hypocapnie aggrave l'ischémie cérébrale, une hypercapnie entraîne une augmentation de la pression intracrânienne.

D'une manière générale, il est maintenant admis que le traitement optimal des patients réanimés d'un arrêt cardiaque de cause cardiaque doit allier la reperfusion coronaire et l'hypothermie thérapeutique [3, 4, 73]. L'hypothermie thérapeutique sera détaillée dans le prochain chapitre.

4. Nouvelles approches thérapeutiques expérimentales

a) Dérivés nitrés

La recherche expérimentale a permis de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour la prise en charge du syndrome post-arrêt cardiaque. Une récente étude a par exemple montré que l'administration de nitroglycérine en association avec les substances vasopressives habituellement utilisées au cours de la réanimation cardio-pulmonaire permettait d'améliorer la fonction neurologique chez des porcs soumis à un arrêt cardiaque [74]. Dans cette étude, Varvarousi et al. ont inclus 20 porcs. Après un arrêt cardiaque asphyxique de 4 minutes, l'adjonction de nitroglycérine à l'adrénaline n'a pas permis d'améliorer les chances de réanimation malgré une pression de perfusion coronaire significativement augmentée pendant le massage cardiaque. La dysfonction neurologique 24 heures après l'arrêt cardiaque étaient en revanche significativement moins importante chez ces porcs par rapport aux porcs ayant reçu de l'adrénaline seule. En effet, le score neurologique moyen était de 43±5 % dans le groupe « adrénaline seule » et 98±4 % dans le groupe « nitroglycérine » (0 % correspondant à la mort cérébrale et 100 % correspondant à un état neurologique normal). L'analyse histologique des cerveaux a permis d'attribuer un score histologique cérébral correspondant à la somme des scores obtenus dans 4 parties du cerveau (cortex frontal, cortex latéral, hippocampe et cervelet). Le score moyen était de 18±2 pour les animaux du groupe « adrénaline seule » contre 4±4 pour les animaux du groupe « nitroglycérine » (un score élevé correspondant à des lésions plus sévères). La Figure 6 montre deux photographies représentatives de ces lésions cérébrales.

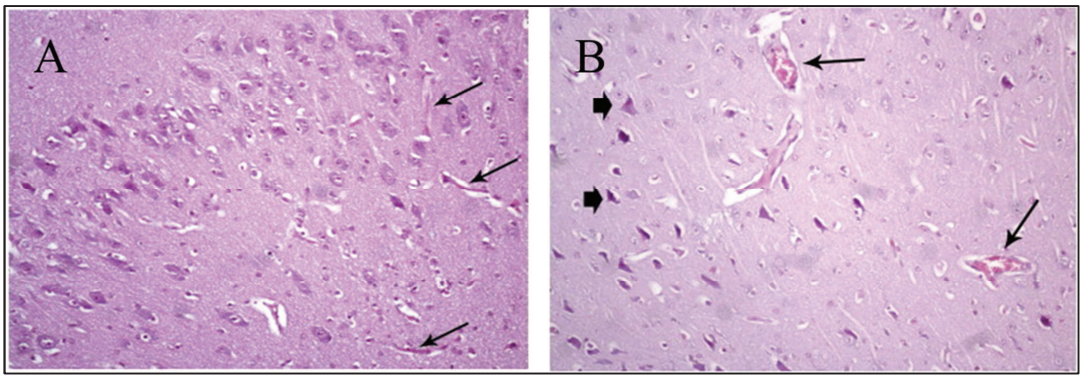

Figure 6 : Coupes histologiques de cerveaux de porcs soumis à 4 minutes d'arrêt cardiaque asphyxique (agrandissement x 200). (Adapté d'après [74]). *Panneau A : Cortex frontal d'un porc ayant reçu une administration de nitroglycérine pendant la réanimation cardio-pulmonaire. Panneau B : cortex frontal d'un porc du groupe ayant été réanimé en conditions témoin. Les flèches fines indiquent une congestion capillaire. Les flèches épaisses indiquent des neurones nécrotiques.*

b) Erythropoïétine

Plusieurs études ont également évalué le potentiel neuroprotecteur de l'érythropoïétine (EPO) [75, 76]. Dans l'une de ces études, l'administration d'EPO a permis de préserver la fonction et l'intégrité cardiaque au décours d'un arrêt cardiaque asphyxique de 8 minutes chez le rat [77]. Les rats étaient répartis entre 2 groupes : un groupe « Témoin » n'a reçu aucun traitement particulier après la RCP et un groupe « EPO » a reçu une administration intraveineuse d'érythropoiétine (5000 UI/kg) trois minutes après la reprise d'une activité circulatoire spontanée (RACS). Dans ce dernier groupe, la pression ventriculaire gauche systolique maximale et les maxima et minima de la dérivée première de cette pression en fonction du temps (dP/dt) étaient significativement plus élevés que dans le groupe Témoin dès 30 minutes après la RACS. La pression télédiastolique ventriculaire gauche était en parallèle moins élevée que chez les animaux du groupe Témoin. Cette protection était associée à une diminution des processus apoptotiques dans les cardiomyocytes. Par exemple, le nombre moyen de cardiomyocytes apoptotiques était 242±20 par champs examiné chez les rats du groupe EPO par rapport à 314±31 dans les échantillons provenant du groupe Témoin. Cette différence était significative. A l'heure actuelle, un essai clinique de grande envergure (EPO-ACR 2) étudie l'effet d'une administration précoce pré-hospitalière d'EPO chez des patients réanimés après un arrêt cardiaque extra-hospitalier.

c) Estrogènes

Un effet protecteur des estrogènes a aussi été suggéré pour lutter contre ces processus ischémiques. En effet, les chances de survie des femmes en âge de procréer et victimes d'un arrêt cardiaque extra-hospitalier sont plus élevées que celles des hommes, ainsi que leur probabilité de présenter une bonne récupération neurologique [78]. L'effet des estrogènes a aussi été largement étudié expérimentalement dans des situations d'ischémie-reperfusion régionale [79, 80]. Dans une étude expérimentale récente, un phytoestrogène a permis de réduire la mort neuronale après une ischémie cérébrale chez le rat [81], ce qui constitue une approche thérapeutique potentielle dans le cas du syndrome post arrêt cardiaque. Une étude réalisée sur un modèle porcin d'arrêt cardiaque hypovolémique [82] a aussi montré un effet neuroprotecteur des estrogènes. Les porcs ont été soumis à un choc hémorragique jusqu'à obtenir une pression artérielle moyenne de 35 mmHg pendant 15 minutes. Une administration de 17β-estradiol (50 mg/kg i.v., groupe estradiol) ou de son solvant (groupe témoin) a été réalisée avant l'induction d'une fibrillation ventriculaire de 4 minutes. Après réanimation, les 20 porcs (10 mâles et 10 femelles) du groupe estradiol présentaient une expression des NO-synthases iNOS et nNOS moins élevée que les 19 porcs (10 mâles et 9 femelles) du groupe témoin. Cela était associé à une préservation de la barrière hémato-encéphalique et des neurones dans le groupe estradiol.

d) Postconditionnement ischémique et pharmacologique

Compte tenu de son importance dans le domaine de la cardioprotection, un autre phénomène proposé pour limiter la dysfonction post-arrêt cardiaque est le « postconditionnement » ischémique. Il s'agit de l'induction volontaire d'épisodes ischémiques au cours de la reperfusion précoce afin d'induire une reperfusion progressive [83]. Cette approche a montré son aptitude à réduire la taille d'infarctus du myocarde chez l'homme. Dans un modèle porcin d'arrêt cardiaque de 15 min par fibrillation ventriculaire [84], le postconditionnement (groupe « PC ») était induit par 4 pauses de 20 secondes pendant les 3 premières minutes de massage cardiaque. Ce procédé a permis d'améliorer la survie, la fonction cardiaque et la fonction neurologique après l'arrêt cardiaque. À titre d'exemple, le score de performance cérébrale allant de 0 (normal) à 5 (mort) était 2,7±0,4 dans le groupe « PC » par rapport à 3,5±0,5 dans le groupe « Témoin » 24 heures après l'arrêt cardiaque ($p<0,05$).

Le phénomène de postconditionnement peut également être mimé par l'inhibition pharmacologique du PTPm par la cyclosporine [85]. L'administration de cyclosporine A a montré une efficacité contre le syndrome post-arrêt cardiaque [1, 86]. Dans leur étude, Cour et al. ont soumis des lapins à 15 minutes d'arrêt cardiaque asphyxique. Au moment de la RCP, les animaux ont reçu une administration intraveineuse de cyclosporine A (5 mg/kg, groupe « CsA ») ou de NIM 811, un autre inhibiteur de l'ouverture du PTPm (2,5 mg/kg, groupe NIM). Le groupe Témoin a eu une RCP sans administration spécifique. Un groupe de lapins non soumis à l'arrêt cardiaque (groupe « Sham ») a été ajouté. Comme le montre la Figure 7, la fonction cardiaque a été améliorée dans les groupes CsA et NIM par rapport au groupe Témoin. Cette amélioration était liée à une préservation de l'intégrité de la mitochondrie (Figure 8). En effet, l'ouverture du PTPm sous l'effet de l'ajout de calcium extra-mitochondrial était limitée dans les groupes CsA et NIM par rapport au groupe Témoin.

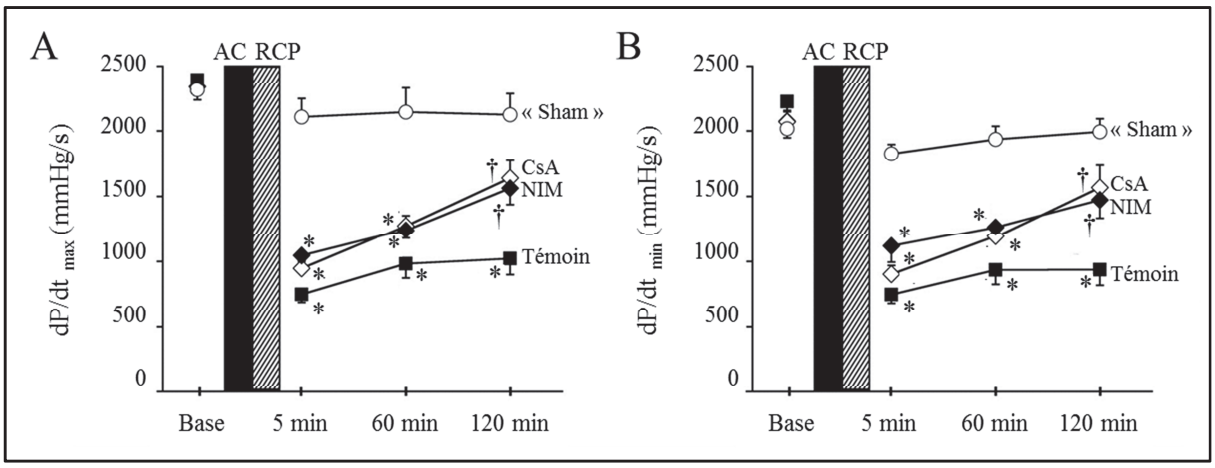

Figure 7 : Dérivée de la pression ventriculaire gauche en fonction du temps (dP/dt) maximale (A) et minimale (B) dans différents groupes expérimentaux de lapins soumis à un arrêt cardiaque asphyxique de 15 minutes. (Adapté d'après [1]). *AC : arrêt cardiaque ; RCP : réanimation cardio-pulmonaire ; CsA : groupe ayant reçu 5 mg/kg, i.v. de cyclosporine A au moment de la RCP ; NIM : groupe ayant reçu 2,5 mg/kg i.v. au moment de la RCP ; Sham : groupe n'ayant pas subi d'arrêt cardiaque ; †,: p<0,05 par rapport au groupe Témoin ; * , p<0,05 par rapport au groupe Sham.*

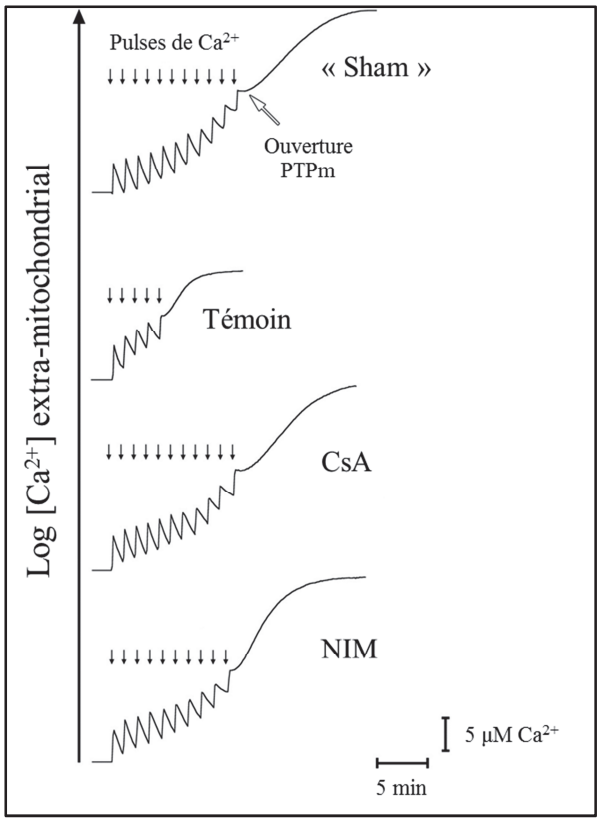

Figure 8 : Enregistrement type de l'expérience visant à évaluer la capacité de rétention calcique mitochondriale *in vitro* de prélèvements de myocarde de lapins soumis à un arrêt cardiaque de 15 min. (Adapté d'après [1]). *L'ouverture du PTPm sous l'effet d'ajouts successifs de calcium était retardée dans les mitochondries provenant de lapins traités par la Cyclosporine A (CsA) ou le NIM 811 (NIM) par rapport au groupe Témoin. Le groupe « Sham » n'a pas été soumis à l'arrêt cardiaque.*

e) Conclusions

La protection pharmacologique des patients réanimés d'un arrêt cardiaque extra-hospitalier a fait l'objet de nombreux travaux expérimentaux mais la plupart des études cliniques ont conduit à des résultats jusqu'ici décevants. L'administration de « cocktails » pharmacologiques est aujourd'hui proposée comme stratégie permettant d'agir sur les nombreuses cibles impliquées dans le syndrome post-arrêt cardiaque. L'hypothermie thérapeutique constitue néanmoins encore la seule approche ayant réellement montré son effet bénéfique sur ce syndrome, *a minima* dans le cas des arrêts cardiaques « choquables ».

II. L'HYPOTHERMIE THERAPEUTIQUE

A. Rappels sur la thermorégulation

Chez les animaux homéothermes comme les mammifères, la température corporelle ne varie que très peu. Elle est maintenue autour d'une température cible par des mécanismes de thermorégulation faisant intervenir des systèmes de détection et des centres intégrateurs couplés à des effecteurs. L'hypothalamus reçoit et intègre les influx nerveux provenant de récepteurs sensibles au chaud, au froid ou à des variations de température. En conditions physiologiques, ce sont les variations de la température ambiante qui activent ces mécanismes de thermorégulation. Chez l'homme, l'énergie dépensée par l'organisme pour maintenir sa température autour de 37,4°C est minimale lorsque la température ambiante est de 21°C s'il est habillé et de 26°C s'il est nu. C'est la zone de neutralité thermique. L'homme est également capable de thermorégulation comportementale (mettre et enlever des vêtements, courir, se couvrir...) mais nous ne parlerons ici que des mécanismes de thermorégulation involontaires.

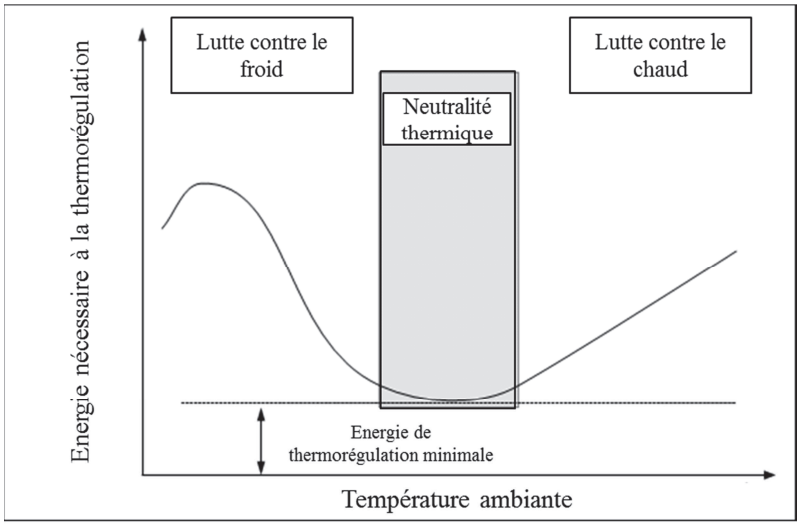

Figure 9 : Représentation schématique de l'énergie dépensée pour la thermorégulation en fonction de la température ambiante chez les homéothermes.

Les thermorécepteurs sont des récepteurs sensoriels comme les récepteurs du toucher, de la proprioception et de la nociception. Ils appartiennent à la famille des récepteurs canaux TRP (*transient receptor potential*). Il s'agit plus précisément de la partie réceptive de

neurones sensoriels. Ils détectent la température absolue ainsi que ses variations. Ces récepteurs sont principalement situés sur la peau, la cornée et la vessie. Les récepteurs au froid CMR (*cold and menthol receptors*) sont plus abondants que les récepteurs au chaud. Sur la paume de la main par exemple, on trouve 1 à 5 récepteurs au froid contre 0,4 récepteurs au chaud par centimètre carré. Les récepteurs au chaud VR (*vanilloid receptors*) et VRL (*vanilloid receptor-like*) réagissent au réchauffement, et de la même façon les récepteurs au froid réagissent à un refroidissement en augmentant leur fréquence de décharge de potentiels d'action. Ces dépolarisations se propagent le long des axones de ces neurones qui forment des fibres sensorielles lentes peu ou pas myélinisées (type C ou Aδ). Ces neurones forment une synapse avec un neurone de deuxième ordre dans la corne dorsale (sensitive) de la moelle épinière. Par une connexion contro-latérale, ces neurones empruntent le faisceau spinothalamique latéral qui se projette jusqu'au noyau ventral postérieur latéral du thalamus. Les neurones de 3ème ordre partant du thalamus se connectent ensuite au cortex somesthésique primaire latéral. Les effecteurs sollicités en réponse à l'intégration de ces informations sensorielles diffèrent en fonction de la réponse attendue. Lors d'un refroidissement, l'organisme devra produire de la chaleur, c'est la thermogenèse. Lors d'un réchauffement, l'organisme devra dissiper la chaleur, c'est la thermolyse.

La thermogenèse permet de produire de la chaleur lorsque la température extérieure est inférieure à la température de neutralité. Les mécanismes de thermogenèse font intervenir une vasoconstriction périphérique, une augmentation du métabolisme exothermique cellulaire et la contraction musculaire sous forme de frisson.

Lorsque la température ambiante est supérieure à la neutralité, les mécanismes de thermorégulation mettent en jeu une vasodilatation et le phénomène de sudation.

Dans certaines conditions pathologiques, ces mécanismes de thermorégulation nécessaires au maintien d'une température de référence dans l'organisme peuvent être altérés ou inhibés. L'organisme peut alors se trouver en hyperthermie ou en hypothermie selon la température ambiante à laquelle il est exposé. Une hypothermie ou une hyperthermie sévères peuvent entraîner la mort.

L'hyperthermie observée en cas de fièvre ne résulte pas d'un dérèglement des systèmes de régulation. En effet, ce n'est pas la chaleur exogène qui en est responsable mais une augmentation de la température « de consigne » imposée à l'organisme. Un certain nombre de médicaments (neuroleptiques, morphiniques, etc…) peuvent perturber les mécanismes de régulation centrale de la température. En revanche, les antipyrétiques ne font que ramener à son niveau « de consigne » la température quand elle est trop élevée.

En milieu hospitalier, l'induction d'une anesthésie inhibe les réactions de thermorégulation. La température du patient anesthésié doit donc être soumise à un contrôle rigoureux.

B. Définitions de l'hypothermie

1. Hypothermie accidentelle

Les mécanismes de thermorégulation peuvent être dépassés dans certains cas où l'exposition au froid est trop intense (avalanche, noyade…) ou dans le cas d'anomalies neurologiques. En dessous de 35°C, l'organisme se trouve en hypothermie. Il s'agit d'une hypothermie accidentelle puisqu'elle n'est pas volontairement provoquée. Cette hypothermie peut être favorisée par des facteurs responsables d'une diminution de la production de chaleur (malnutrition, hypoglycémie…) ou d'une augmentation des déperditions de chaleur (vasodilatation toxique ou pharmacologique, transfusion massive de produits sanguins froids…). L'hypothermie accidentelle modifie les fonctions physiologiques, notamment cardiovasculaires, et peut entraîner la mort. Lors d'une hypothermie accidentelle sévère, le risque de fibrillation ventriculaire devient élevé. Ainsi, aux Etats-Unis entre 1979 et 2002, 16555 décès ont été attribués à une hypothermie accidentelle, soit 689 par an [87].

2. Hypothermie thérapeutique

L'hypothermie thérapeutique est définie comme étant une diminution volontaire et contrôlée de la température corporelle. A l'heure actuelle, on parle plus généralement de « management ciblé de la température corporelle ». Cette situation se différencie de l'hypothermie accidentelle au cours de laquelle la baisse de la température n'est pas contrôlée. On distingue, selon son intensité, quatre types d'hypothermie : légère lorsque la température du corps est supérieure à 34°C, modérée entre 30 et 34°C, sévère entre 28 et 30°C et profonde en dessous de 28°C [72]. Seule l'hypothermie légère ou modérée peut être utilisée *in vivo* à des fins thérapeutiques puisqu'une température inférieure à 30°C est mal tolérée sur le plan cardiaque et peut entrainer des défaillances hémodynamiques sévères pouvant aller jusqu'à l'apparition d'une fibrillation ventriculaire spontanée [88].

C. Conséquences de l'hypothermie contrôlée

En l'absence de frisson, le métabolisme global d'un patient soumis à une hypothermie est diminué [89]. Il s'ensuit une augmentation de la pression partielle sanguine en O_2 et une diminution de la pression partielle en CO_2. L'hypothermie est également associée à une hypokaliémie due à une augmentation de la diffusion du potassium vers le secteur intracellulaire [90]. Une hyperglycémie peut aussi être observée lors de l'hypothermie. Elle serait due à une diminution du taux d'insuline circulante et à une diminution de l'expression de ses récepteurs à la membrane des cellules dans différents organes [91].

L'hypothermie provoque également une vasoconstriction périphérique qui se traduit par une augmentation des résistances périphériques. La conduction électrique dans les cardiomyocytes et l'automaticité sinusale sont ralenties, entrainant une bradycardie [92]. Le débit cardiaque s'en trouve réduit même si le volume d'éjection systolique est conservé. Dans le cas d'une hypothermie modérée, ces modifications hémodynamiques sont bien tolérées. En-dessous de 30°C, des changements hémodynamiques trop sévères peuvent entrainer la mort, compte-tenu notamment du risque d'arythmies cardiaques.

En hypothermie, on observe également une bradypnée, une diminution de la motilité intestinale et une augmentation de la diurèse [89].

D. L'hypothermie thérapeutique

1. Historique

L'intérêt thérapeutique pour l'hypothermie est relativement ancien puisque sa description « moderne » remonte au début du 19ème siècle. En effet, c'est en 1803 que la « méthode russe de réanimation » a été décrite, consistant à recouvrir les victimes d'arrêt cardiaque de neige dans l'espoir de les réanimer. Au cours de la campagne de Russie menée par Napoléon 1er en 1812, son chirurgien, le Baron Dominique-Jean de Larrey, a également utilisé le froid pour protéger des membres gravement blessés ou pour son pouvoir sédatif et analgésique au cours d'amputations [93]. En 1897, Charles Phelps a recommandé l'utilisation du froid pour préserver le cerveau des lésions traumatiques [94]. Jusqu'aux années 1950, l'hypothermie thérapeutique a aussi été étudiée dans différents domaines comme l'oncologie et la chirurgie. En 1953, Bigelow et al. ont décrit un double effet, cardio- et neuroprotecteur de l'hypothermie au cours de chirurgies cardiaques chez le singe et le chien [95]. En 1959,

Benson et al. ont alors décrit les bénéfices obtenus grâce à l'utilisation de l'hypothermie thérapeutique au décours d'un arrêt cardiaque [96]. Malheureusement, la mise en évidence d'effets indésirables graves au cours de l'hypothermie ont plongé cette technique dans un relatif oubli jusqu'aux années 1990 [88]. Un regain d'intérêt pour l'hypothermie thérapeutique est apparu lorsque les effets indésirables sont apparus moins importants que le bénéfice apporté. En effet, la majorité des effets néfastes de l'hypothermie pouvaient être évités par un contrôle plus rigoureux des conditions d'hypothermie et des techniques de refroidissement moins susceptibles d'induire des lésions cutanées. Ainsi, en 2002, deux études cliniques randomisées ont mis en évidence une forte protection neurologique associée à une augmentation de la survie après induction d'une hypothermie chez des patients réanimés d'un arrêt cardiaque [97, 98]. Depuis leur publication, ces études ont permis l'inscription de l'hypothermie thérapeutique dans les recommandations de l'American Heart Association et de l'European Resuscitation Council sur la prise en charge de l'arrêt cardiaque [4, 5].

2. Hypothermie et ischémie ou traumatismes cérébraux

Les effets bénéfiques de l'hypothermie ont été principalement étudiés dans deux grands domaines que sont la neuro- et la cardioprotection. Cela explique son intérêt lors du syndrome post-arrêt cardiaque qui associe une défaillance cardiocirculatoire et une atteinte neurologique.

a) Traumatisme crânien

Depuis les travaux de Phelps en 1897, de nombreuses études ont suggéré un effet neuroprotecteur de l'hypothermie modérée lors de lésions neuronales d'origine traumatique [99, 100]. Cependant, l'absence de résultats significatifs [101, 102] a conduit à de nombreuses controverses. L'induction d'une hypothermie à des fins thérapeutiques contre les conséquences d'un trauma crânien ne fait donc pas l'objet de recommandations officielles [103, 104]. La raison évoquée pour expliquer l'absence de bénéfices dans certaines études a été la prédominance des effets secondaires délétères par rapport aux effets bénéfiques [105]. D'autres études sont donc nécessaires pour déterminer les conditions dans lesquelles l'hypothermie thérapeutique peut protéger le cerveau du patient « traumatisé ». Les études expérimentales ont en effet montré de puissants effets bénéfiques et en pratique, l'hypothermie est souvent utilisée chez les patients « traumatisés » en cas d'hypertension intra-cranienne non contrôlée par les autres moyens thérapeutiques.

b) Accidents vasculaires cérébraux

L'intérêt de l'hypothermie thérapeutique dans les situations d'ischémie cérébrale a été étudié dans de nombreux modèles animaux d'ischémie-reperfusion cérébrale [106-108]. Ces études ont toutes montré une amélioration de la survie et du pronostic neurologique avec une diminution de la taille de l'infarctus cérébral. Une méta-analyse menée par Van Der Worp et al. sur 3353 animaux provenant de 101 études expérimentales a confirmé ces résultats [109]. Cette analyse montrait aussi que le bénéfice était d'autant plus grand que l'hypothermie était instaurée rapidement au cours de l'ischémie et que la température était basse (tout en restant dans le cadre de l'hypothermie modérée). Malheureusement, les études conduites chez l'homme n'ont pas permis de montrer un bénéfice significatif [110, 111]. L'intérêt de l'hypothermie thérapeutique doit donc encore être étudié chez l'homme dans cette situation [112].

3. Hypothermie et infarctus du myocarde

Les études expérimentales ayant permis de mettre en évidence l'effet cardioprotecteur de l'hypothermie sont très nombreuses. Cette protection a été décrite dans un grand nombre de modèles animaux d'infarctus du myocarde chez le lapin [113, 114], le chien [115], le porc [116], le rat [117] et la brebis [118]. Les résultats obtenus dans différentes études expérimentales sont reportés dans le Tableau 2. Dans ces différentes études, l'hypothermie a été instaurée à différents moments au cours de l'épisode ischémique et la température cible variait entre 29°C et 35°C. La comparaison des résultats obtenus montre que le bénéfice maximal est atteint pour une température cible de 32°C, surtout si elle est atteinte le plus tôt possible au cours de l'ischémie. Miki et al. ont par exemple comparé deux températures cibles (35 et 32°C) et différentes fenêtres d'induction de l'hypothermie chez des lapins soumis à 30 minutes d'occlusion coronaire et 3 heures de reperfusion. Pour chacune des 2 températures étudiées, l'effet protecteur était d'autant plus important que l'hypothermie était induite précocement. Lorsque l'hypothermie était instaurée dès le début de l'épisode ischémique, la diminution de la taille d'infarctus était maximale à 32°C par rapport à 35°C (respectivement -89% et -70% de la taille d'infarctus). Cette étude a également montré qu'une hypothermie débutée à la 20ème minute d'occlusion coronaire restait efficace à 32°C (38% de réduction de la taille d'infarctus), mais que ce bénéfice était perdu pour une température cible de 35°C (Tableau 2).

Méthode de refroidissement	Espèce	OC (min) / RC (h)	Température cible (°C)	Fenêtre de refroidissement	Taille d'infarctus des groupes témoins vs hypothermes (%)
Refroidissement par contact direct [119]	Lapin	30 min/3 h	~33°C	10 min OC → 5 min RC 25 min OC → 15 min RC	44±4 vs 23±4 (-48%) 44±4 vs 43±4 (NS)
Refroidissement par contact direct [120]	Lapin	120 min/3 h	~30°C	30 min OC → 15 min RC	72±3 vs 59±3 (-18%)
Pericardioperfusion par des fluides [121]	Lapin	30 min/3 h	~32°C	-30 min OC → 25 min OC	35±6 vs 18±3 (-49%)
Refroidissement par contact direct [122]	Lapin	30 min/3 h	~32°C	20 min OC → 120 min RC	51±5 vs 27±4 (-47%)
Refroidissement du sang par échangeur thermique [114]	Lapin	30 min/3 h	~35°C	0 min OC → 30 min OC 10 min OC → 30 min OC 20 min OC → 30 min OC	37±3 vs 11±3 (-70%) 37±3 vs 18±3 (-51%) 37±3 vs 34±2 (NS)
			~32°C	0 min OC → 30 min OC 10 min OC → 30 min OC 20 min OC → 30 min OC	37±3 vs 4±1 (-89%) 37±3 vs 8±1 (-78%) 37±3 vs 23±2 (-38%)
Refroidissement endovasculaire [123]	Porc	60 min/3 h	~34°C	20 min OC → 15 min RC	45±8 vs 9±6 (-80%)
Refroidissement par contact direct [115]	Porc	40 min/3 h	~29°C	0 min OC → 40 min OC	62±5 vs 25±2 (-60%)
Refroidissement du sang par échangeur thermique [124]	Porc	45 min/3 h	~33°C	43 min OC → 120 min RC	68±1 vs 71±8 (NS)
Infusion intracoronaire d'une solution saline froide [125]	Porc	60 min/3 h	~33°C	15 min OC → 15 min RC 60 min OC → 30 min RC	36±4 vs 9±2 (-75%) 45±5 vs 33±2 (NS)

Tableau 2 : Résumé des résultats de plusieurs études expérimentales ayant évalué l'effet réducteur de la taille de l'infarctus d'un refroidissement cardiaque débuté au cours d'une occlusion coronaire (OC) chez des animaux de laboratoire. *NS, non significatif ; RC, reperfusion coronaire ; les tailles d'infarctus sont exprimées en pourcentage de l'aire à risque.*

Comme le montre le Tableau 2, la majorité des études expérimentales ont montré un effet bénéfique d'autant plus important que l'hypothermie était instaurée rapidement dans les modèles d'occlusion coronaire [116, 126]. Ainsi, une relation peut être établie à partir des résultats de plusieurs travaux conduits chez des lapins soumis à une occlusion coronaire de 30 min et à une hypothermie débutée plus ou moins précocement. Le pourcentage de réduction de la taille d'infarctus correspond à celui observé dans le groupe refroidi par rapport au groupe témoin non refroidi dans chaque étude (Figure 10).

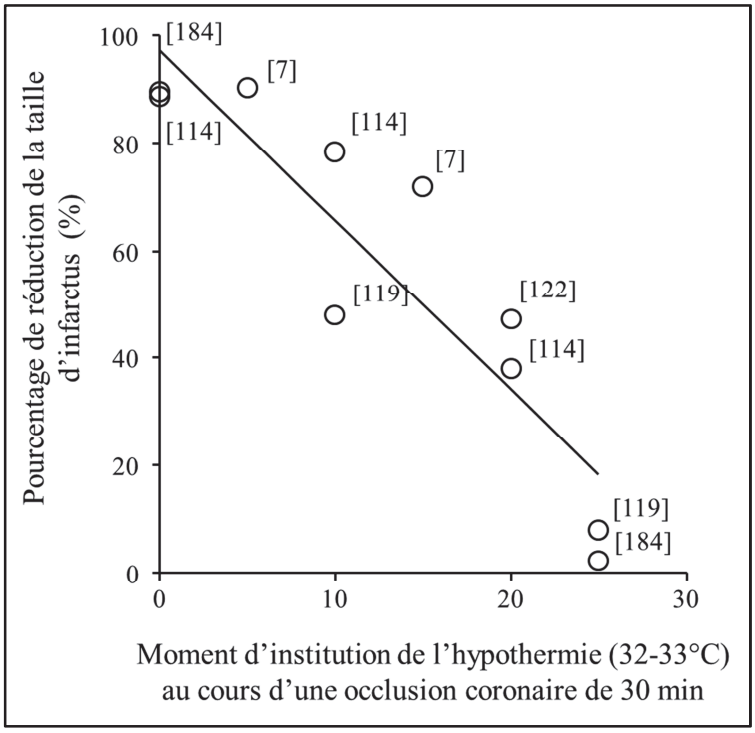

Figure 10 : Relation entre la réduction de la taille d'infarctus permise par une hypothermie modérée (32°C) et le moment d'instauration de cette hypothermie au cours d'une ischémie myocardique expérimentale. *Les numéros entre parenthèse correspondent aux références bibliographiques de la thèse.*

Comme le montre le Tableau 3, la majorité des études expérimentales ont aussi montré que l'hypothermie perdait son effet protecteur lorsqu'elle n'était instaurée qu'après l'épisode ischémique (au moment de la reperfusion).

Méthode de refroidissement	Espèce	OC (min) /RC (h)	Température cible	Fenêtre de refroidissement	Taille d'infarctus des groupes témoins vs hypothermes (%)
Contact direct épicardique [119]	Lapin	30 min/3 h	~33°C	25 min OC → 15 min RC	44±4 vs 43±4 (NS)
Pericardioperfusion par des fluides [121]	Lapin	30 min/3 h	~32°C	25 min OC → 30 min RC	38±1 vs 35±4 (NS)
Externe (couvertures d'eau) [127]	Lapin	30 min/3 h	~37°C	25 min OC → 180 min RC 30 min OC → 180 min RC	59±1 vs 44±2 (NS) 59±1 vs 51±2 (NS)
Refroidissement du sang par échangeur thermique [124]	Porc	45 min/3 h	~33°C	43 min OC → 120 min RC	68±1 vs 71±8 (NS)
Perfusion intracoronarienne de NaCl (0,9%) refroidi [125]	Porc	60 min/3 h	~33°C	0 min RC → 30 min RC	45±5 vs 33±2 (NS)
Perfusion IV de NaCl (0.9%) refroidi + refroidissement endovasculaire [128]	Porc	45 min/4h	<35°C	40 min OC → 30 min RC	61±5 vs 74±4 (p = 0,03)
Perfusion IV de NaCl (0.9%) refroidi + refroidissement endovasculaire [116]	Porc	40 min/3 h	~33°C	0 min RC → 30 min RC	75±5 vs 80±6 (NS)

Tableau 3 : Résumé des résultats de plusieurs études expérimentales ayant évalué l'effet réducteur de la taille de l'infarctus d'un refroidissement cardiaque débuté au cours de la reperfusion coronaire (RC) chez l'animal de laboratoire. *NS, non significatif ; OC : occlusion coronaire ; les tailles d'infarctus sont exprimées en pourcentage de l'aire à risque.*

Plusieurs études cliniques de faisabilité ont révélé la possibilité de refroidir les patients à la phase aigüe de l'infarctus du myocarde sans retarder la reperfusion par angioplastie percutanée [129]. Une première étude clinique chez 42 patients dont 20 ont été refroidis n'a cependant pas montré de diminution significative de la taille d'infarctus [130]. Deux autres études cliniques de plus grande amplitude ont étudié l'effet d'un refroidissement endovasculaire avant angioplastie chez des patients souffrant d'un infarctus du myocarde (études COOL-MI : « *Cooling as an Adjunctive Therapy to Percutaneous Intervention in Patients With Acute Myocardial Infarction* » [131] et ICE-IT : « *Intravascular cooling adjunctive to percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction* » [132]). Malheureusement, ces études n'ont pas mis en évidence de diminution significative de la taille d'infarctus dans le groupe des patients refroidis par rapport aux patients non refroidis. Seule une minorité des patients avait cependant atteint la température cible avant la reperfusion. Dans ce sous-groupe de patients, la taille d'infarctus était significativement inférieure à celle des autres patients [133]. Cela suggère l'existence d'un bénéfice si le refroidissement est plus rapide. C'est dans cette optique que Götberg et al. [134] ont récemment étudié l'effet d'un refroidissement plus rapide associant une thermode endovasculaire à un remplissage vasculaire par une solution de NaCl à 4°C. Cette technique a permis une diminution significative de la taille d'infarctus chez les 9 patients refroidis par rapport aux 9 patients non soumis à l'hypothermie. L'étude CHILL-MI (*Efficacy of Endovascular Catheter Cooling Combined With Cold Saline for the Treatment of Acute Myocardial Infarction*) utilisant cette même combinaison de modes de refroidissement est actuellement en cours dans différents centres hospitaliers de Suède, d'Autriche, du Danemark et de Slovénie (Clinicaltrials.gov : NCT01379261).

4. Hypothermie et arrêt cardiaque

L'arrêt cardiaque représente la scène clinique « idéale » pour montrer un effet bénéfique de l'hypothermie thérapeutique puisqu'il associe une atteinte neurologique et une défaillance cardiaque.

a) Neuroprotection dans l'arrêt cardiaque

L'effet neuroprotecteur de l'hypothermie modérée a été décrit dans de nombreux modèles animaux d'arrêt cardiaque chez la souris [135], le rat [136], le porc [137] et le chien [6, 138]. Ces études ont toutes montré une amélioration de la survie et de la fonction neurologique. Une

première étude clinique a été publiée par Bernard et al. en Australie en 1997 [139]. Elle tendait à confirmer ces résultats chez l'homme mais cette étude ne comportait qu'un groupe témoin historique et n'était pas randomisée. Deux études de faisabilité ont ensuite prouvé l'innocuité de l'hypothermie thérapeutique modérée dans la prise en charge de l'arrêt cardiaque réanimé [140, 141]. Ces données préliminaires ont permis la réalisation de deux essais cliniques randomisés de grande envergure [97, 98]. Dans ces deux études, les patients ayant bénéficié de l'hypothermie présentaient un meilleur pronostic neurologique associé à une meilleure survie. Dans l'étude « *Hypothermia After Cardiac Arrest* » (HACA), 137 patients ont été soumis à une hypothermie induite par un dispositif externe et 138 patients ont été inclus dans le groupe normotherme. Dans le groupe hypotherme, la température cible de 32 à 34°C a été atteinte environ 8 h après la reprise d'une activité circulatoire spontanée et a été maintenue pendant 24 h. Au bilan, 55% des patients soumis à l'hypothermie thérapeutique ont présenté une bonne récupération neurologique après 6 mois alors que le pourcentage n'était que de 39% chez les patients du groupe normotherme. Parmi les 77 patients inclus dans l'étude australienne de Bernard et al. [97], 43 ont été soumis à une hypothermie par application de packs de glace sur le corps. La vitesse de refroidissement était de 0,9°C/h et la température cible de 33°C a été maintenue pendant 12h. Au bilan, 49% des patients du groupe hypotherme ont quitté l'hôpital avec un pronostic neurologique favorable contre 26% dans le groupe normotherme.

Dans toutes ces études, les patients avaient été victimes d'un arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire. Un débat s'est alors ouvert à propos de l'efficacité de l'hypothermie thérapeutique au décours d'un arrêt cardiaque de type « non choquable » au cours duquel le premier rythme cardiaque détecté est l'asystolie ou la dissociation électro-mécanique. Des études expérimentales réalisées chez la souris [135, 142] et le rat [143, 144] après un arrêt cardiaque provoqué par asphyxie ou injection de chlorure de potassium ont montré un effet bénéfique de l'hypothermie sur la survie et la récupération neurologique. En revanche, les études cliniques ont montré des résultats variables [145]. Dans l'étude rétrospective publiée par Dumas et al. en 2011 [146], 1145 patients ont été inclus et répartis en deux groupes suivant leur rythme cardiaque initial à l'admission : choquable ou non choquable. Dans chacun de ces groupes, les patients ont été soumis ou non à une hypothermie thérapeutique pendant environ 24 heures. Le pourcentage de patients avec une bonne récupération neurologique n'était pas amélioré par l'hypothermie thérapeutique chez les patients réanimés d'un arrêt cardiaque non choquable par rapport aux patients non refroidis (respectivement 17% vs 15%). En revanche, cette même procédure apportait un bénéfice significatif sur la récupération neurologique en cas d'arrêt

cardiaque choquable (44% des patients refroidis vs 29% des patients non refroidis). A l'inverse, deux autres études de cohorte ont montré un effet bénéfique de l'hypothermie thérapeutique au décours d'un arrêt cardiaque non choquable en termes de survie et de fonction neurologique [147, 148]. La première étude, publiée par Lundbye et al. sur un effectif de 100 patients a montré une amélioration significative de la survie chez les patients ayant subi une hypothermie (38% de survie vs 19% chez les patients normothermes). La deuxième étude de Testori et al. sur 374 patients a aussi montré une amélioration du pourcentage de bonne récupération neurologique chez les patients hypothermes par rapport aux autres (respectivement 35% vs 23%).

Un autre débat concerne la température à appliquer pour tirer le meilleur bénéfice neurologique possible de l'hypothermie après un arrêt cardiaque. Dans les études de Bernard et al. [97] et du groupe HACA [98], les patients du groupe normotherme n'ont pas fait l'objet d'un suivi strict des températures. Ainsi, une grande variabilité était observée dans les températures des patients des groupes normothermes et la survenue d'hyperthermie chez certains patients a certainement biaisé ces études puisqu'il est bien documenté que l'hyperthermie est associée à un mauvais pronostic vital et neurologique [149]. Une étude récente a aussi montré sur un faible effectif de 36 patients que la récupération neurologique six mois après l'arrêt cardiaque était meilleure chez les patients dont la température cible était 32°C par rapport à ceux refroidis à 34°C [150]. Une étude comparant l'effet d'une normothermie stricte ou d'une hypothermie (36°C et 32°C) est en cours [151] (étude *Target Temperature Management*).

b) Cardioprotection dans l'arrêt cardiaque

Si l'effet neuroprotecteur de l'hypothermie thérapeutique a été largement étudié, beaucoup moins d'études se sont intéressées à ses effets sur la composante cardiogénique du syndrome post-arrêt cardiaque. Cette défaillance cardio-circulatoire est néanmoins responsable du décès précoce de nombreux patients initialement réanimés d'un arrêt cardiaque. Quelques études ont cependant montré une action bénéfique de l'hypothermie sur la fonction cardiaque post-arrêt cardiaque [152, 153].

Cette cardioprotection est d'autant plus importante qu'il s'agit d'un arrêt cardiaque causé par un infarctus du myocarde. Dans cette situation, l'hypothermie peut théoriquement être associée à l'angioplastie sans retarder cette dernière intervention ni affecter la vitesse de refroidissement [154]. Comme nous l'avons dit plus haut, le bénéfice cardioprotecteur dépend de la capacité à atteindre la température cible avant la reperfusion coronaire.

c) Fenêtre de protection de l'hypothermie thérapeutique au cours de l'arrêt cardiaque

Dans les études expérimentales, l'hypothermie peut être instaurée avant [142, 155], pendant [156] ou après l'arrêt cardiaque et la réanimation cardio-pulmonaire [157]. Comme le résume le Tableau 4, la comparaison des résultats obtenus dans ces différentes études montre une augmentation du bénéfice en fonction de la précocité d'induction de l'hypothermie. Cela a été montré dans plusieurs études conduites dans des modèles d'arrêt cardiaque chez le chien [6, 157] ou le rat [136]. Par exemple, dans l'étude de Nozari et al. [6], la survie était significativement plus élevée chez les 9 chiens soumis à une hypothermie immédiatement après la réanimation que chez les 8 chiens pour lesquels l'hypothermie avait été retardée. Chez ces derniers, l'instauration de l'hypothermie était seulement retardée de 10 minutes. Seul 1/9 animal a survécu pendant les 96 heures de suivi par rapport à 7/9 dans le groupe refroidi plus précocement. Tanimoto et al. [138] ont aussi étudié deux vitesses de refroidissement pour atteindre 34°C après un arrêt cardiaque induit par fibrillation ventriculaire chez le chien. La température cible a respectivement été atteinte en 1,3 min et 49,5 min. Si le taux de survie n'était pas significativement différent entre ces groupes, le déficit neurologique était significativement plus marqué 96 h après la réanimation dans le groupe refroidi lentement par rapport au groupe refroidi plus rapidement. La même observation a été faite dans les études cliniques du groupe HACA [98] et de Bernard et al. [139]. En effet, si l'hypothermie était débutée après la réanimation dans les deux études, elle l'était plus précocement dans l'étude australienne (dans l'ambulance) que dans l'étude américaine. Cela était associé à un effet neuroprotecteur plus net. Cela suggère que le bénéfice conféré par l'hypothermie modérée dans l'arrêt cardiaque dépend de la précocité d'instauration de cette hypothermie, sans que cela n'ait été directement montré par une étude clinique spécifique.

La durée de l'hypothermie est aussi un paramètre important. Alors que les recommandations actuelles conseillent le maintien de l'hypothermie pendant 24 à 36h [4], l'intérêt d'une telle durée d'hypothermie est remis en cause par quelques études expérimentales. Ainsi, dans une étude portant sur des rats soumis à une hypothermie pendant 2, 5 ou 8 heures après un arrêt cardiaque de 8 min, Ye et al. ont montré que l'hypothermie de courte durée était associée à une meilleure récupération cardiaque et neurologique par rapport aux hypothermies plus longues [158]. Cela n'a pas été confirmé chez l'homme.

Méthode de refroidissement	Espèce	Durée de l'AC (min)	T° cible	Fenêtre de refroidissement	Conclusion
Hypothermie intra-arrêt cardiaque					
Externe [142]	Souris	8min (Asystolie)	~30°C	5 min AC → 60 min RCP	Augmentation significative de la survie à 72 h et amélioration de la fonction neurologique chez les animaux refroidis vs témoins (survie : respectivement 6/10 vs 1/10)
Externe [135]	Souris	8min (Asystolie)	~30°C	6.5 min AC → 60 min RCP	Augmentation significative de la survie à 168 h et amélioration de la fonction neurologique chez les animaux refroidis vs témoins (survie : respectivement 8/15 vs 0/15)
Perfusion de fluides froids [155]	Chien	9min (FV)	~34°C	8 min AC → 6.5 min RCP	Amélioration de la fonction neurologique chez les animaux refroidis vs témoins. Aucune différence significative sur la survie à 72 h.
Hypothermie débutée avant la RACS					
Externe [159]	Porc	8min (FV)	~30°C ~33°C ~35°C	0 min RCP	Augmentation significative de la survie chez les animaux refroidis vs témoins avec une protection maximale à 33°C (respectivement 5/8, 7/8, 3/8 vs 0/8 pour 30, 33, 35°C vs 38°C)
Evaporation de PFC dans le nasopharynx Perfusion de fluides froids [160]	Porc	15min (FV)		0 min RCP → 240 min RCP	Aucune différence significative sur la survie et sur la fonction neurologique chez les animaux refroidis vs témoins à 96 h.
Hypothermie débutée après la RACS					
Externe [142]	Souris	8min (Asystolie)	~30°C	20 min RACS → 80 min RCP	Aucune différence significative sur la survie et sur la fonction neurologique chez les animaux refroidis vs témoins à 72 h.
Externe [135]	Souris	9.5min (Asystolie)	~30°C	8 min RACS → 60 min RCP	Amélioration de la fonction neurologique chez les animaux refroidis vs témoins. Aucune différence significative sur la survie entre les deux groupes à 168 h.
Circulation extra-corporelle [156]	Chien	12.5min (FV)	~34°C	0 min RACS → 60 min RCP	Amélioration de la fonction neurologique chez les animaux refroidis vs témoins (19% vs 44%).
			~34°C	15 min RACS → 75 min RCP	Aucune différence significative sur la fonction neurologique chez les animaux refroidis vs témoins à 96 h (38% vs 44%).
Externe [137]	Porc	10min	~32°C (AP)	0 min RACS → 960 min RCP	Amélioration de la fonction neurologique chez les animaux refroidis vs témoins. Aucune différence significative sur la survie entre les deux groupes à 216 h (8/8 vs 6/8).

Tableau 4 : Résumé de plusieurs études expérimentales étudiant l'effet neuroprotecteur d'un refroidissement systémique avant, pendant et après une réanimation cardiopulmonaire (RCP) d'un arrêt cardiaque (AC). *AP, Artère pulmonaire ; FV, fibrillation ventriculaire ; PFC, perfluorocarbones ; RACS, restauration d'une activité circulatoire spontanée.*

5. Modalités de refroidissement

Plusieurs techniques existent pour induire une hypothermie thérapeutique. D'autres sont en cours d'évaluation sur le plan expérimental. Quelle que soit la méthode de refroidissement utilisée, le patient doit être sédaté et curarisé pour éviter le réflexe naturel de frisson qui gêne l'induction et le maintien de l'hypothermie. Il est important de bien définir le site de mesure de la température centrale puisque certaines stratégies hypothermisantes induisent des hétérogénéités dans la vitesse de refroidissement dans différentes parties du corps. Ainsi, on peut mesurer la température vésicale, tympanique, rectale ou sanguine selon la technique de refroidissement utilisée. La période de réchauffement constitue également une phase délicate comportant un fort risque de décompensation brutale. Cela est notamment dû à une hyperémie réactionnelle pouvant causer un œdème vasogénique et une augmentation brutale de la pression intracrânienne [161]. Un réchauffement rapide peut également engendrer des effets hémodynamiques systémiques délétères. Le réchauffement doit donc être progressif (0,25 à 0,5°C / h) [162].

a) Méthodes non invasives

Les méthodes de refroidissement externe présentent l'avantage d'être simples et peu coûteuses. La méthode « canadienne » consiste à appliquer des sacs de glace à des endroits stratégiques du corps sur le trajet des gros vaisseaux, notamment dans l'aine, aux aisselles et sur le cou. Cette technique permet l'induction et le maintien de l'hypothermie mais la vitesse de refroidissement est faible [163].

L'utilisation de couvertures à flux d'eau ou d'air froid est largement répandue et son association avec des packs de glace et un ventilateur assure une meilleure performance [140, 163]. Il existe actuellement plusieurs dispositifs commercialisés de ce type. Les plus répandus sont le Blanketrol II® (Cincinnati Sub-Zero, USA) et le Arctic Sun® (Medivance, USA). Le premier est un matelas recouvert d'hydrogel dans lequel circule une eau réfrigérée dont la température est contrôlée par une machine. Le matelas de gel est disposé sur le lit, sous le patient. Si ce dispositif est peu encombrant, la surface de contact avec le patient n'est pas optimale. C'est pour cette raison que le deuxième dispositif est préféré. Il s'agit du même principe de refroidissement par circulation d'eau à température contrôlée, sous la forme de coussins adhésifs formant une combinaison enveloppant le patient.

Figure 11 : Illustration du système de refroidissement Arctic Sun®.

Ces méthodes de refroidissement externe présentent des risques d'engelures qui peuvent être maîtrisés en intercalant un drap entre le dispositif froid et le patient. Cependant, le fait de couvrir le patient peut créer un encombrement et gêner la manipulation du patient par l'équipe médicale. Malgré un perfectionnement évident de ces techniques au cours des années, le refroidissement externe reste une méthode lente et la température cible de 32°C n'est jamais atteinte avant un minimum de 3 h pour la technique la plus performante Arctic Sun® [164]. Le refroidissement externe le plus efficace en terme de rapidité est l'immersion dans un bain d'eau glacée (diminution de 10°C / h) mais cette technique n'est pas envisageable en routine. L'application d'un casque réfrigérant permet de refroidir exclusivement le cerveau [165] mais son efficacité n'a pas encore été bien démontrée par rapport aux autres procédés.

b) Méthodes invasives

Les techniques invasives de refroidissement permettent généralement un refroidissement plus rapide que les techniques externes. La perfusion de fluide (ex : NaCl à 0,9%) à 4°C par voie intraveineuse induit un refroidissement d'autant plus rapide que le volume perfusé est grand [166]. La tolérance pulmonaire a été bien documentée pour des volumes atteignant 30 ml/kg sur une durée de 30 min chez l'homme [167]. Des études expérimentales ont montré un bénéfice neurologique [168, 169] et une augmentation de la survie chez les animaux refroidis par cette méthode après un arrêt cardiaque par rapport aux animaux non refroidis. Ces études n'avaient pas pour but de comparer différentes modalités d'induction de l'hypothermie mais simplement d'étudier les effets de la perfusion de fluide froid. Une autre étude comparant cette technique de refroidissement à une autre technique que nous détaillerons plus bas, la ventilation liquide, n'a pas montré d'amélioration des chances

de succès de la réanimation par perfusion de fluide froid chez des porcs soumis à 11 minutes d'arrêt cardiaque [170]. D'une manière générale, cette technique permet d'induire une hypothermie relativement rapide en milieu pré-hospitalier [171] mais ne permet pas le maintien de la température cible puisque le volume maximal pouvant être administré est vite atteint [172]. Elle doit donc être associée à une autre méthode de refroidissement afin de maintenir la température cible du patient durant la période souhaitée [173]. Une étude intitulée RINSE (*Rapid infusion of cold normal saline by paramedics during CPR*) est en cours pour étudier la faisabilité et l'efficacité d'une hypothermie « intra-arrêt », c'est-à-dire instaurée pendant la réanimation extra-hospitalière par perfusion de fluide froid [174].

Une autre méthode hypothermisante invasive est l'utilisation d'une thermode endovasculaire par voie veineuse fémorale. Elle permet un refroidissement très stable et n'exige pas l'association avec une autre technique hypothermisante. Le refroidissement est relativement rapide [175] mais présente un coût élevé. De plus, il s'agit d'une méthode invasive qui expose ainsi à des complications spécifiques (saignement, infections).

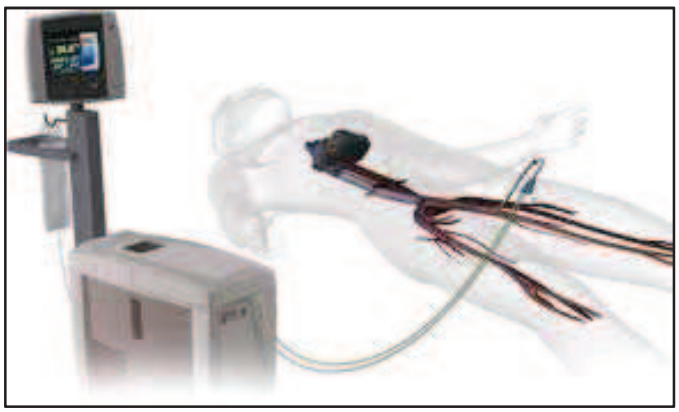

Figure 12 : Illustration du système de refroidissement endovasculaire par l'application d'une thermode dans la veine fémorale (Alsius, Irvine, CA, USA).

Actuellement la technique la plus rapide pour induire et maintenir une hypothermie thérapeutique est la circulation extra-corporelle [176, 177]. Cependant, sa mise en place est lourde et les risques d'infection qu'elle présente rendent son utilisation pré-hospitalière exceptionnelle [178].

c) Utilisation des perfluorocarbones

Les perfluorocarbones (PFC) sont des hydrocarbures fluorés dont tous les atomes d'hydrogène ont été substitués par des atomes de fluor (Figure 13). On les oppose aux hydrofluorocarbures dont les atomes d'hydrogène n'ont pas tous été remplacés. Les perfluorocarbones ont la particularité de pouvoir dissoudre de grandes quantités de gaz divers dont le dioxygène et le dioxyde de carbone.

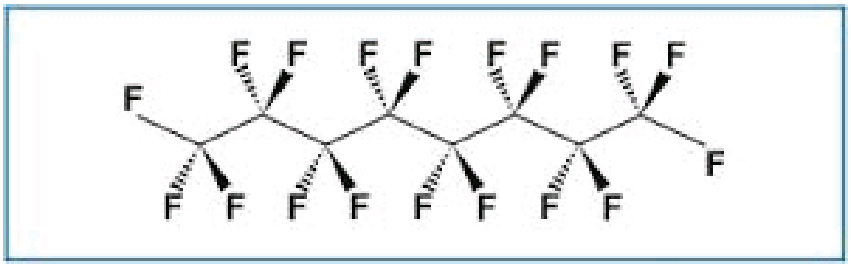

Figure 13 : Formule chimique développée d'un perfluorocarbone, le perfluorooctane.

Evaporation intranasale

L'évaporation intranasale de perfluorocarbones par le système Rhinochill© (Benechill®, USA) permet un refroidissement préférentiel du cerveau [179]. Son principal avantage est sa simplicité d'instauration qui permet un usage extra-hospitalier. Malgré des effets bénéfiques observés chez le porc [180], l'efficacité de cette technique reste à prouver chez l'homme car les études cliniques n'ont pas permis de mettre en évidence une efficacité thérapeutique claire [181]. L'étude PRINCE (*Pre-ROSC IntraNasal Cooling Effectiveness*) n'a par exemple pas montré d'amélioration dans le pourcentage de survie, ou de bonne récupération neurologique, dans la population globale de patients refroidis par évaporation intranasale de PFC par rapport aux patients refroidis par voie externe [182]. En revanche, dans le sous-groupe de patients pour lesquels la réanimation cardiopulmonaire avait été débutée dans les 10 minutes suivant l'arrêt cardiaque, une amélioration de la survie ainsi que de la récupération neurologique a été observée chez les patients refroidis par le dispositif intra-nasal.

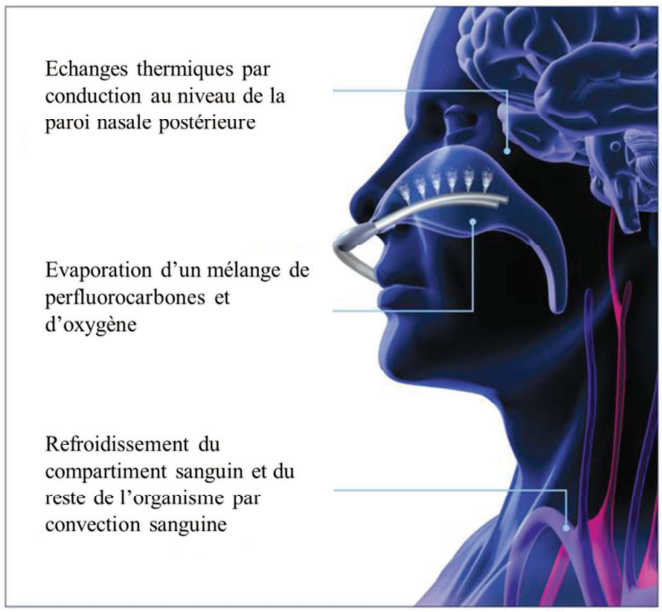

Figure 14 : Illustration schématique du mode de fonctionnement du système Rhinochill©.

Ventilation liquide

Une autre méthode utilisant les perfluorocarbones est leur instillation dans les poumons au cours d'une ventilation liquide totale. Elle permet un refroidissement extrêmement rapide associé expérimentalement à un fort pouvoir cardioprotecteur et neuroprotecteur dans l'infarctus du myocarde et l'arrêt cardiaque [7, 31, 72, 126, 183, 184]. Cette approche sera détaillée dans le prochain chapitre.

E. Mécanismes d'action de l'hypothermie

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le potentiel neuro- et cardioprotecteur de l'hypothermie thérapeutique est maintenant bien établi. Un enjeu majeur reste à présent d'en comprendre les mécanismes afin d'en renforcer ou d'en mimer pharmacologiquement les effets protecteurs.

Jusqu'aux années 2000, il était classiquement admis que l'hypothermie protégeait de l'ischémie par la simple réduction du métabolisme de l'organisme, diminuant ainsi les besoins en oxygène. En effet, selon la loi de Hoff-Arrhenius, la vitesse des réactions chimiques diminue de moitié pour une baisse de la température de 10°C [185]. Une étude de Ehrlich et al.

[186] a montré que l'activité métabolique cérébrale, ainsi que la consommation en oxygène, étaient réduites avec l'hypothermie chez le porc au cours d'un bypass cardio-pulmonaire. L'activité métabolique cérébrale était réduite de moitié pour une température de 28°C, de 81% pour une température de 18°C et de 89% pour une température de 8°C. La préservation énergétique qui découle de ces variations métaboliques étant d'autant plus grande que la température était réduite, les études mécanistiques de l'hypothermie se sont surtout basées sur l'observation des phénomènes intervenant au cours d'hypothermies profondes. Une légère préservation des stocks d'ATP a néanmoins été observée au cours de l'hypothermie modérée chez le lapin [187] et chez le chien [187, 188]. Cependant, Ning et al. ont montré l'existence d'un seuil de significativité concernant cette préservation énergétique pour des températures inférieures à 30-34°C [189]. En effet, sur des cœurs isolés de lapin arrêtés dans une solution de cardioplégie respectivement à 34°C, 30°C, 18°C ou 4°C pendant 120 minutes, les auteurs ont montré une préservation des stocks d'ATP pour les températures de 30, 18 et 4°C mais pas à 34°C. Une autre étude expérimentale réalisée sur des rats soumis à une ischémie-reperfusion cérébrale a montré que malgré une déplétion similaire en ATP, les cerveaux soumis à une hypothermie légère (34°C) présentaient 50% de lésions ischémiques en moins par rapport aux rats dont les cerveaux étaient restés à 36°C pendant l'ischémie [190]. Ces études suggèrent donc l'implication d'autres phénomènes globaux ou plus spécifiques liés à un abaissement de la température.

1. Effets anti-oxydant, anti-inflammatoire et anti-apoptotique de l'hypothermie

En 1995, une étude de Globus et al. [191] a démontré le caractère température-dépendant de la production post-ischémique d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Dans cette étude, la production post-ischémique d'ERO était significativement moins importante chez des rats dont le cerveau était refroidi à 30°C pendant une ischémie cérébrale de 20 minutes que chez des rats dont le cerveau était maintenu à 37°C pendant l'ischémie. L'année suivante, Kil et al. [192] ont fait la même constatation chez des rats soumis à une ischémie-reperfusion cérébrale avec une température per-ischémique dans le cerveau de 30 ou 39°C. Par ailleurs, la diminution de la respiration mitochondriale par ralentissement des flux métaboliques limite également la production d'ERO [193]. Ces phénomènes permettent aux systèmes régulateurs de ne pas être saturés par une production massive d'ERO [194, 195].

En limitant la production de ces ERO, l'hypothermie limite également l'entrée de calcium et protège ainsi les cellules de leur mort [196, 197]. L'hypothermie inhiberait également directement l'activation des caspases responsables des cascades de signalisation entraînant la mort cellulaire par apoptose [198, 199].

L'action anti-inflammatoire de l'hypothermie reste fortement controversée. Ainsi, si une étude de Meybohm et al. [200] a montré dans un modèle d'arrêt cardiaque chez le porc une diminution fortement significative de l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme les IL-1β, 6 et 8, et le TNFα en condition hypotherme, l'étude de Callaway et al. [201] a montré que les concentrations de cytokines circulantes n'étaient pas différentes en conditions hypothermes et normothermes dans un modèle d'arrêt cardiaque chez le rat. Une autre étude a rapporté une augmentation de la concentration d'IL-1α et une diminution de la concentration d'IL-6 dans des cerveaux de souris à 33°C [202]. Chez des patients réanimés d'un arrêt cardiaque et soumis à une hypothermie thérapeutique de 34°C, une augmentation de la concentration en IL-6 a au contraire été observée [203]. Une étude réalisée *in vitro* sur des monocytes humains stimulés par des agents toxiques a aussi montré que l'hypothermie ne faisait que retarder la production de cytokines pro-inflammatoires mais sans en diminuer l'importance [204]. Ce phénomène serait dû à l'activation augmentée et prolongée du facteur de transcription NF-κB en condition d'hypothermie [205-207]. A l'inverse, d'autres études ont montré une diminution de l'activité de NF-κB au cours l'hypothermie [208, 209]. Ces différentes études montrent donc des résultats contradictoires mais le plus souvent en faveur d'un effet anti-inflammatoire de l'hypothermie modérée [210-212].

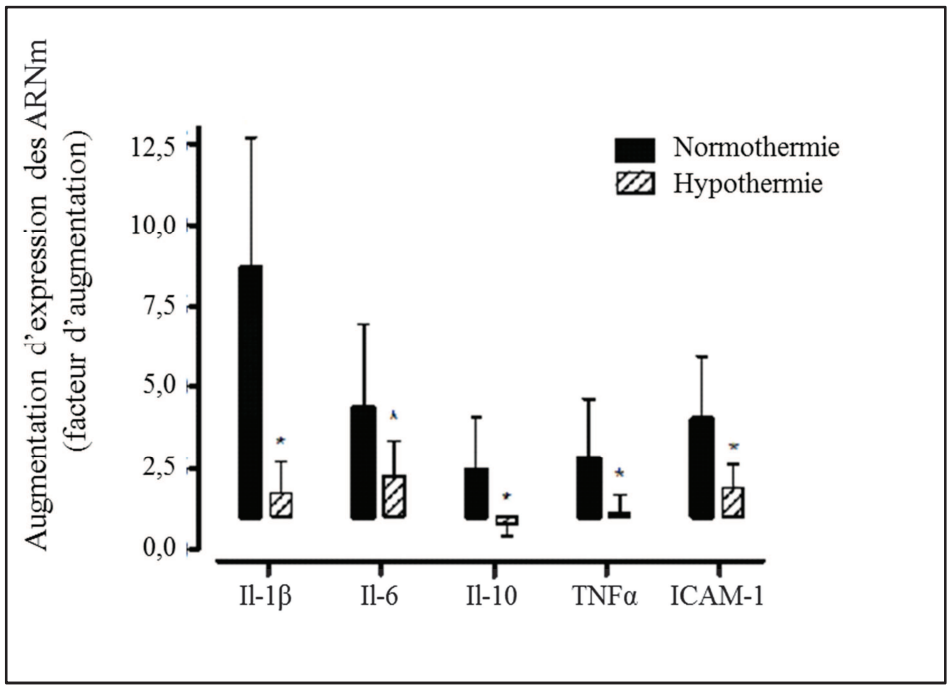

Figure 15 : Comparaison des niveaux d'expression cérébrale de différentes cytokines pro-inflammatoires chez des porcs soumis à un arrêt cardiaque de 7 min en conditions normotherme ou hypotherme. (Adapté d'après [200]). *ICAM-1, intracellular adhesion molecule 1; Il-1β, interleukine 1β; Il-6, interleukine 6 ; Il-10, interleukine 10 ; TNFα, tumor necrosis factor α ; *, p<0,05 par rapport au groupe normotherme.*

2. Mécanismes cardioprotecteurs de l'hypothermie

Les principaux effets hémodynamiques de l'hypothermie sont une diminution de la fréquence cardiaque sans diminution de la pression artérielle moyenne [93, 213]. Un effet inotrope positif s'expliquerait par une augmentation de la sensibilité des myofilaments du sarcomère pour le calcium [214]. Il s'en suit le maintien de la fonction cardiaque malgré la baisse de fréquence permettant d'expliquer les bénéfices fonctionnels de l'hypothermie. En effet, dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le lapin, une hypothermie modérée a permis une récupération totale de la contractilité après 24 h de reperfusion [7]. Cela était associé à une meilleure fonction cardiaque dès la première heure de reperfusion. Cette amélioration n'était pas directement due à la réduction de la taille d'infarctus puisqu'une autre stratégie cardioprotectrice comme le préconditionnement ischémique n'améliorait pas la fonction du myocarde après la reperfusion alors qu'elle réduisait de façon significative la taille d'infarctus

[215, 216]. Ces effets directs de l'hypothermie sur la fonction cardiaque suggèrent aussi une action protectrice contre la sidération post-ischémique. Une autre étude chez le mouton a montré une amélioration par l'hypothermie de la fonction cardiaque après 8 semaines de reperfusion par l'inhibition du phénomène de remodelage ventriculaire post-ischémique [217].

Une autre composante de la cardioprotection à long terme est l'effet bénéfique de l'hypothermie contre le phénomène de *no-reflow* [118, 122]. L'hypothermie instaurée lors de la reperfusion protège en effet l'intégrité de la microcirculation [116], ce qui pourrait aussi participer à une prévention du remodelage ventriculaire post infarctus [45].

Plusieurs voies de signalisation ont été proposées comme médiateurs potentiels de ces effets cardioprotecteurs induits par l'hypothermie modérée [195, 218]. Ces études ont été principalement menées *ex vivo* sur des cœurs isolés de rat ou de lapin et *in vitro* sur des cardiomyocytes isolés soumis à un épisode d'ischémie-reperfusion. Elles ont permis de mettre en évidence l'implication d'éléments de voies de signalisation intracellulaire dont l'activation ou l'inactivation est indispensable pour permettre la cardioprotection induite par l'hypothermie. Ainsi, les travaux de Ning et al. [219] ont montré qu'une cardioplégie froide (30°C) permettait de préserver l'expression mitochondriale de la heat shock protein-70 (HSP-70), de l'adenine nucleotide translocator (ANT-1) et de la béta-F1-ATPase, indépendamment des concentrations résiduelle en ATP ou du métabolisme anaérobie [220]. Ces mêmes auteurs ont également montré qu'une hypothermie modérée (30°C) favorisait l'expression de protéines impliquées dans la survie cellulaire et inhibait l'induction de la protéine p53. Plus récemment, l'inhibition pharmacologique de la protéine Akt ou de la NO-synthase a totalement aboli la diminution de la mort cellulaire par hypothermie sur des cardiomyocytes de souris [221]. Shao et al. ont alors proposé une cascade de signalisation pouvant expliquer la protection induite par l'hypothermie [221]. L'augmentation de la phosphorylation de la *Heat shock protein* 27 entrainerait une activation d'Akt (par phosphorylation) et la production de monoxyde d'azote. Il s'en suivrait une diminution de la production d'ERO et un maintien du potentiel de membrane mitochondrial. De la même façon, une inhibition pharmacologique de la PhosphoInositol-3-kinase (PI3K), du NO ou de l'*Extracellular signal-Regulated Kinase* (ERK) a permis de bloquer l'effet cardioprotecteur de l'hypothermie [222, 223] sur des cœurs isolés de rat et de lapin. L'activateur en amont de ces voies de signalisation intracellulaires n'a pas encore été découvert et l'implication du système nerveux central est improbable puisque l'hypothermie est protectrice sur des cardiomyocytes ou des cœurs isolés.

Espèce/Conditions	Procédure d'hypothermie	Conclusion	Réf.
Cardiomyocytes isolés de souris / hypoxie 90 min	Hypothermie 32°C de 70min d'ischémie à 1h de reperfusion	- Cardioprotection médiée par P-Akt, P-HSP27 et production de NO, attenuation de la production d'ERO, maintien du potentiel de membrane mitochondrial	221
	Hypothermie 32°C pendant l'ischémie jusqu'à 1h de reperfusion	- Cardioprotection médiée par inhibition de mTOR directe ou par AMPK	
Coeurs isolés de lapin / Arrêt cardioplégique à 34°C pendant 120 min	Hypothermie 31°C avant l'arrêt cardioplégique	- Préservation de l'ATP, et des ARNm de ANT1 and β-F1-ATPase - Augmentation des ARNm de HSP70-1	224
Coeurs isolés de lapin / Arrêt cardioplégique pendant 120 min	Hypothermie 30 ou 34°C pendant l'ischémie, reperfusion à 37°C	- Métabolisme anaérobie supprimé à 30°C - Expression élevée de HIF1a, HO1, PPAR-β, Akt-1 à 30°C - Expression diminuée du suppresseur de tumeur p53	220
Coeurs isolés de lapin / 30 min d'OC	Hypothermie 35°C pendant l'ischémie	- Cardioprotection médiée par P-ERK mais pas NO, Akt, ou PKC	223
Coeurs isolés de rat / 30 min d'ischémie globale	Hypothermie 34°C pendant l'ischémie ou à la reperfusion	- Cardioprotection présente avec hypothermie à la reperfusion - Cardioprotection médiée par NO et PI3K.	222
Coeur de lapin *in situ* / 20 min d'OC	Hypothermie 32°C pendant l'ischémie	- Préservation du métabolisme énergétique	187
Coeur de lapin *in situ* / 30 min d'OC	Hypothermie 32°C de la 5ème min d'ischémie à la reperfusion	- Diminution de la formation du PTPm dans la mitochondrie isolée	7
	Hypothermie 32°C pendant l'ischémie	- Cardioprotection non liée aux RCPG de l'adénosine et/ou des opiacés	225

Tableau 5 : Résumé de plusieurs études expérimentales récentes étudiant le mécanisme cardioprotecteur de l'hypothermie (>30°C) dans des modèles expérimentaux d'ischémie myocardique. (Adapté d'après [72]).

AMPK : AMP-activated protein kinase; ANT1 : adenine nucleotide translocase isoform 1; ERO, Espèces réactives de l'oxygène ; HIF1α, hypoxia-inducible factor 1α ; HO1, heme oxygenase 1 ; HSP27, heat shock protein 27; mTOR, mammalian target of rapamycin ; NO, monoxyde d'azote ; OC, occlusion coronaire ; PI3K, Phosphoinositide 3-kinase ; PKC, protéine kinase C ; PPAR-β, peroxisome proliferator-activated receptor-β ; PTPm, pore de transition de perméabilité mitochondrial.

3. Mécanismes neuroprotecteurs de l'hypothermie

Une grande partie de la neuroprotection permise par l'hypothermie découle du ralentissement du métabolisme cérébral par une réduction de la consommation en O_2 et en glucose [226]. En effet, le métabolisme cérébral est diminué de 6 à 10% pour chaque diminution de la température de 1°C [227]. Cette diminution du métabolisme permet, en situation d'hypothermie, de maintenir le rapport apport-besoin en O_2 à une valeur normale malgré la réduction du débit sanguin cérébral [186, 228]. De plus, la baisse du débit sanguin cérébral permet de réduire la pression intracrânienne [105, 229].

L'hypothermie limite aussi le phénomène d'excitotoxicité lié à la libération massive de neurotransmetteurs excitateurs comme le glutamate [230]. D'après une étude expérimentale réalisée chez des rats soumis à un arrêt cardiaque, c'est une diminution de la libération de glutamate qui est mise en jeu lors de l'hypothermie plutôt qu'une augmentation de sa recapture [231]. Cela serait lié à une inhibition de la surcharge calcique neuronale et de la dépolarisation membranaire responsable de la libération de glutamate.

L'hypothermie protège également la barrière hémato-encéphalique (BHE) en empêchant la dégradation de la membrane basale vasculaire [232], des protéines de la BHE [233], et en réduisant l'action des métallo-protéases (MMP) [234, 235]. L'altération de la BHE entraine une augmentation de l'expression d'aquaporine 4 (AQP-4) en partie responsable de l'œdème cérébral. Cette augmentation d'expression de l'AQP-4 est inhibée par la préservation de la BHE, ce qui limite l'œdème et l'hypertension intracrânienne [236].

Les voies de survie mises en évidence dans l'infarctus du myocarde font aussi partie des voies protectrices empruntées par l'hypothermie dans le cerveau. Ainsi, la PI3K et l'Akt sont suractivées au cours de l'hypothermie et leur inactivation est empêchée par l'inactivation de la « Phosphatase and TENsin homolog » (PTEN) [237, 238]. La voie des « Mitogen Activated Protein Kinases » (MAPK) est également fortement impliquée dans la neuroprotection induite par l'hypothermie. L'activation de ERK1/2 a par exemple été proposée dans certaines études [239, 240]. Dans d'autres études, c'est en bloquant l'activité de ERK1/2 que l'hypothermie diminuerait l'inflammation post-ischémique et la mort cellulaire [241]. Une étude de Sawe et al. [242] a d'ailleurs mis en évidence les différents rôles potentiels de ERK1/2. Son activation peut avoir des effets positifs comme ceux observés dans les études précédentes [239, 240] mais également des effets négatifs comme la suractivation de l'inflammation et la libération d'ERO supplémentaires. Ces effets antagonistes seraient dus à la nature du stimulus activant ERK1/2. Ainsi, l'hypothermie activerait les effets bénéfiques de ERK1/2 et diminuerait ses effets

délétères. En diminuant l'activité de JNK [243] ou de p38 [244], l'hypothermie exercerait aussi des effets anti-inflammatoires après une ischémie cérébrale.

La majorité des effets neuroprotecteurs de l'hypothermie seraient donc dus à l'activation de mécanismes cellulaires ubiquitaires mis en jeu lors de l'abaissement de la température, à savoir des mécanismes anti-apoptotiques, anti inflammatoires et anti oxydants.

4. Conclusions

En raison d'un abaissement de la vitesse des réactions métaboliques, l'hypothermie décroît le métabolisme général et la consommation d'O_2. Ces effets sont aussi responsables d'une série d'événements protecteurs à l'origine du concept d'hypothermie thérapeutique. Cependant ces mécanismes d'action font intervenir des voies de signalisation complexes. La reproduction pharmacologique de la protection permise par l'hypothermie thérapeutique ne pourra donc s'appuyer que sur des combinaisons complexes d'agents pharmacologiques.

III. LA VENTILATION LIQUIDE

A. Historique

En cas de déficit congénital ou acquis en surfactant pulmonaire, la tension de surface à l'interface air-liquide dans le poumon se trouve augmentée, rendant la respiration difficile et moins efficace en raison de collapsus alvéolaires [245, 246]. L'administration intra-pulmonaire de liquides a ainsi été proposée pour rétablir la tension à l'interface air-liquide et pour faciliter le recrutement des zones pulmonaires collabées [247], rétablissant une surface d'échange convenable. Faire respirer des liquides à des organismes dotés de poumons semble toutefois relever de la science-fiction. C'est pourtant ce qu'a réalisé le physiologiste Johannes Kylstra en 1962. Après avoir saturé en oxygène une solution de NaCl à 0,9% maintenue à une pression pouvant aller jusqu'à 160 atmosphères, il a testé la capacité de souris à respirer ces liquides de façon spontanée [248]. Les souris soumises à cette expérience ont extrait suffisamment d'oxygène dans cette solution pour survivre quelques heures. Cependant, la difficulté des mouvements respiratoires et l'accumulation sanguine de CO_2 jusqu'à des doses toxiques ont entraîné la mort de ces mammifères par acidose respiratoire. C'est en 1966 que les docteurs Clark et Golan ont réitéré l'expérience en utilisant des liquides capables de dissoudre les gaz respiratoires à pression atmosphérique. Deux milieux liquides ont ainsi été testés : les huiles siliconées et les perfluorocarbones (PFC). Alors que les huiles de silicone se sont avérées toxiques, les perfluorocarbones ont permis de maintenir des souris et des chats en vie sous respiration liquidienne [249]. À nouveau, il a été remarqué que l'élimination du CO_2 n'était pas suffisamment efficace. Certains de ces animaux maintenus immergés pendant une heure ont cependant survécu quelques jours après retour à une respiration aérienne mais tous ont ensuite succombé à une détresse respiratoire. Les autopsies ont montré des lésions pulmonaires chez tous ces animaux. Du fait de leurs grandes viscosité et densité par rapport à l'air, ces liquides demandent en effet un travail respiratoire considérable. Ces expériences ont donc été exclusivement poursuivies chez des animaux anesthésiés, sous ventilation assistée [250, 251].

Figure 16 : Photographie d'une souris totalement immergée dans un perfluorocarbone au-dessus duquel nagent des poissons dans de l'eau.

B. Techniques de ventilation liquide

Les premières expériences de ventilation liquide chez des animaux anesthésiés ont été réalisées de façon très artisanale. Les PFC oxygénés étaient administrés par gravité dans le tube endotrachéal et réaspirés par drainage dans un récipient situé sous l'animal [252]. Aujourd'hui, la ventilation liquide peut se faire selon deux modalités dépendant du fait qu'elle soit partielle ou totale [253].

Lors d'une ventilation liquide partielle (VLP), la capacité résiduelle fonctionnelle du poumon est remplie de PFC et constitue une pression positive téléexpiratoire liquide. Les poumons continuent alors d'être ventilés à l'aide d'un ventilateur gazeux conventionnel qui renouvelle l'oxygénation des PFC. Cette technique requiert l'ajout régulier de PFC selon son rythme d'évaporation. Certains PFC étant très volatiles, le réajustement du volume de liquide dans les poumons doit donc être parfaitement maîtrisé afin d'éviter d'induire des volotraumas.

La ventilation liquide totale (VLT) consiste à remplir totalement les poumons et la trachée de PFC. Cette technique nécessite l'utilisation d'un respirateur spécifiquement dédié permettant l'instillation et l'aspiration cyclique des liquides. Aucun ventilateur liquidien n'est encore disponible à ce jour pour une utilisation clinique, c'est pourquoi la VLT est uniquement étudiée de façon expérimentale. Seuls quelques prototypes sont disponibles dans certains centres de recherche [254, 255].

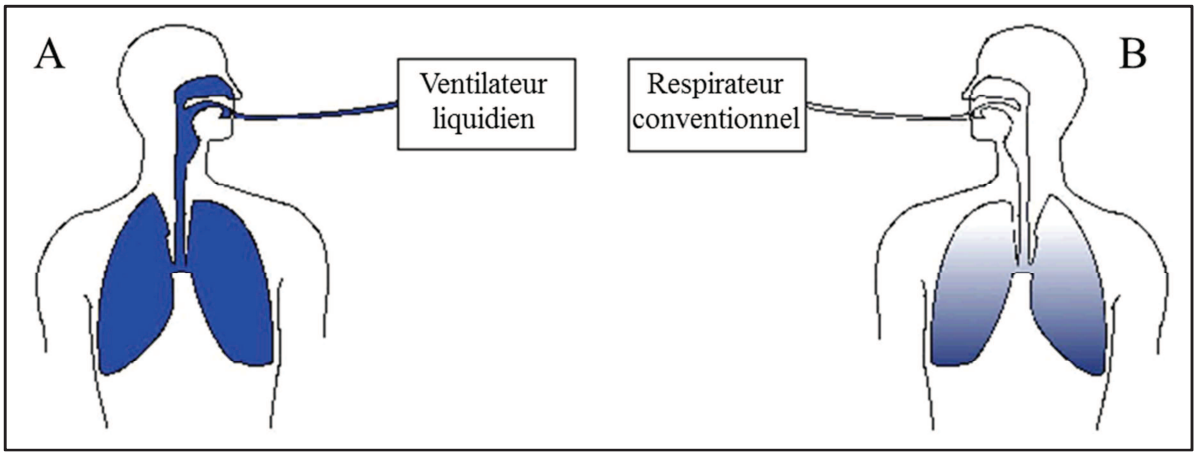

Figure 17 : Représentation schématique du mode de fonctionnement de la ventilation liquide totale (A) et de la ventilation liquide partielle (B). *La couleur bleue représente les perfluorocarbones.*

C. Propriétés physico-chimiques des PFC

Les PFC ont été initialement synthétisés pendant le développement de la bombe atomique (« *the Manhattan project* ») pour contrer les attaques chimiques. Leur nom de code était « *Joe's stuff* » [256]. Il s'agit d'hydrocarbures dont les atomes d'hydrogène ont été substitués par des atomes de fluor. Les propriétés physico-chimiques de ces liquides sont présentées dans le tableau suivant.

Liquide	Densité à 25°C (g/cm3)	Viscosité à 25°C (mm^2/s=cS)	Pression de vapeur à 25°C (mmHg=Torr)	Tension de surface à 25°C (dynes/cm)	Point d'ébullition (°C)	Solubilité de l'O_2 (ml/L)
Eau	1	1	24	72	100	30
Rimar 101 (Perfluorobutyltetra-hydrofurane/ Perfluoropropyltetra-hydropyrane)	1,77	0,85	31,6	15	102	522
PP2 (Perfluoromethyl-cyclohexane)	1,79	0,87	107	1,62	76	500
APF-140 (Perfluorodecalin)	1,95	2,61	4,4	15	142	403
Liquivent (Perflubron)	1,93	1,00	5,2	18	140,5	527
FC-40 (Fluorinert)	1,85	2,20	3,0	16	155	370

Tableau 6 : Propriétés physico-chimiques de différents PFC par rapport à l'eau.

Par rapport à l'eau, ces liquides ont une densité élevée et une tension de surface très faible. Leur forte capacité à dissoudre l'oxygène et le dioxyde de carbone en a fait des liquides intéressants pour l'assistance respiratoire puisqu'ils étaient capables d'abolir l'interface air-liquide dans le poumon tout en y maintenant les échanges gazeux normaux [257]. Du fait de leur grande viscosité, certains PFC comme le perfluorodécalin peuvent toutefois se distribuer de façon hétérogène dans les poumons et augmenter les risques de piégeage d'air au fond des alvéoles. Ce phénomène appelé « *air trapping* » a été décrit par Ricard et al. [258] qui ont visualisé par imagerie « scanner » des poumons de rats remplis avec des doses croissantes de PFC.

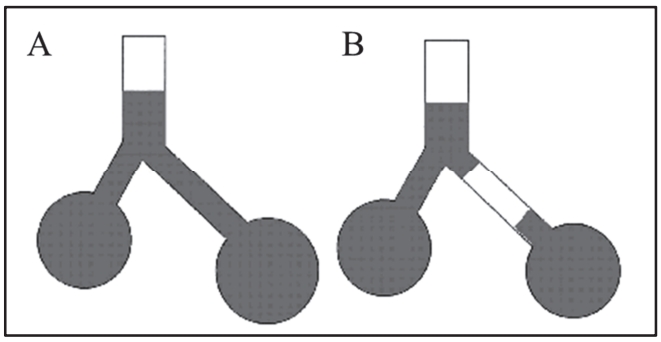

Figure 18 : Représentation schématique du phénomène de « *trapping* ». *Le remplissage normal est présenté en A. Le « trapping » de bulles d'air entraînant une diminution de la surface alvéolaire efficace est illustré en B.*

D. Le PFC et le respirateur liquidien idéaux

Pour une application respiratoire, le PFC utilisé doit répondre aux critères essentiels listés ci-dessous [259] :

- Forte capacité de solubilisation de l'oxygène et du dioxyde de carbone (les PFC linéaires dissolvent mieux l'oxygène que les PFC cycliques [260]).
- Densité suffisante pour se distribuer naturellement dans les poumons et recruter les territoires atélectasiés.
- Tension de surface faible pour agir comme un substitut de surfactant et améliorer la compliance pulmonaire.
- Tolérance et inertie biologique, absence de métabolisation.

Différents symposia internationaux ont eu pour objectif de réunir les spécialistes de la ventilation liquide. Une conférence de consensus a permis d'élaborer un cahier des charges pour le développement d'un ventilateur liquidien adapté à l'utilisation clinique de la ventilation liquide totale [261]. Les points essentiels de ce cahier des charges sont listés ci-dessous :

- Deux pompes doivent assurer respectivement l'inspiration et l'expiration du liquide dans le poumon. Ces pompes peuvent être péristaltiques [262] ou à piston [263]
- Des valves régulent le sens de circulation du fluide selon la phase du cycle ventilatoire.

- Une filtration des PFC assure leur asepsie.
- Un condensateur limite l'évaporation des PFC.
- Un oxygénateur permet de saturer les PFC en oxygène et un échangeur thermique permet de contrôler la température des PFC.
- Les paramètres ventilatoires (pression, volumes, fréquence) doivent être finement mesurés et contrôlés.

Plusieurs prototypes de ventilateur liquidien sont actuellement en phase d'industrialisation, par exemple au Canada pour un usage pédiatrique [254].

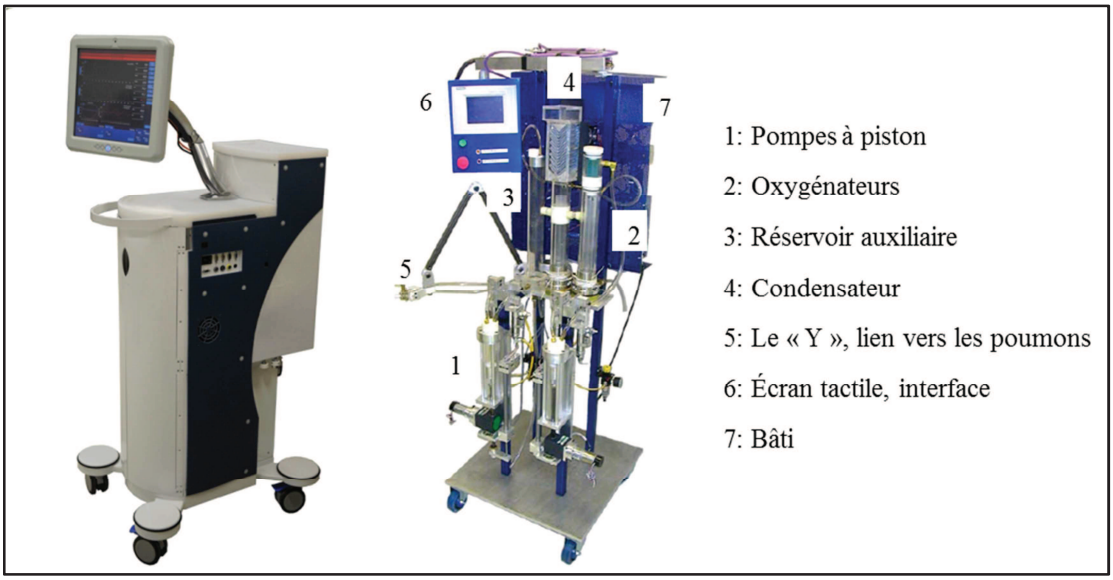

Figure 19 : Prototype de ventilateur liquidien INOLIVENT®.

E. Applications médicales

Lors d'affections respiratoires, l'utilisation de la ventilation par les PFC a montré une capacité d'amélioration des échanges gazeux compte tenu de leur forte densité et d'un recrutement alvéolaire [264]. La compliance pulmonaire est augmentée du fait de l'abolition de l'interface air-liquide. Des études ont aussi relevé un effet anti inflammatoire des PFC [265, 266]. Enfin, la ventilation liquide peut permettre un lavage broncho-alvéolaire [267] et favorise la synthèse de surfactant [268].

1. Applications respiratoires

a) Néonatologie

Une cause fréquente de mortalité néonatale est l'apparition d'une détresse respiratoire due à l'immaturité du poumon et à un défaut de surfactant. Une hernie diaphragmatique peut aussi être la cause de détresse respiratoire chez le nouveau-né. Des études expérimentales mais aussi cliniques ont été consacrées l'effet d'une ventilation liquide totale ou partielle dans ces affections.

Les études expérimentales ont toutes montré une augmentation de l'oxygénation pulmonaire au cours d'une VLP dans des modèles animaux de détresse respiratoire du nouveau-né [269, 270]. Dans leur étude, Hirschl et al. ont comparé la VLT à la VLP. Seule la VLP a montré une augmentation de la compliance pulmonaire [270]. Quatre études cliniques en 1996 ont aussi étudié la VLP chez des nouveau-nés prématurés [271] ou non [272-274]. Les résultats obtenus dans les études expérimentales ont été confirmés, à savoir l'amélioration de l'oxygénation et l'augmentation de la compliance pulmonaire. Dans l'étude de Leach et al., la pression partielle en O_2 dans l'artère pulmonaire était augmentée de 138% et la compliance pulmonaire de 61% par rapport aux valeurs initiales avant instauration de la VLP [271]. Ces résultats ont été confirmés l'année suivante par une autre étude clinique incluant des nouveaux-nés prématurés [275]. Ces études cliniques n'ont cependant porté que sur des effectifs très limités. D'autres études à plus grande échelle sont nécessaires pour mettre en évidence une éventuelle amélioration significative de la survie chez les patients soumis à une VLP.

La VLT a également été étudiée en néonatologie, principalement par l'équipe de Hirschl qui a montré une amélioration des échanges gazeux et de la compliance pulmonaire mais également une réduction des hémorragies alvéolaires, de l'œdème pulmonaire et de l'infiltration de macrophages inflammatoires dans des modèles animaux [274]. Une autre étude expérimentale a comparé la VLT à une solution contenant du surfactant pour effectuer un lavage bronchoalvéolaire dans un modèle ovin du syndrome d'aspiration de méconium [276]. La VLT a montré une meilleure efficacité pour extraire le méconium injecté dans les poumons des agneaux. Seules deux publications cliniques successives d'une même équipe de recherche ont utilisé la VLT chez des nouveaux-nés prématurés [277, 278]. Dans la première en 1989, un bébé a été inclus. Des périodes de trois minutes de VLT ont été intercalées avec la ventilation mécanique conventionnelle. Les liquides étaient instillés par gravité et réaspirés de la même façon. Dans la deuxième étude, deux autres bébés ont été soumis au même protocole. Chez

deux de ces trois enfants, l'oxygénation du poumon était améliorée. Chez les trois, la compliance pulmonaire était meilleure. Les trois enfants sont morts dans les 19 heures suivantes mais cela a été attribué à des statuts cliniques initiaux catastrophiques plutôt qu'à un échec de la VLT. Comme pour la VLP, des études de plus grande envergure sont nécessaires, mais le facteur limitant reste la nécessité de pouvoir développer un respirateur liquidien adapté à un usage clinique.

b) Détresse respiratoire de l'adulte

Le syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA) chez l'adulte se différentie du syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né par ses causes, mais les principales caractéristiques physiopathologiques sont communes : perte de surfactant, atélectasie et diminution de la compliance pulmonaire. La VLP et la VLT ont été également étudiées dans ce syndrome.

Chez l'animal, c'est la VLP qui a fait l'objet du plus grand nombre d'essais [251, 279-283]. Dans chacune de ces études, l'oxygénation et la compliance pulmonaire ont été améliorées. Papo et al. ont par exemple induit une détresse respiratoire chez 18 porcs par injection d'acide oléique (0.15 mL/kg iv) [282]. Chez les dix animaux soumis à une VLP après l'apparition de la détresse respiratoire, la pression partielle artérielle en O_2 a augmenté de 7 à 20 kPa après 15 minutes de VLP. L'oxygénation s'est encore améliorée au cours du suivi de ces animaux. Aucune amélioration n'a au contraire été observée chez les animaux soumis à la ventilation gazeuse conventionnelle. La compliance était aussi significativement améliorée après une heure de VLP alors qu'elle restait inchangée chez les 8 animaux du groupe contrôle. Dans cette étude, la survie a aussi été améliorée chez les animaux soumis à la VLP. Huit animaux sur 10 (80 %) ont ainsi survécu par rapport à 2 animaux sur 8 (25 %) dans le groupe témoin. Les survivants ont été euthanasiés après 3 h de VLP ou de ventilation conventionnelle. Cela ne renseigne donc pas sur la survie à long terme des animaux soumis à une VLP transitoire. L'examen histologique des poumons a montré une tendance à l'atténuation des lésions pulmonaires chez les animaux soumis à la VLP. Seules certaines régions étaient hémorragiques, oedématiées et infiltrées de macrophages. Chez les animaux du groupe témoin, ces zones lésées s'étendaient sur tous les lobes du poumon. Ces résultats encourageants ont mené à l'élaboration de diverses études cliniques pour étudier l'intérêt de la VLP lors de SDRA [284, 285]. La plus grande étude clinique a été menée par le groupe pharmaceutique Alliance. En tout, 311 patients atteints de SDRA ont été inclus dans cette étude multicentrique (56 centres en Europe, au Canada et aux Etats-Unis d'Amérique). Ils ont

été répartis de façon aléatoire dans trois groupes. Un groupe témoin était ventilé « normalement » sans remplissage des poumons par le PFC. Deux groupes étaient soumis à une VLP par le perfluorocarbone (Perflubron) administré à deux volumes différents pendant 90 h en moyenne. Les résultats de cette étude ont été partiellement discutés en 2005 [286] puis intégralement publiés en 2006 [285]. Cette étude n'a montré aucune augmentation de la survie à 28 jours dans les groupes soumis à une VLP par rapport au groupe témoin. Les pourcentages de mortalité étaient respectivement de 15%, 26% et 19% dans les groupes Témoin, VLP à bas volume et VLP à fort volume. De plus, une plus forte tendance à l'apparition de pneumothorax et d'épisodes d'hypotension ou d'hypoxie a été observée chez les patients soumis à une VLP. Plusieurs limites de cette étude pourraient expliquer cet échec. En effet, le protocole s'appuyait sur des modifications fréquentes et fortes de la pression positive en fin d'expiration (PEEP), aboutissant à des phénomènes de recrutement/dérecrutement majeurs. Un manque de précision dans le contrôle de l'évaporation du PFC a également mené à un réajustement fréquent et imprécis du volume de PFC pouvant induire des volo/barotraumas. De plus, les déconnexions-reconnexions répétées de la sonde endotrachéale au respirateur expliquent peut-être en partie les épisodes hypoxiques observés chez les patients soumis à une VLP. Cette étude a conduit à l'arrêt des essais cliniques sur la VLP chez l'adulte.

Les études portant sur la VLT dans le SDRA sont moins nombreuses et toutes de nature expérimentale [287, 288]. Dans les deux principales études, une détresse respiratoire a été induite chez des moutons par injection d'acide oléique. Les deux études ont mis en évidence une amélioration des « gaz du sang » et de la compliance pulmonaire des moutons adultes soumis à une VLT. La VLT semble donc offrir un meilleur support respiratoire dans les syndromes de détresse respiratoire que la ventilation mécanique gazeuse conventionnelle mais des études de survie après retour à une ventilation spontanée sont encore nécessaires. Aucune étude clinique n'a étudié la VLT dans le SDRA en raison de l'absence de ventilateur adéquat. De plus, les résultats négatifs des études cliniques portant sur la VLP ont fortement freiné le développement d'autres études sur la ventilation liquide.

2. Applications non respiratoires

a) Induction d'une hypothermie thérapeutique

Les poumons présentent une grande surface d'échange et un débit sanguin maximal. Ces propriétés en font un échangeur thermique idéal. La ventilation liquide avec des PFC refroidis peut donc utiliser cet espace pulmonaire pour refroidir le sang et par conséquent l'ensemble de l'organisme. La VLT permet théoriquement un refroidissement plus rapide que la VLP ou que des lavages par le PFC. Lors d'une VLP, les PFC persistent dans le poumon où ils sont oxygénés. Ils sont donc sujets à un réchauffement alors que la circulation des PFC en VLT permet un renouvellement des PFC refroidis. Des lavages avec des PFC ont permis la réduction de la température corporelle de 38 à 35°C en 38 minutes chez des jeunes lapins [289]. Par comparaison, Shaffer et al. ont montré en 1984 que la VLT avec des PFC à 10°C permettait de réduire la température corporelle au rythme de 9°C/h chez des chats anesthésiés [290]. La VLT a également permis de diminuer la température sanguine atriale de 38 à 32°C en moins de 5 minutes [184]. Dans cette étude, les lapins étaient soumis à une occlusion coronaire de 30 min pendant laquelle ils étaient refroidis par ventilation liquide totale ou maintenus sous respiration gazeuse normotherme. D'autres lapins ont été soumis à une hypothermie induite par VLT à partir de la reperfusion. Chez les lapins soumis à une VLT pendant l'occlusion coronaire, cette hypothermie rapide a permis une puissante cardioprotection puisque la taille d'infarctus représentait 4,0 ± 0,5% de l'aire à risque par rapport à 42,5 ± 4,9% chez des lapins normothermes. La VLT hypothermisante initiée à la reperfusion n'a en revanche pas permis de réduction significative de la taille d'infarctus. Le groupe de Kerber a également étudié l'effet hypothermisant de la VLT au cours d'un arrêt cardiaque expérimental chez des porcs [170, 291]. Dans la première étude [291], les porcs ont été soumis à un arrêt cardiaque de 11 minutes par fibrillation ventriculaire sans ventilation gazeuse (groupe Témoin) ou avec une VLT hypothermisante (groupe VLT-hypo) ou normotherme (groupe VLT-normo). La RCP a été entreprise après 11 minutes d'arrêt cardiaque. Le but était d'obtenir une reprise d'activité circulatoire spontanée (RACS). Dans le groupe VLT-hypo, la température de 33°C a été atteinte en 6 minutes et 9 animaux sur 11 ont atteint une RACS. Huit animaux sur 11 ont atteint une RACS dans le groupe VLT-normo par rapport à 3 sur 11 dans le groupe Témoin (Figure 17).

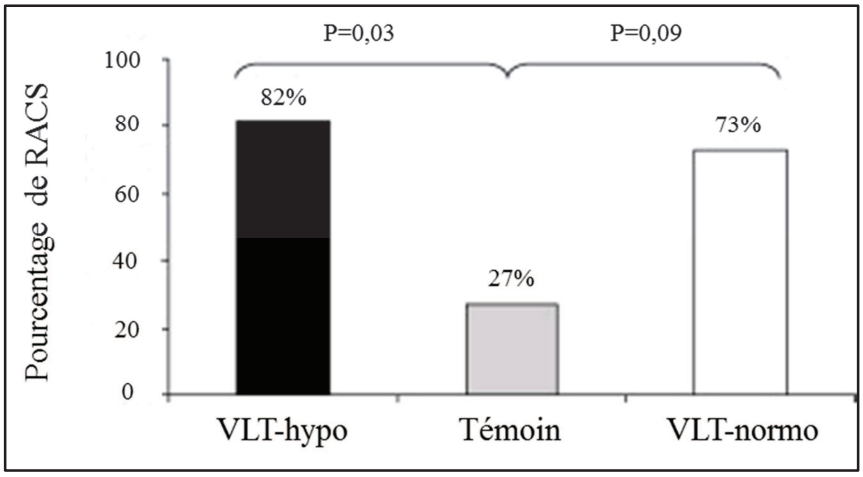

Figure 20 : Pourcentage d'obtention d'une RACS dans les différents groupes expérimentaux de porcs soumis à 11 minutes d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire, sous ventilation gazeuse (Témoin) ou liquide normotherme ou hypotherme (respectivement VLT-normo et VLT-hypo). Adapté d'après [291].

Dans une deuxième étude conduite par les mêmes auteurs [170], des porcs ont été soumis à 11 minutes d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire sans autre traitement (groupe Témoin) ou avec une hypothermie induite par VLT (groupe VLT) ou par perfusion de NaCl à 0,9% à 4°C (30 mg/kg, i.v., groupe NaCl) à partir de la 8ème min de fibrillation. La RCP a été entreprise après 11 min d'arrêt cardiaque. Au début de la RCP, les températures artérielles pulmonaires dans les groupes Témoin, VLT et NaCl étaient respectivement 37,0 ± 0,2 °C, 35,8 ± 0,4 °C et 34,9 ± 0,4 °C. La pression de perfusion coronaire durant les trois premières minutes de la CPR était significativement plus élevée dans le groupe VLT par rapport aux deux autres groupes. Une RACS a été obtenue chez 7 animaux sur 8 dans le groupe VLT par rapport à 2 animaux sur 8 dans le groupe NaCl et 1 animal sur 8 dans le groupe Témoin.

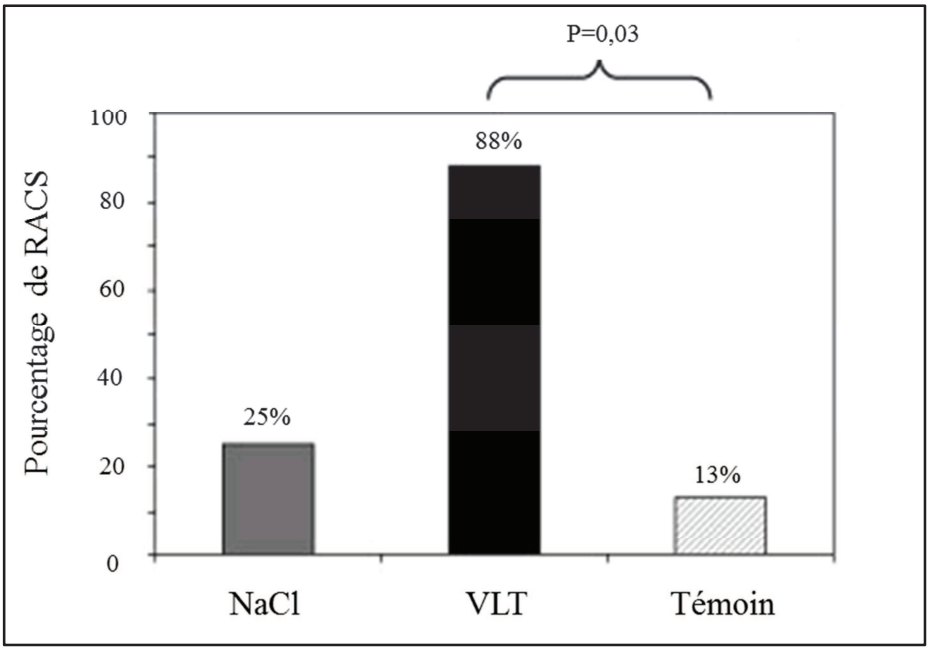

Figure 21 : Pourcentage d'obtention d'une RACS dans les différents groupes expérimentaux de porcs soumis à 11 minutes d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire en conditions Témoin ou avec une hypothermie induite par ventilation liquide totale (VLT) ou par une perfusion d'une solution de NaCl à 4°C (NaCl) à partir de la 8ème minute d'arrêt cardiaque, (Adapté d'après [170]).

b) Autres applications

Outre les applications respiratoires ou hypothermisantes, la ventilation liquide pourrait être utilisée pour favoriser la distribution de médicaments par voie intra-pulmonaire. La radio-opacité de certains PFC peut être aussi utilisée en imagerie diagnostique dans les poumons. Le perflubron contenant un atome de Brome pourrait en effet être utilisé comme agent de contraste.

3. Risques liés à la ventilation liquide

Plusieurs complications en relation avec l'utilisation de la ventilation liquide ont été décrites. Des volo/barotraumas et perfluorothoraxes peuvent survenir si aucun dispositif ne permet un contrôle précis des paramètres ventilatoires [274]. En ventilation liquide, la présence de liquide incompressible dans le poumon peut aussi compromettre le retour veineux, entraînant une instabilité hémodynamique [292]. L'élimination du CO_2 peut être difficile compte

tenu du faible coefficient de diffusion du CO_2 [293]. Un bouchon de mucus pulmonaire peut aussi obstruer la sonde endotrachéale [274]. Enfin, la radio-opacité de certains PFC peut interférer avec des examens d'imagerie utilisant des produits de contraste [294].

4. Conclusions

La ventilation liquide par les perfluorocarbones semble donc être une méthode de refroidissement très originales, relativement peu invasive et aux effets secondaire limités. Initialement développée dans le cadre de la dysfonction respiratoire par défaut de surfactant ou dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë, elle représente un moyen « d'utiliser » le poumon comme échangeur thermique tout en maintenant les échanges gazeux normaux et ainsi d'induire un refroidissement ultra-rapide. Cette application éventuelle de la ventilation liquide totale hypothermisante dans le traitement du syndrome post-arrêt cardiaque n'en est encore qu'au stade expérimental, comme nous allons le décrire plus loin.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

I. OBJECTIFS DE LA THESE

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'induction d'une hypothermie thérapeutique modérée (32-34°C) procure une protection puissante au cours de situations d'ischémie-reperfusion comme l'infarctus du myocarde ou l'arrêt cardiaque. Les deux enjeux majeurs de la recherche sur l'hypothermie thérapeutique sont donc d'en comprendre les mécanismes et de développer des techniques capables de refroidir l'organisme entier rapidement. Au cours de ce travail de thèse nous avons donc étudié une technique de refroidissement très rapide par la ventilation liquide totale de PFC. Lorsque nous avons commencé les travaux, les effets cardioprotecteurs de l'hypothermie et la capacité de la ventilation liquide totale à produire une hypothermie rapide étaient déjà bien établis. Nous l'avons donc abordée tout d'abord sous l'angle de son mécanisme d'action dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le lapin. Par la suite, nous avons étudié le bénéfice qu'elle pouvait procurer en comparaison avec une autre technique hypothermisante dans deux modèles différents d'arrêt cardiaque chez le lapin, c'est-à-dire avec ou sans infarctus du myocarde sous-jacent.

Le but de notre premier travail a donc été d'étudier les voies de signalisation intracellulaire susceptibles de médier le pouvoir cardioprotecteur de l'hypothermie thérapeutique. Comme nous l'expliquerons plus loin, notre hypothèse était que l'inhibition pharmacologique des récepteurs aux opiacés et à l'adénosine pouvait abolir l'effet cardioprotecteur de l'hypothermie chez des lapins soumis à une occlusion coronaire.

Dans notre second travail, nous avons comparé les effets d'une hypothermie induite par VLT ou par la perfusion de fluides froids sur la survie et la récupération neurologique post-arrêt cardiaque dans un modèle de fibrillation ventriculaire chez le lapin. Dans ce modèle, la fibrillation ventriculaire survenait sur un cœur initialement sain. Dans un troisième travail, nous avons donc aussi étudié l'effet de la VLT lors d'un arrêt cardiaque survenant sur un cœur où l'on a provoqué une insuffisance coronaire chez des lapins chroniquement instrumentés.

II. MATERIEL ET METHODES

A. Conditions générales des expériences

Les travaux présentés dans cette thèse ont été conduits dans l'équipe 3 de l'unité INSERM U955 de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), au sein de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA).

1. Aspect règlementaire

Toutes les expériences ont été menées conformément à la législation française régissant l'expérimentation animale (agrément de l'établissement A94-043-13). Les procédures anesthésiques, chirurgicales et d'euthanasie ont fait l'objet de l'accord du comité d'éthique régional n°16 (ANSES-ENVA-UPEC).

2. Animaux

Tous les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés sur des modèles d'infarctus du myocarde ou d'arrêt cardiaque chez des lapins mâles de race New Zealand et de poids évoluant entre 2,5 et 3,5 kg (Centre de Production Animale, Olivet, France). Une période d'adaptation minimale de 5 jours a été respectée entre l'arrivée des animaux et leur inclusion dans les protocoles expérimentaux. Nous présenterons successivement les méthodes utilisées pour chaque protocole expérimental.

B. Modèle d'infarctus du myocarde

1. Protocole d'occlusion-reperfusion coronaire

Les animaux ont été anesthésiés par un mélange de zolazépam (25mg/kg i.v.) et de tilétamine (25mg/kg i.v.). Ils ont ensuite été intubés par voie endotrachéale. Une administration intraveineuse de pentobarbital (20 mg/kg) a induit une dépression respiratoire suffisante pour permettre une ventilation artificielle par un respirateur adapté (Minerve, Esternay, France), avec un volume courant de 32 ml et une fréquence de 26 cycles/min. Trois électrodes cutanées ont été fixées afin de suivre l'ECG pendant toute la durée du protocole. Une thoracotomie latérale gauche a été effectuée au niveau du 4ème espace intercostal. Après péricardotomie, une sonde thermique a été implantée dans l'atrium gauche (Thermalert TH-5, Physiotemp, Clifton, Etats-Unis) et une branche majeure de l'artère coronaire gauche a été

identifiée dans la région latéro-postérieure du ventricule gauche. Comme l'illustre la Figure 22, un fil de suture Prolène 4/0 (F1803, Ethicon, Neuilly, France) a été passé autour de cette artère pour former un lasso dont les chefs étaient insérés dans une courte tubulure en polypropylène. Le lasso a été serré afin de produire une occlusion coronaire totale. L'ischémie myocardique ainsi induite a été confirmée par l'apparition d'une cyanose myocardique régionale et un sus-décalage du segment ST de l'ECG. Après 30 min d'occlusion coronaire, le lasso a été relâché et la courte tubulure retirée afin d'initier la reperfusion coronaire. Un nœud lâche et non occlusif a été formé avec les extrémités du fil de Prolène afin de permettre le repérage ultérieur de l'artère précédemment occlue (Figure 23). La paroi thoracique a ensuite été refermée par plans successifs et le pneumothorax a été évacué. Les animaux ont été maintenus anesthésiés et ventilés pendant les 4 h de reperfusion.

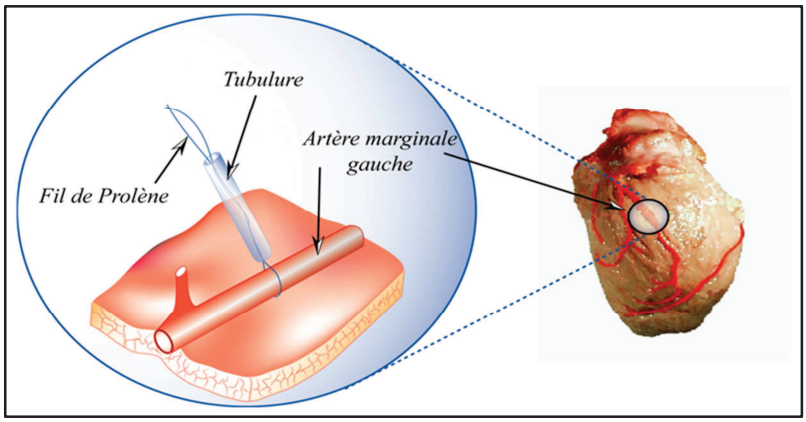

Figure 22 : Schéma illustrant la localisation du lasso d'occlusion coronaire autour d'une artère coronaire gauche d'un cœur de lapin.

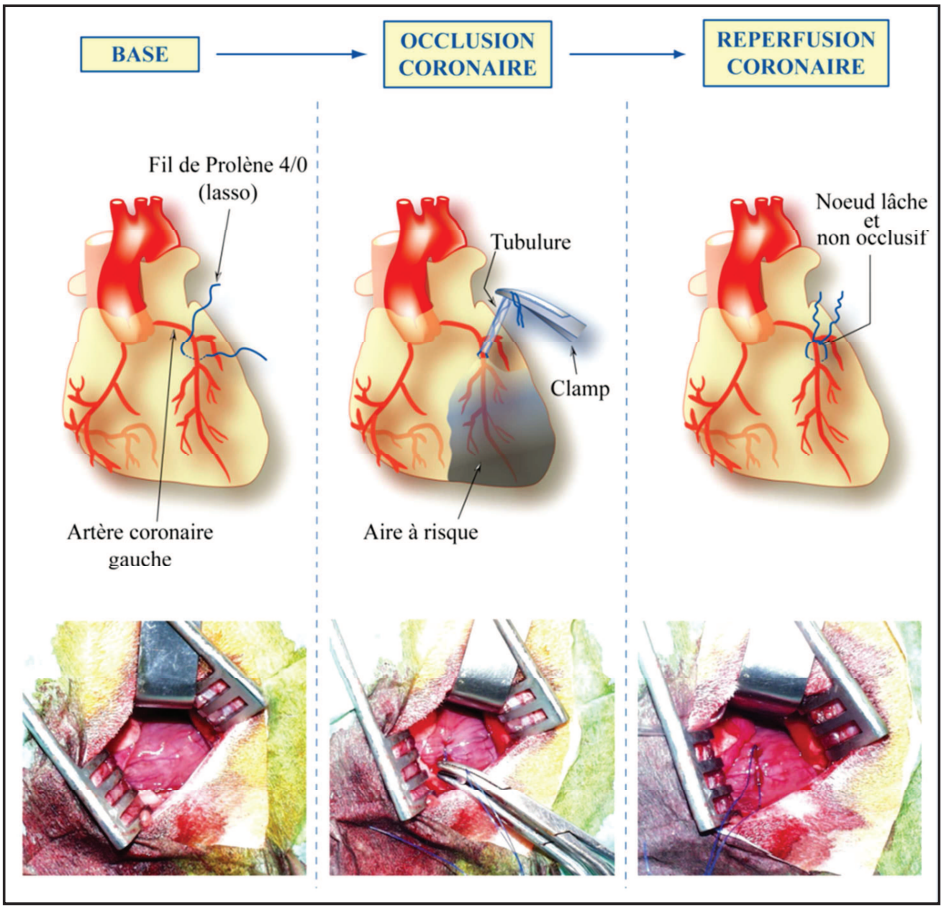

Figure 23 : Représentation schématique du protocole chirurgical d'occlusion-reperfusion coronaire.

2. Paramètres mesurés

a) Paramètres hémodynamiques et températures

L'ECG des animaux a été recueilli tout au long de l'intervention chirurgicale grâce à des électrodes cutanées reliées à un amplificateur (Gould Instruments Inc., Cleveland, OH, Etats-Unis). La fréquence cardiaque a été calculée à partir du signal ECG. La pression artérielle systémique a été mesurée grâce à un cathéter introduit dans l'artère de l'oreille et connecté à un capteur de pression (Statham P23ID, Statham Instruments, Oxnard, CA, Etats-Unis). La pression artérielle moyenne (PAM) a été calculée à partir des pressions artérielles systolique et diastolique (respectivement PAS et PAD). Les signaux électrocardiographiques et de pression artérielle ont été visualisés, enregistrés et analysés à l'aide du logiciel d'acquisition et de traitement du signal HEM 3.5 (Notocord Systems, Croissy-sur-Seine, France). La fréquence cardiaque et la pression artérielle ont ainsi été régulièrement mesurées

avant, durant et après l'occlusion coronaire. La température rectale des lapins a également été mesurée régulièrement ainsi que la température sanguine dans l'atrium gauche.

b) Analyses post-mortem

Après 4 h de reperfusion post-ischémique, le thorax des animaux a été réouvert et un cathéter a été implanté dans l'atrium gauche. Une solution de thioflavine à 4% (1,5 ml/kg i.v.) a été administrée dans l'atrium gauche en vue de rendre fluorescent le territoire myocardique perfusé. Les animaux ont ensuite été euthanasiés par l'administration intraveineuse d'une dose létale de pentobarbital sodique (60 mg/kg). Le cœur a alors été immédiatement excisé. Après ligature de l'artère coronaire à l'endroit ayant servi à induire l'occlusion coronaire, une solution de bleu Alcyan à 1 % (Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France) a été perfusée de façon rétrograde dans l'aorte. Le myocarde a ainsi été coloré en bleu, à l'exception de la zone rendue préalablement ischémique et dénommée ci-après « aire à risque ». Le ventricule gauche a ensuite été isolé et coupé en 6-8 tranches de 2-3 mm, toutes pesées individuellement. Les coupes ont été photographiées sous un éclairage par une lampe de Wood (UV 365 nm), afin de détecter d'éventuelles zones non perfusées (*no reflow*) et donc non fluorescentes, témoignant des lésions microvasculaires dues à l'ischémie. Les coupes ont ensuite été incubées dans une solution de chlorhydrate de triphényltétrazolium à 1% (TTC ; Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France) pendant 10 min à 37°C. Ce réactif a la propriété de colorer le myocarde non infarci (viable) en rouge et de faire apparaître macroscopiquement les zones infarcies en blanc.

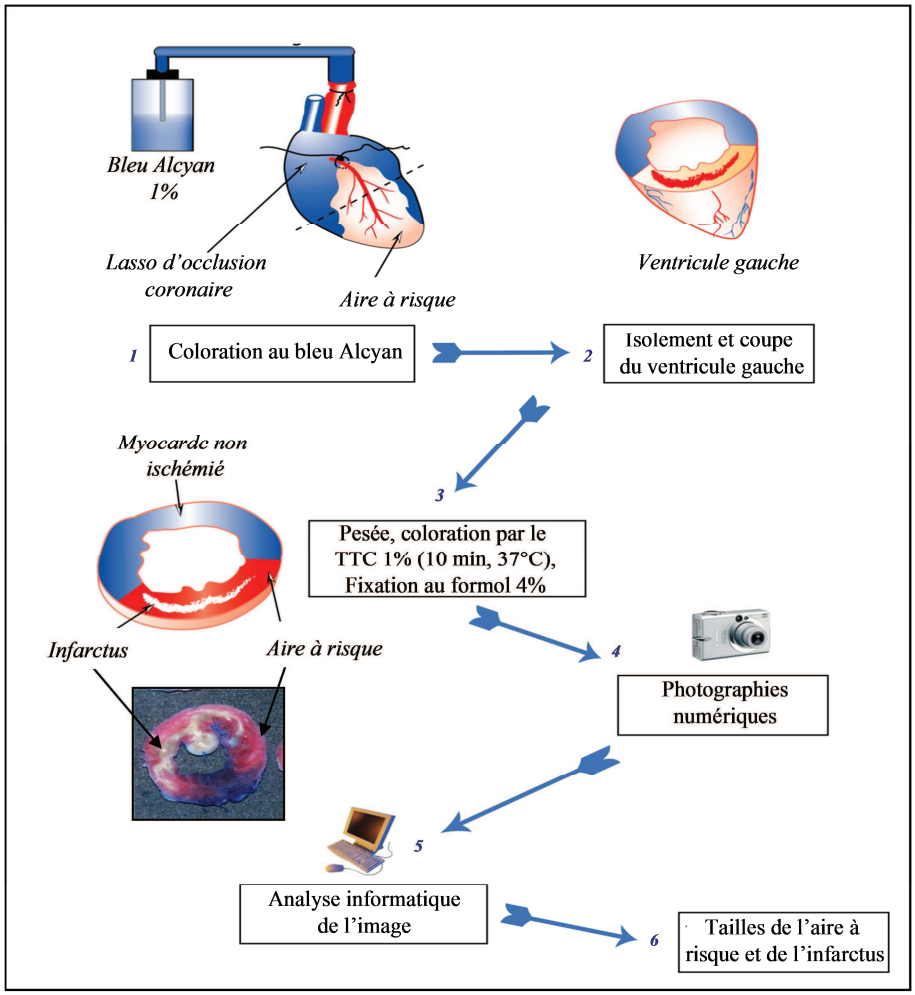

Figure 24 : Analyse post-mortem pour la détermination des tailles de l'aire à risque et de l'infarctus. *TTC: chlorhydrate de triphényltétrazolium*.

Après fixation par le formol (4%) pendant 24 h, chaque coupe de myocarde a été de nouveau photographiée sous un éclairage normal. Sur ces coupes, la zone non ischémiée apparaissait en bleu, la zone infarcie en blanc et la zone ischémiée mais non infarcie en rouge. Une analyse informatique de l'image (Image J, NIH, Frederick, Etats-Unis) a permis de mesurer les surfaces de l'aire à risque, de la zone infarcie et du *no-reflow* sur chaque tranche et de calculer leur poids correspondant. Les poids totaux de l'aire à risque, de l'infarctus et du *no-reflow* ont ensuite été calculés.

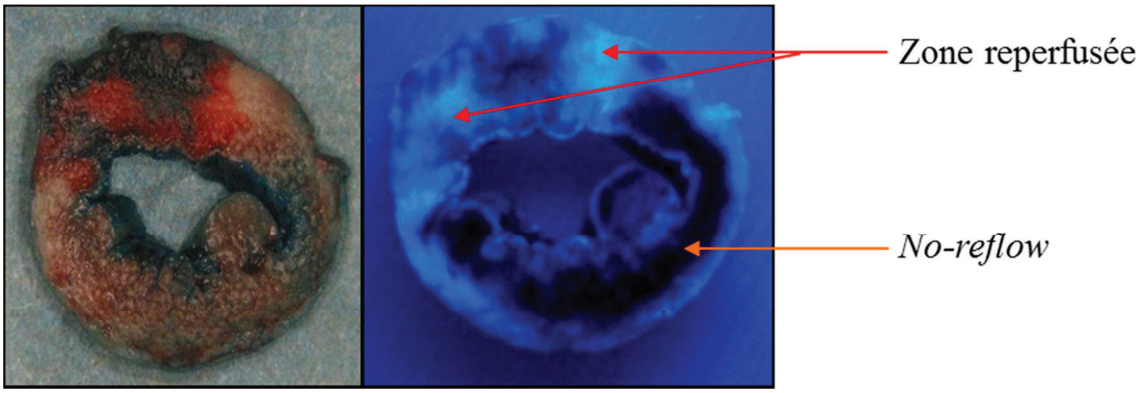

Figure 25 : Photographie sous lumière normale (à gauche) et sous lumière UV (à droite) d'une coupe transversale de ventricule gauche provenant d'un lapin soumis à une occlusion-reperfusion coronaire après administration dans l'atrium gauche de thioflavine S.

C. Modèle d'arrêt cardiaque sur cœur « sain »

1. Préparation chirurgicale

Comme décrit précédemment les animaux ont été anesthésiés, intubés et ventilés artificiellement. Une paralysie musculaire a été induite par l'administration de pancuronium (Pavulon®, 200 mg/kg i.v.). Deux électrodes ont été respectivement introduites dans l'œsophage et fixées sous la peau au niveau du 4ème espace inter-costal pour l'induction ultérieure d'une fibrillation ventriculaire. Ces électrodes ont été retirées après l'induction de l'arrêt cardiaque.

2. Protocole d'arrêt cardiaque et de réanimation cardiopulmonaire

Après l'instrumentation des animaux, une fibrillation ventriculaire a été induite par le passage d'un courant alternatif de 10V/4mA entre les électrodes œsophagienne et sous-cutanée. La stimulation électrique a été maintenue pendant 2 min afin d'éviter une conversion spontanée en rythme sinusal. La ventilation artificielle était interrompue dès la survenue de la fibrillation et tout au long de la période d'arrêt cardiaque. La durée de l'arrêt cardiaque a été fixée à 5 ou 10 min en fonction des protocoles expérimentaux, au terme desquelles une réanimation cardiopulmonaire était entreprise par l'institution d'un massage cardiaque manuel et la reprise de la ventilation artificielle. Une minute après le début de cette réanimation, des chocs électriques externes (5-10 J/kg) étaient réalisés à l'aide d'un défibrillateur manuel. Si

nécessaire, les chocs étaient répétés à intervalle de 1-2 min ainsi que des administrations d'adrénaline (20 µg/kg i.v.). Si aucune reprise d'activité cardiaque n'était observée après 15 min de réanimation, l'animal était considéré comme mort. Chez les animaux réanimés, la reprise d'une activité cardiaque spontanée a été définie comme l'apparition d'un rythme supraventriculaire spontané associé à une pression artérielle systolique de plus de 40 mmHg pendant au moins une minute. L'administration d'adrénaline était permise pendant les 7 premières heures suivant la reprise de cette activité cardiaque de façon à maintenir la pression artérielle moyenne à environ 80 mmHg. Le sevrage de la ventilation mécanique et le réveil des animaux étaient permis dès que possible après l'arrêt cardiaque.

3. Paramètres mesurés

a) Paramètres hémodynamiques et températures

Tout au long du protocole expérimental, nous avons recueilli et enregistré l'ECG et la pression artérielle selon une procédure identique à celle détaillée pour le modèle précédent. Ces mesures ont été réalisées régulièrement durant les 8 h suivant l'arrêt cardiaque puis 1 et 7 jours plus tard chez les animaux ayant survécu. La fréquence cardiaque et la pression artérielle moyenne ont à nouveau été calculées. Les températures centrale, œsophagienne et tympanique ont été mesurées tout au long du protocole expérimental à l'aide de sondes reliées à un thermomètre électronique (Harvard Apparatus, Paris, France).

Les animaux ayant survécu pendant 7 jours après l'arrêt cardiaque ont été réanesthésiés et ventilés selon les procédures anesthésiques présentées plus haut. Un cathéter de conductance a été introduit dans l'artère carotide droite et remonté dans le ventricule gauche dans le but d'évaluer la fonction ventriculaire gauche après connexion à un transducteur (VSL Pressure-Volume Control Unit, Scisense, London, ON, Canada). La pression ventriculaire gauche systolique maximale, la pression télédiastolique ventriculaire gauche et les maxima et minima de la dérivée première de cette pression en fonction du temps (dP/dt) ont été calculés.

b) Paramètres biochimiques sanguins

Des prélèvements sanguins artériels ont été réalisés à différent temps après l'arrêt cardiaque afin d'évaluer le pH sanguin et les pressions artérielles partielles en O_2 et CO_2 à l'aide d'un automate spécifique (ABL77, Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Danemark). Les concentrations sanguines en lactates ont également été déterminées (Accutrend Plus,

Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Les concentrations plasmatiques en créatinine et en alanine aminotransferase ont aussi été évaluées (Prestige 24i, Tokyo-Boehi, Japan), ainsi que la concentration en troponine I (laboratoires IDEXX, Alfortville, France).

c) Survie et paramètres d'évaluation de la fonction neurologique

La survie des animaux a été évaluée durant les 7 jours suivant l'arrêt cardiaque. Au terme de ces 7 jours, les animaux ont été réanesthésiés pour l'évaluation des pressions ventriculaires gauches puis pour leur euthanasie et le prélèvement de leurs organes.

Chez les animaux ayant survécu à l'arrêt cardiaque, des examens cliniques quotidiens ont été réalisés afin d'évaluer la dysfonction neurologique. Ces examens s'appuyaient sur l'évaluation des réflexes, des réactions posturales et du comportement des animaux. Un score de dysfonction était attribué selon une grille préalablement validée dans la littérature (déficit neurologique de 0-10% = normal ; 100% = mort cérébrale). Lorsqu'un animal présentait un score de dysfonction neurologique de plus de 60% durant plus de 48 h après l'arrêt cardiaque, il était euthanasié pour raison éthique, en considérant que ses chances de survie étaient extrêmement faibles.

Evaluation	Score maximal anormal
Niveau de conscience	**25**
Normal	*0*
Prostré	*5*
Stupeur	*10*
Comateux	*25*
Respiration	**5**
Normale	*0*
Anormale	*5*
Nerfs craniens	**7**
Absence de la vue	*1*
Absence du reflexe photomoteur droit	*0,5*
Absence du reflexe photomoteur gauche	*0,5*
Absence du reflexe oculocephalique	*1*
Absence de reflexe cornéen droit	*0,5*
Absence de reflexe cornéen gauche	*0,5*
Absence de sensation faciale	*1*
Absence de l'ouie	*1*
Absence du réflexe de déglutition	*1*
Fonction sensorielle et motrice	**14**
Absence de la sensation de douleur des antérieures	*2*
Absence de la sensation de douleur des postérieures	*2*
Absence du réflexe de redressement aux antérieures	*5*
Absence du réflexe de redressement aux postérieures	*5*
Allure de la démarche	**25**
Normale	*0*
Ataxie minimale	*5*
Ataxie modérée	*8*
Ataxie sévère	*12*
Peut se lever (maintien en position sternale)	*15*
Ne peut pas se lever	*20*
Pas de mouvements utiles	*25*
Comportement	**24**
Ne fait pas sa toilette	*4*
Ne boit pas	*10*
N'explore pas (10) ou peu (5)	*10*
Plus mauvais score possible	**100**

Tableau 7 : Grille d'évaluation neurologique chez le lapin [295].

d) Analyses post-mortem et histologie

A la fin du protocole expérimental, les animaux étaient euthanasiés. Leurs cœur, poumons, reins, cerveau et foie ont été prélevés pour analyse par un anatomopathologiste. Pour chaque organe, un score de sévérité lésionnelle a été attribué (*vide infra*).

D. Modèle d'arrêt cardiaque sur cœur ischémique

1. Instrumentation chirurgicale

Comme décrit précédemment, les animaux ont été anesthésiés. Dans des conditions d'asepsie rigoureuses, une bague de débit (PS-Series Probes, Transonic, NY, USA) a été placée autour de l'aorte ascendante. Un ballonnet pneumatique a été placé autour d'une artère coronaire pour l'induction ultérieure d'une occlusion coronaire. Une électrode a été implantée sur la cage thoracique en regard du coeur pour l'induction ultérieure d'une fibrillation ventriculaire. Le thorax a été refermé et les animaux ont bénéficié d'une période de récupération post-chirurgicale (10-14 jours) pendant laquelle ils ont reçu les soins nécessaires (buprénorphine, flunixine méglumine, enrofloxacine).

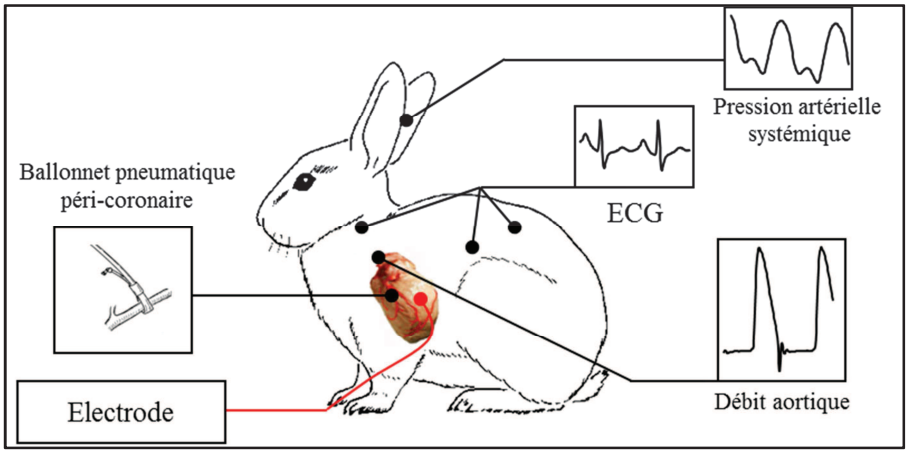

Figure 26 : Représentation schématique de l'instrumentation chirurgicale des animaux.

2. Protocole d'arrêt cardiaque et de réanimation cardiopulmonaire

Après récupération post-chirurgicale, les lapins ont été anesthésiés une seconde fois selon le même protocole. L'ECG et la pression artérielle des animaux ont été recueillis

comme décrit plus haut, de même que le débit cardiaque grâce au capteur implanté. Une occlusion coronaire a été induite par gonflement du ballonnet péri-coronaire implanté. Deux minutes après le début de l'occlusion coronaire, l'arrêt cardiaque a été provoqué par fibrillation ventriculaire par passage d'un courant électrique entre l'électrode thoracique et une autre électrode insérée dans l'œsophage. Après 8 min d'arrêt cardiaque, la réanimation cardio-pulmonaire a été entreprise comme décrit dans le modèle précedent. La reperfusion coronaire a été induite par dégonflement du ballonnet péri-coronaire après 40 min.

3. Paramètres mesurés

Le débit et la fréquence cardiaques, la pression artérielle moyenne et les températures corporelles ont été évalués régulièrement au cours des 8 h suivant l'arrêt cardiaque puis le premier et le 7ème jour suivant l'arrêt cardiaque chez les survivants.

Comme dans le modèle précédent, les survivants ont été réanesthésiés 7 jours après l'arrêt cardiaque et soumis à une cathétérisation pour évaluation de la pression ventriculaire gauche systolique maximale, de la pression télédiastolique ventriculaire gauche et des maxima et minima de la dérivée première de cette pression en fonction du temps (dP/dt). Cela a également été réalisé chez des animaux non soumis à l'arrêt cardiaque (groupe « Sham »).

Le pH sanguin et les pressions artérielles partielles en O_2 et CO_2 ont été mesurés à différent temps après l'arrêt cardiaque à l'aide d'un automate spécifique à partir de prélèvements sanguins artériels (Epoc Reader, Epocal, Inc., Ottawa, Canada). Les concentrations plasmatiques en lactates, lactate déshydrogénase (LDH), créatinine et alanine aminotransferase (ALAT) ont aussi été évaluées, ainsi que la concentration en troponine I (laboratoires IDEXX, Alfortville, France).

La survie et la fonction neurologique ont été évaluées selon la procédure décrite précédemment, à l'aide de la grille d'évaluation neurologique adaptée au lapin.

A la mort de chaque animal, le cœur, les poumons, le cerveau, le foie et les reins ont été prélevés pour analyse par un anatomopathologiste (Pr. P. Bruneval, INSERM U430). La taille d'infarctus a été mesurée sur les cœurs à l'aide d'une coloration au TTC comme décrit précédemment pour le modèle d'infarctus du myocarde (Figure 24).

E. Procédure de ventilation liquide totale

Tous ces travaux expérimentaux ont eu pour but d'étudier la VLT. Dans tous les cas, la VLT a été instaurée chez les animaux préalablement anesthésiés, intubés et soumis à une paralysie neuromusculaire par l'administration de pancuronium (Pavulon®, 200 µg/kg i.v.). Le poumon était alors partiellement rempli par l'administration intra-trachéale de 10 ml/kg de perfluorocarbones. En fonction des travaux, les perfluorocarbones utilisés étaient le Fluorinert® (3M, Cergy, France) ou le perfluorodécalin. Après remplissage des poumons, la sonde endotrachéale des animaux était connectée au ventilateur liquidien dont nous disposons au laboratoire. Ce prototype est constitué d'un réservoir de perfluorocarbones avec un système d'oxygénation par bullage. Le ventilateur liquidien possède également deux pompes péristaltiques et un alternateur d'ouverture permettant l'instillation et la réaspiration successive et régulière du perfluorocarbone. Lors de nos expériences, ce liquide était amené à la température souhaitée par un échangeur thermique placé en amont de la sonde endo-trachéale. La fréquence ventilatoire était fixée à 5-6 cycles / min et le volume courant était ajusté de manière à maintenir des échanges gazeux optimaux (~15 ml/kg). Lors d'une VLT hypothermisante, les perfluorocarbones étaient initialement placés à une température de 15-20°C pour réduire rapidement la température corporelle à 32°C. Ils étaient ensuite réchauffés progressivement de façon à les maintenir à cette température. Lors d'une VLT normotherme, les perfluorocarbones étaient maintenus à une température d'environ 38°C. A la fin de l'épisode de VLT les perfluorocarbones étaient éliminés du poumon par gravité. La sonde endotrachéale était ensuite reconnectée au respirateur artificiel conventionnel.

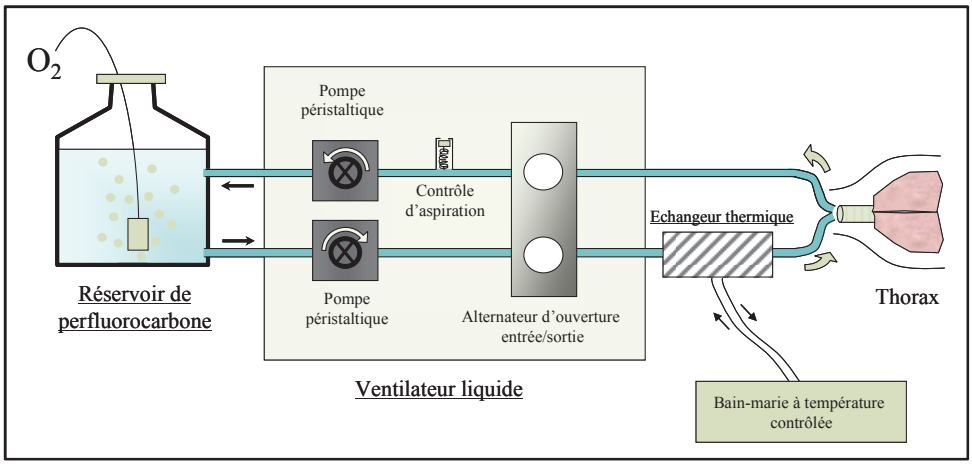

Figure 27 : Schéma illustrant le prototype de ventilateur liquide total.

F. Analyses histologiques

En fonction des travaux expérimentaux, le cœur, les poumons, le cerveau, le foie et/ou les reins ont été prélevés pour analyses histologiques. Dans le cas des poumons, ils ont été fixés par perfusion intratrachéale de formaldéhyde (10%). Les prélèvements provenant des différents organes ont été inclus en paraffine et coupés en tranches de 5 µm. Après coloration par un mélange hématoxyline-éosine-safran, ces tranches ont été observées au microscope à faible et fort grossissements (x 5 à x 20). Un système de score allant de 0 à 3 a été utilisé pour évaluer en aveugle la sévérité des lésions histologiques observées (0 = normal ; 3 = lésion très sévère). Pour le cerveau, le score attribué correspondait à la moyenne des scores obtenus pour le cervelet, l'hippocampe et le cortex.

G. Analyses statistiques

Dans la première étude, les tailles d'aire à risque et d'infarctus ont été exprimées respectivement en pourcentage du poids du ventricule gauche et de l'aire à risque. La taille du *no reflow* a été exprimée en pourcentage de l'aire à risque puis en pourcentage de la taille d'infarctus. Toutes les valeurs ont été exprimées en moyenne ± SEM. Une analyse de la variance à deux facteurs pour mesures répétées a été utilisée pour comparer les valeurs de températures et les paramètres hémodynamiques entre les différents groupes expérimentaux tout au long du protocole. Cela était suivi si nécessaire d'une comparaison *post-hoc* aux valeurs correspondantes dans le groupe Témoin à l'aide d'un test PLSD de Fisher. Par ailleurs, les tailles d'aire à risque, d'infarctus et de *no reflow* ont été comparées entre les groupes par une analyse de la variance à un facteur, suivie si nécessaire d'une comparaison à la valeur correspondante dans le groupe Témoin par un test PLSD de Fisher. Le seuil de significativité a été fixé à $p<0,05$.

Dans la deuxième étude, les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. Les paramètres hémodynamiques et biochimiques ont été comparés entre les différents groupes par une analyse de la variance à deux facteurs pour mesures répétées. Une comparaison *post-hoc* aux valeurs correspondantes dans le groupe Témoin à l'aide d'un test t de Student avec une correction de Bonferonni a été réalisée si nécessaire. Dans chaque groupe expérimental, la dysfonction neurologique et les scores histologiques ont été comparés à la valeur correspondante dans le groupe Témoin à l'aide d'un test non paramétrique de Mann-Whitney.

Dans la troisième étude, les données ont été exprimées en moyenne ± écart type. La normalité de la distribution a été testée à l'aide de l'analyse de Komogorov-Smirnov. Les paramètres normalement distribués ont été comparés entre les groupes par une analyse de variance à un facteur à des temps sélectionnés car le nombre d'animaux n'était pas le même selon les temps. Une comparaison à la valeur correspondante dans le groupe Témoin par un test PLSD de Fisher a ensuite été réalisée. Pour les paramètres dont la distribution n'était pas normale ainsi que pour les scores de dysfonction neurologique et de lésions histologiques, la comparaison a été faite à l'aide d'un test non paramétrique de Kruskall-Wallis, suivi par une analyse de Mann-Whitney.

Dans tous les cas, les courbes de survie ont été obtenues à l'aide d'une analyse de Kaplan-Meier et la comparaison entre les groupes a été réalisée avec un test log-rank. Le seuil de significativité a été fixé à $p<0,05$.

III. RESULTATS

A. Etude du mécanisme cardioprotecteur de l'hypothermie.

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

Darbera L, Chenoune M, Lidouren F, Ghaleh B, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A, Tissier R, 2012. *Adenosine and opioid receptors do not trigger the cardioprotective effect of mild hypothermia*. J Cardiovasc Pharmacol Ther 17(2):173-180.

1. Introduction

Comme cela a été expliqué dans la synthèse bibliographique, le refroidissement *in vivo* du myocarde jusqu'à 32-34°C est une stratégie cardioprotectrice très puissante pour diminuer expérimentalement la taille de l'infarctus du myocarde. Le mécanisme de l'action cardioprotectrice de l'hypothermie modérée a été beaucoup moins étudié que celui de l'hypothermie profonde utilisée en chirurgie cardiaque et pour la préservation d'organe (< 20°C). S'il est probable qu'une préservation énergétique en ATP soit impliquée [187], ce simple mécanisme est considéré comme insuffisant pour expliquer l'ampleur de la protection procurée [220]. L'activation de voies de signalisation impliquant le monoxyde d'azote (NO), la protéine kinase C (PKC) et l'Akt a en effet été proposée sur des cardiomyocytes de souris [221] mais le mécanisme de cette activation reste inconnu. Sur des cœurs isolés de lapin, l'inhibition pharmacologique de ERK est aussi capable de bloquer l'effet cardioprotecteur de l'hypothermie [223]. Ces mêmes éléments de signalisation sont également impliqués dans les phénomènes de pré- et postconditionnement. Dans ce contexte, ils sont activés par des récepteurs couplés aux protéines Gi tels que les récepteurs à l'adénosine (A_1 et A_2) ou aux opiacés (κ et δ). Nous avons donc formulé l'hypothèse que la stimulation de ces récepteurs puisse également être impliquée dans l'effet protecteur de l'hypothermie modérée. Cette hypothèse était d'autant plus séduisante que ces voies pharmacologiques de la cardioprotection sont aussi impliquées dans le phénomène d'hibernation chez certaines espèces animales [296]. La concentration extracellulaire en adénosine augmente également lors d'une hypothermie chez le rat [297]. L'objectif de ce travail a donc été d'évaluer si la stimulation des récepteurs aux opiacés et/ou des récepteurs à l'adénosine était impliquée dans l'effet cardioprotecteur de l'hypothermie contre l'infarctus. Pour ce faire, nous avons évalué l'effet

d'une inhibition pharmacologique de ces récepteurs sur la cardioprotection induite par la ventilation liquide totale hypothermisante sur un modèle d'infarctus du myocarde chez le lapin.

2. Protocole expérimental

Cette étude a été conduite sur le modèle expérimental d'infarctus du myocarde par occlusion coronaire chez des lapins anesthésiés. Comme l'illustre la Figure 28, les animaux ont été aléatoirement répartis en 12 groupes expérimentaux soumis à une occlusion coronaire de 30 min et à 4 h de reperfusion. Le groupe Témoin n'a fait l'objet d'aucune procédure supplémentaire particulière. Les lapins du groupe VLT ont fait l'objet d'une hypothermie instaurée par ventilation liquide totale de la 5ème min à la 25ème min d'occlusion coronaire. Dix minutes avant l'occlusion coronaire, les groupes Nal, SPT et Nal+SPT ont respectivement reçu une administration intraveineuse d'un antagoniste des récepteurs aux opiacés, la naloxone (Nal, 6 mg/kg i.v; Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France), d'un antagoniste des récepteurs à l'adénosine, la 8-sulfophenylthéophylline (SPT, 20 mg/kg i.v. ; Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France) ou de l'association de ces deux substances. Les groupes VLT+Nal, VLT+SPT et VLT+Nal+SPT ont fait l'objet d'une ventilation liquide totale hypothermisante associée à l'administration respective de naloxone, de SPT ou de ces deux substances. Les groupes Morphine et Morphine+Nal ont reçu une administration intraveineuse de morphine (0,3 mg/kg ; Renaudin, Itxassou, France), respectivement sans et avec administration concomitante de naloxone. Les groupes CPA et CPA+SPT ont reçu une administration intraveineuse de N^6-cyclopentyladénosine 10 mg © (CPA, 100 µg/kg ; Renaudin, Itxassou, France), respectivement sans et avec administration concomitante de SPT. Les doses de morphine et de naloxone ont été choisies d'après la littérature comme étant capables d'induire respectivement une réduction de la taille d'infarctus et une inhibition de cette protection après 30 min d'occlusion coronaire chez le rat et le lapin. La dose de CPA a été choisie d'après une étude préliminaire du laboratoire comme étant susceptible d'induire une réduction de la taille d'infarctus après 30 min d'occlusion coronaire chez le lapin. La dose de SPT a été choisie sur sa capacité à bloquer les effets hémodynamiques hypotenseurs de la dose choisie d'adénosine (études préliminaires non publiées). Tous ces agents pharmacologiques ont été administrés 10 min avant l'occlusion coronaire pour permettre une stabilisation des paramètres hémodynamiques.

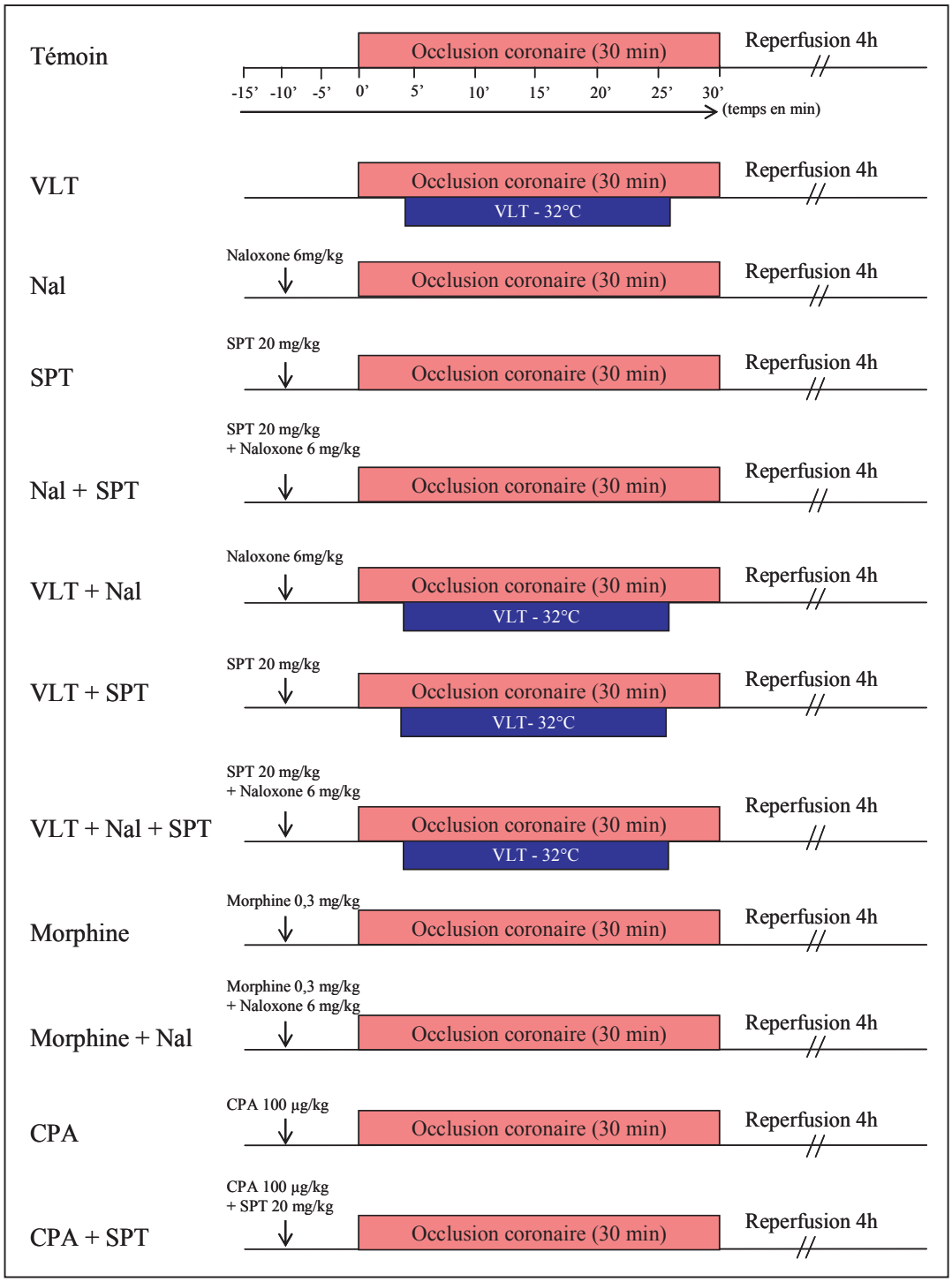

Figure 28 : Protocole expérimental. *VLT, Ventilation liquide totale ; Nal, Naloxone ; SPT, 8-sulfophenyltheophylline ; CPA, N6-cyclopentyladénosine.*

3. Principaux résultats

a) Effectifs

Dans cette étude, 80 lapins ont été initialement inclus dans le protocole. Quatre lapins sont morts par fibrillation ventriculaire avant la fin du protocole expérimental, respectivement dans les groupes Témoin, SPT+Nal, VLT+SPT et CPA. Finalement, 76 lapins ont complété l'ensemble du protocole et ont été répartis aléatoirement dans les 12 groupes expérimentaux. Huit lapins ont finalement été étudiés dans les groupes Témoin et VLT. Dans tous les autres groupes, l'effectif d'animaux étudiés était de 6 lapins par groupe.

b) Températures et hémodynamique

Les températures rectale et atriale gauche n'étaient pas significativement différentes entre les différents groupes avant l'occlusion coronaire. Elles n'étaient également pas significativement différentes entre les groupes non soumis à une VLT tout au long du protocole expérimental. Elles étaient en revanche significativement réduites au cours de l'occlusion coronaire et pendant la première heure de reperfusion dans tous les groupes soumis à une VLT hypothermisante par rapport au groupe Témoin (Tableau 1 de la publication ci-après). À titre d'exemple, les températures atriales gauches étaient respectivement de 32,5±0,3°C, 32,1±0,3°C, 31,8±0,4°C et 32,3±0,4°C à la 25ème min d'occlusion coronaire dans les groupes VLT, VLT+Naloxone, VLT+SPT et VLT+Naloxone+SPT par rapport à 37,8±0,3°C dans le groupe Témoin.

La fréquence cardiaque et la pression artérielle moyenne n'étaient pas significativement différentes entre les différents groupes avant l'occlusion coronaire. La fréquence cardiaque n'était également pas différente entre les groupes Naloxone, Morphine, Morphine+Naloxone, SPT, Naloxone+SPT et Témoin tout au long du protocole (Tableau 2 de la publication ci-après). En revanche, l'induction de l'hypothermie au cours de l'occlusion coronaire dans les groupes VLT, VLT+Naloxone, VLT+SPT et VLT+Naloxone+SPT ainsi que l'administration de CPA dans les groupes CPA et CPA+SPT étaient associées à une réduction significative de la fréquence cardiaque par rapport au groupe Témoin. La pression artérielle moyenne n'était en revanche pas significativement différente entre les groupes tout au long du protocole.

c) Tailles d'aire à risque, d'infarctus et de no-reflow

Comme le montre le Tableau 3 de la publication ci-après, les tailles d'aire à risque, exprimées en pourcentage du ventricule gauche, n'étaient pas significativement différentes entre les groupes.

Comme l'illustre la Figure 29, la taille d'infarctus exprimée en pourcentage de l'aire à risque était significativement réduite par l'induction per-ischémique d'une hypothermie à 32°C par ventilation liquide (9±3%, groupe VLT) par rapport au groupe Témoin (55±2%). En revanche, elle n'était pas significativement modifiée par l'administration de naloxone (54±3%, groupe Nal), de SPT (55±5%, groupe SPT) ou de ces deux substances (54±3%, groupe Nal+SPT). La taille d'infarctus était aussi significativement réduite par l'administration pré-ischémique de morphine (37±8%, groupe Morphine) ou de CPA (38±6%, groupe CPA) par rapport au groupe Témoin. L'administration de naloxone a aboli la réduction de la taille d'infarctus dans le groupe Morphine+Nal (55±4%) mais pas dans le groupe VLT+Nal (16±3%). De même, l'administration de SPT a aboli la réduction de la taille d'infarctus dans le groupe CPA+SPT (54±2%) mais pas dans le groupe VLT+SPT (10±2%). Enfin, l'administration concomitante de ces deux antagonistes n'a pas aboli la réduction de la taille d'infarctus permise par l'hypothermie dans le groupe VLT+Nal+SPT (6±4%). Comme l'illustre la Figure 30, des résultats similaires ont été observés sur la taille du *no-reflow*, à l'exception d'une absence de protection dans les groupes Morphine et CPA.

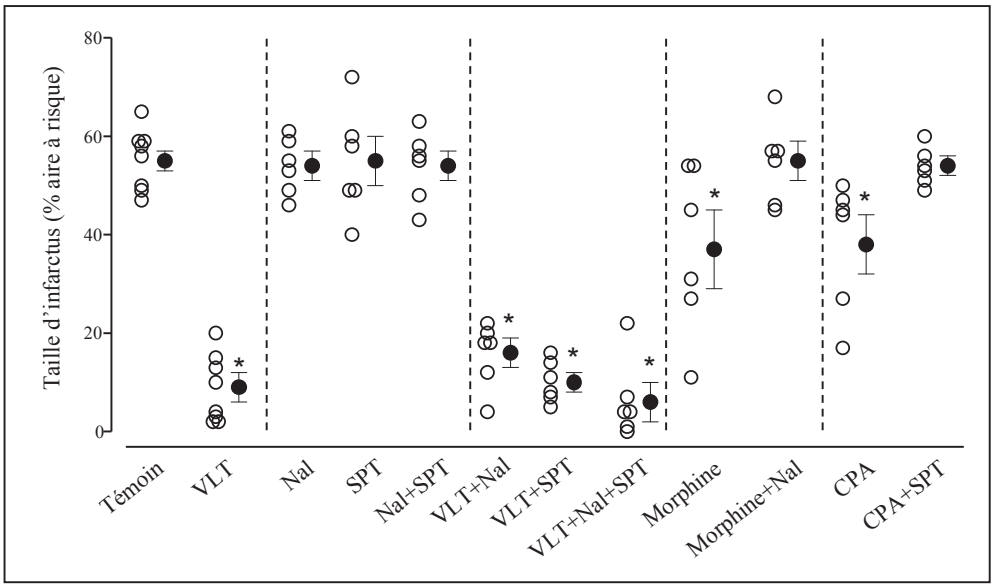

Figure 29 : Tailles d'infarctus exprimées en pourcentage de l'aire à risque dans les différents groupes expérimentaux.**, p<0,05 vs Témoin ; VLT, Ventilation liquide totale ; Nal, Naloxone ; SPT, 8-sulfophenyltheophylline ; CPA, N^6-cyclopentyladénosine.*

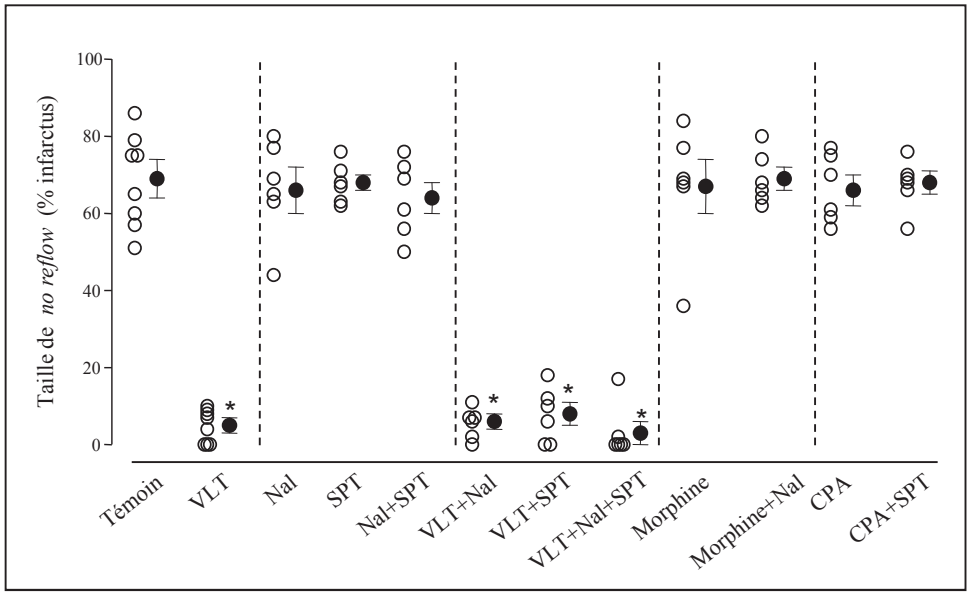

Figure 30 : Tailles du *no-reflow* exprimées en pourcentage de l'infarctus dans les différents groupes expérimentaux. **, p<0,05 vs Témoin ; VLT, Ventilation liquide totale ; Nal, Naloxone ; SPT, 8-sulfophenyltheophylline ; CPA, N^6-cyclopentyladénosine.*

4. Commentaires

Dans cette étude, nous avons montré qu'une hypothermie modérée (32°C) induite *in vivo* par VLT réduisait considérablement la taille de l'infarctus chez des lapins soumis à une occlusion coronaire de 30 min suivie de 4 h de reperfusion. Cela confirme les données déjà obtenues dans le laboratoire avec la VLT hypothermisante [184]. Des travaux précédents avaient également montré que la cardioprotection observée était bien due à la réduction de la température corporelle et non à la ventilation liquide *per se,* puisqu'une ventilation avec des liquides à 39°C ne modifiait pas la taille d'infarctus dans des conditions expérimentales similaires [7]. Ce travail a également confirmé que l'administration pré-ischémique d'un agoniste opioïde et d'un agoniste des récepteurs A_1 de l'adénosine (CPA) était capable de réduire la taille d'infarctus. Les effets cardioprotecteurs de la morphine et de la CPA étaient cependant moins puissants que celui conféré par l'hypothermie. La réduction de la taille d'infarctus était en effet respectivement de 33% et de 31% par rapport au groupe Témoin alors que l'hypothermie réduisait la taille d'infarctus de 84% dans le groupe VLT. Il est peu probable que la relative faible protection induite par la morphine et par la CPA soit liée à une dose insuffisante (respectivement 0,3 mg/kg i.v. et 100 µg/kg i.v.) puisque les données de la littérature montrent une réduction maximale de la taille d'infarctus chez le rat ou le lapin pour des doses comprises entre 0,1 et 0,3 mg/kg i.v. pour la morphine et entre 50 et 100 µg/kg i.v. pour la CPA. Par ailleurs, il était intéressant de constater que la taille du *no-reflow*, exprimée en pourcentage de la taille d'infarctus, n'était pas réduite par la morphine et la CPA par rapport au groupe Témoin (respectivement 67±7%, 66±4% contre 69±5%) alors qu'elle l'était par la VLT (5±2%). Ainsi, la morphine et l'adénosine protègent les cardiomyocytes de la nécrose d'une façon moins importante que l'hypothermie et n'auraient pas d'effets protecteurs sur le réseau microvasculaire ischémié, contrairement à l'hypothermie qui exerce une double protection vasculaire et cardiomyocytaire. Il a d'ailleurs été montré sur un modèle d'infarctus du myocarde chez la brebis que l'hypothermie diminuait les obstructions microvasculaires post-ischémiques [116]. Ces résultats insistent sur la grande puissance cardioprotectrice de l'hypothermie et montrent tout son intérêt pour un transfert clinique.

D'un point de vue mécanistique, notre étude a montré que l'effet de l'hypothermie n'était pas dépendant d'une stimulation des récepteurs aux opiacés et/ou des récepteurs à l'adénosine. En effet, ni la naloxone, ni la SPT, ni leur association n'a pu bloquer son effet bénéfique. Les doses choisies pour ces antagonistes étaient cependant suffisantes pour bloquer efficacement leurs récepteurs cibles puisqu'elles ont respectivement inhibé la protection

induite par la morphine et la CPA. Par ailleurs, l'administration de naloxone ou de SPT n'a pas eu d'effet propre sur la taille d'infarctus par rapport au groupe Témoin, confirmant que les opiacés (endorphines, enképhalines et dynorphines) et l'adénosine endogènes n'ont pas d'effet propre au cours d'une ischémie myocardique normotherme. Nos résultats montrent donc que le mécanisme d'action de l'hypothermie diffère fondamentalement de celui des pré- et postconditionnements. Au cours des conditionnements myocardiques, la stimulation des récepteurs des opiacés et de l'adénosine est à l'origine de la protection en activant des voies de survie impliquant les *Extracellular signal-regulated kinases* (ERK), la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), l'Akt, la protéine kinase C (PKC) et le monoxyde d'azote (NO) [298]. Au cours de l'hypothermie, l'implication du NO, de l'Akt et de la PKC a également été montrée *in vitro* sur des cardiomyocytes de souris [221] ou de poulet [218] mais l'élément stimulant primitivement ces voies reste indéterminé.

B. Effet de la ventilation liquide totale sur la déficience neurologique post-arrêt cardiaque

Cette étude a fait l'objet de la publication suivante :
Chenoune M, Lidouren F, Adam C, Pons S, Darbera L, Bruneval P, Ghaleh B, Zini R, Dubois-Randé JL, Carli P, Vivien B, Ricard JD, Berdeaux A, Tissier R, 2011. *Ultrafast and whole-body cooling with total liquid ventilation induces favorable neurological and cardiac outcomes after cardiac arrest in rabbits*. Circulation 124(8):901-11, 1-7.

1. Introduction

Comme nous l'avons montré dans la synthèse bibliographique, l'instauration d'une hypothermie thérapeutique légère à modérée (32-34°C) dans les heures suivant un arrêt cardiaque est recommandée pour la prévention des séquelles neurologiques chez l'homme [227]. Plusieurs études cliniques et expérimentales ont par ailleurs suggéré que le bénéfice conféré par l'hypothermie dépendait avant tout de la précocité de sa mise en œuvre et de sa rapidité d'induction au décours de l'épisode ischémique initial [6, 157]. A mon arrivée dans le laboratoire, j'ai pu participer à une étude dans laquelle nous avons évalué l'hypothèse selon laquelle l'hypothermie ultra-rapide conférée par la VLT permettait de procurer une puissante protection contre le syndrome post-arrêt cardiaque. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire sur cœur « sain » chez des lapins anesthésiés. L'effet de la VLT hypothermisante a été étudié sur un critère de survie à 7 jours après la réanimation cardiopulmonaire. Les critères secondaires étaient les paramètres cliniques, biochimiques, hémodynamiques et histologiques permettant de documenter les séquelles neurologiques, cardiaques, rénales et hépatiques de l'arrêt cardiaque. Nous avons également comparé l'effet de la VLT hypothermisante à celui d'une hypothermie conventionnelle (perfusion intraveineuse de solutés refroidis + couvertures froides) et d'une VLT normotherme dans le but de montrer que l'effet bénéfique de la VLT hypothermisante était effectivement du à sa capacité à induire une hypothermie très rapide.

2. Protocole expérimental

Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle expérimental d'arrêt cardiaque sur cœur « sain » décrit plus haut. Comme l'illustre la Figure 31, les lapins ont été soumis à 5 ou 10 min de fibrillation ventriculaire suivies d'une réanimation cardio-pulmonaire. Après la reprise d'une activité cardiaque spontanée, les animaux ont été soumis à une procédure normotherme (respectivement groupes $Témoin_{5'}$ et $Témoin_{10'}$) ou à une hypothermie induite par VLT (respectivement groupes $VLT\text{-}Hypo_{5'}$ et $VLT\text{-}Hypo_{10'}$,). Deux autres groupes ont été inclus et soumis à 10 min d'arrêt cardiaque et à une VLT normotherme (groupe $VLT\text{-}Normo_{10'}$) ou à une hypothermie conventionnelle par refroidissement externe et administration i.v. d'un soluté de perfusion à 4°C (NaCl 0,9%, 30 ml/kg ; groupe $NaCl\ 4°C_{10'}$). Dans les groupes soumis à une VLT, cette ventilation a été instaurée à l'aide de FC770 (Fluorinert ®, 3M, Cergy, France) à partir de la $10^{ème}$ min suivant le début de la réanimation cardiopulmonaire. La VLT a été poursuivie pendant 20 min au terme desquelles les animaux étaient à nouveau ventilés de façon conventionnelle. Dans le groupe $Perf\text{-}iv_{10'}$, l'hypothermie a également été débutée à la $10^{ème}$ min suivant le début de la réanimation cardiopulmonaire et la perfusion de la solution de NaCl 0,9% a été réalisée pendant 30 min. Dans les groupes refroidis ($VLT\text{-}Hypo_{5'}$, $VLT\text{-}Hypo_{10'}$ et $NaCl\ 4°C_{10'}$), l'hypothermie a été maintenue à 32°C pendant 3 h en utilisant si nécessaire des couvertures froides externes. Les animaux ont ensuite été réchauffés à l'aide d'une lampe à infra-rouge et d'un tapis chauffant jusqu'à leur réveil. Ils étaient alors placés dans une cage fermée enrichie en O_2 pendant 2 à 3 jours pour éviter les épisodes d'hypoxie. Dans les groupes $Témoin_{10'}$ et $VLT\text{-}Hypo_{10'}$, des animaux supplémentaires ont été inclus pour permettre la collecte d'échantillons de myocarde et de sang une heure après l'arrêt cardiaque. Ces prélèvements ont été utilisés pour l'évaluation de l'activité de la caspase 3 et pour l'évaluation des concentrations sanguines en troponine I. Ces derniers paramètres permettent d'évaluer la souffrance myocardique précoce après l'arrêt cardiaque.

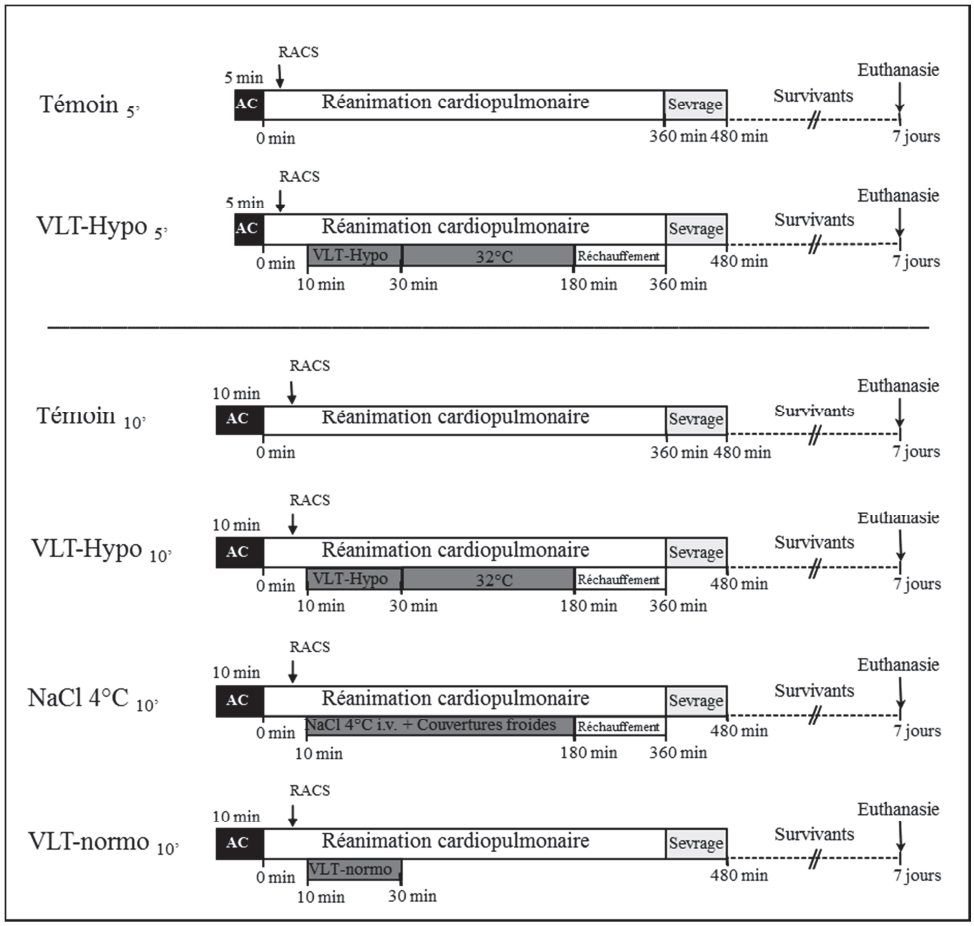

Figure 31: Protocole expérimental.

AC, arrêt cardiaque ; NaCl 4°C, refroidissement par perfusion intraveineuse de solutés refroidis et par applications de couvertures froides ; RACS, Restauration d'une activité circulatoire spontanée ; VLT, ventilation liquide totale ; VLT-Hypo, VLT hypothermisante ; VLT-Normo, VLT normotherme.

3. Principaux résultats

a) Effectifs

Tous les lapins soumis à 5 min d'arrêt cardiaque ont été réanimés avec succès (groupes $Témoin_{5'}$ et $VLT\text{-}Hypo_{5'}$). Dans les groupes soumis à 10 min d'arrêt cardiaque, 10/15, 10/15, 7/10 et 7/10 lapins ont été respectivement réanimés dans les groupes $Témoin_{10'}$, $VLT\text{-}Hypo_{10'}$, $VLT\text{-}Normo_{10'}$ et $NaCl\ 4°C_{10'}$.

b) Températures corporelles

Comme l'illustre la Figure 32, les températures œsophagienne, tympanique et rectale n'étaient pas significativement différentes entre les groupes à l'état pré-ischémique. Une légère baisse des températures a été observée après l'arrêt cardiaque dans les groupes

Témoins et VLT-Normo$_{10'}$ mais cela n'a pas dépassé le seuil des 36-37°C. Dans les groupes soumis à une VLT hypothermisante, les températures œsophagienne et tympanique ont diminué très rapidement après l'institution de la VLT. À titre d'exemple, la température tympanique a respectivement atteint 33,3±0,5°C et 32,5±0,3 °C en seulement 10 min dans les groupes VLT-Hypo$_{5'}$ et VLT-Hypo$_{10'}$. De telles températures n'étaient atteintes qu'après ~30 min dans le groupe NaCl 4°C$_{10'}$. Concernant les températures œsophagienne et rectale, les délais nécessaires pour atteindre 32-33°C étaient respectivement inférieurs à 5 et 15 min dans le groupe VLT-Hypo$_{10'}$ alors qu'ils étaient de 45 et 60 min dans le groupe NaCl 4°C$_{10'}$.

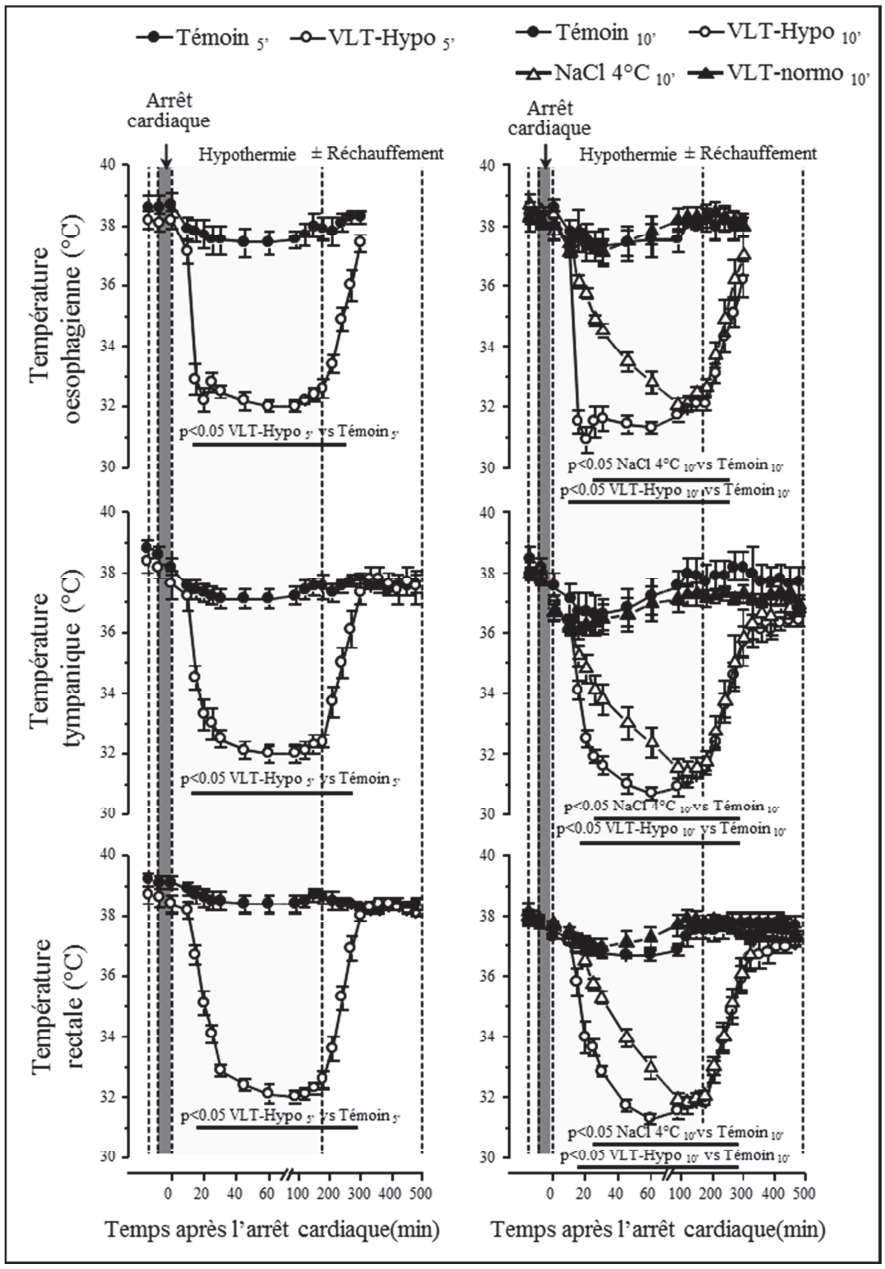

Figure 32 : Températures oesophagienne, tympanique et rectale au cours du protocole expérimental. *NaCl 4°C, refroidissement par perfusion intraveineuse de solutés refroidis et par applications de couvertures froides ; VLT, ventilation liquide totale ; VLT-Hypo, VLT hypothermisante ; VLT-Normo, VLT normotherme ; *, p<0.05 vs groupe Témoin correspondant.*

c) Paramètres hémodynamiques

Au décours de l'arrêt cardiaque, la fréquence cardiaque était significativement diminuée tout au long de la phase d'hypothermie dans les groupes hypothermes par rapport aux groupes Témoins correspondants (par exemple -21% et -28% dans les groupes VLT-$Hypo_{5'}$ et VLT-$Hypo_{10'}$ à t=60 min après l'arrêt cardiaque). La pression artérielle moyenne n'était en revanche pas significativement différente entre les groupes expérimentaux tout au long du protocole. Cela était relativement attendu puisqu'une administration d'adrénaline était réalisée durant les 7 premières heures suivant l'arrêt cardiaque afin de maintenir cette pression à une valeur d'environ 80 mmHg. La dose totale d'adrénaline administrée était en revanche significativement plus faible dans le groupe VLT-$Hypo_{10'}$ mais pas dans le groupe NaCl 4°$C_{10'}$ par rapport au groupe $Témoin_{10'}$ (respectivement 128±128, 430±126 vs 684±118 µg/kg), suggérant un effet hémodynamique favorable de la VLT hypothermisante. Après l'arrêt de l'administration d'adrénaline, la concentration sanguine en lactates était également significativement réduite dans les groupes VLT-$Hypo_{5'}$ et VLT-$Hypo_{10'}$ (1,2±0,2 et, 3,6±0,7 mmol/L), respectivement par rapport aux groupes $Témoin_{5'}$ et $Témoin_{10'}$ (4,8±1,7 et 7,0±1,7 mmol/L). Ces concentrations en lactates n'étaient en revanche pas significativement diminuées dans les groupes NaCl 4°$C_{10'}$ et VLT-$Normo_{10'}$ par rapport au groupe $Témoin_{10'}$ (5,9±0,7 et 7,6±0,6 vs 7,0±1,7 mmol/L).

L'analyse histologique des ventricules gauches des animaux provenant des différents groupes a également permis de confirmer l'existence d'un effet cardioprotecteur de la VLT hypothermisante. Une analyse semi-quantitative des lésions myocardiques a en effet permis d'attribuer à chaque cœur un score de sévérité des lésions allant de 0 (normal) à 3 (multiples foyers étendus d'infarctus). Le score médian des lésions myocardiques était significativement diminué dans le groupes VLT-$Hypo_{10'}$ par rapport au groupe $Témoin_{10'}$, (Figure 5 de la publication ci-après).

Les analyses conduites chez des animaux supplémentaires inclus dans les groupes VLT-$Hypo_{10'}$ et $Témoin_{10'}$ ont montré qu'un effet cardioprotecteur était observé très précocement puisque les concentrations sériques en troponine I (respectivement 1,3±0,3 *vs* 70,7±30,4 ng/ml) et l'activité myocardique de la caspase 3 (6,2±1,2 et 10,0±1,2 pmol/ mg de protéines/heure) étaient significativement atténuées dès la première heure suivant l'arrêt cardiaque.

d) Dysfonction neurologique et survie

Comme l'illustre la Figure 33, la dysfonction neurologique était significativement atténuée dans les groupes soumis à une VLT hypothermisante par rapport aux groupes Témoins correspondants. Cette différence était significative dès le 2ème jour suivant l'arrêt cardiaque dans le groupe VLT-Hypo$_{5'}$ par rapport au groupe Témoin$_{5'}$ et dès le 1er jour dans le groupe VLT-Hypo$_{10'}$ par rapport au groupe Témoin$_{10'}$. Dans le groupe NaCl 4°C$_{10'}$, une amélioration transitoire a été observée le lendemain de l'arrêt cardiaque mais cela n'était plus significatif durant les jours suivants. Dans le groupe VLT-Normo$_{10'}$, aucun effet bénéfique n'a été observé par rapport au groupe Témoin$_{10'}$.

L'effet neuroprotecteur de la VLT hypothermisante a été confirmé par les analyses histologiques (Figure 5 de la publication ci-après). Les scores de sévérité des lésions cérébrales étaient en effet significativement diminués dans les groupes VLT-Hypo$_{5'}$ et VLT-Normo$_{10'}$ (respectivement 1,3 et 1,5) par rapport aux groupes Témoin$_{5'}$ et Témoin$_{10'}$ (respectivement 1,8 et 2,5).

Une amélioration significative de la survie, qui constituait notre critère primaire d'étude, a aussi été observée dans les groupes soumis à une VLT hypothermisante par rapport aux groupes Témoins correspondants (Figure 33). A la fin des 7 jours de suivi, 9/10 et 7/10 lapins ont ainsi survécu dans les groupes VLT-Hypo$_{5'}$ et VLT-Hypo$_{10'}$ respectivement, par rapport à 5/10 et 0/10 dans les groupes Témoin$_{5'}$ et Témoin$_{10'}$. Dans les groupes NaCl 4°C$_{10'}$ et VLT-Normo$_{10'}$, la survie n'était pas différente par rapport au groupe Témoin$_{10'}$ (respectivement 2/7, 1/7 et 0/10).

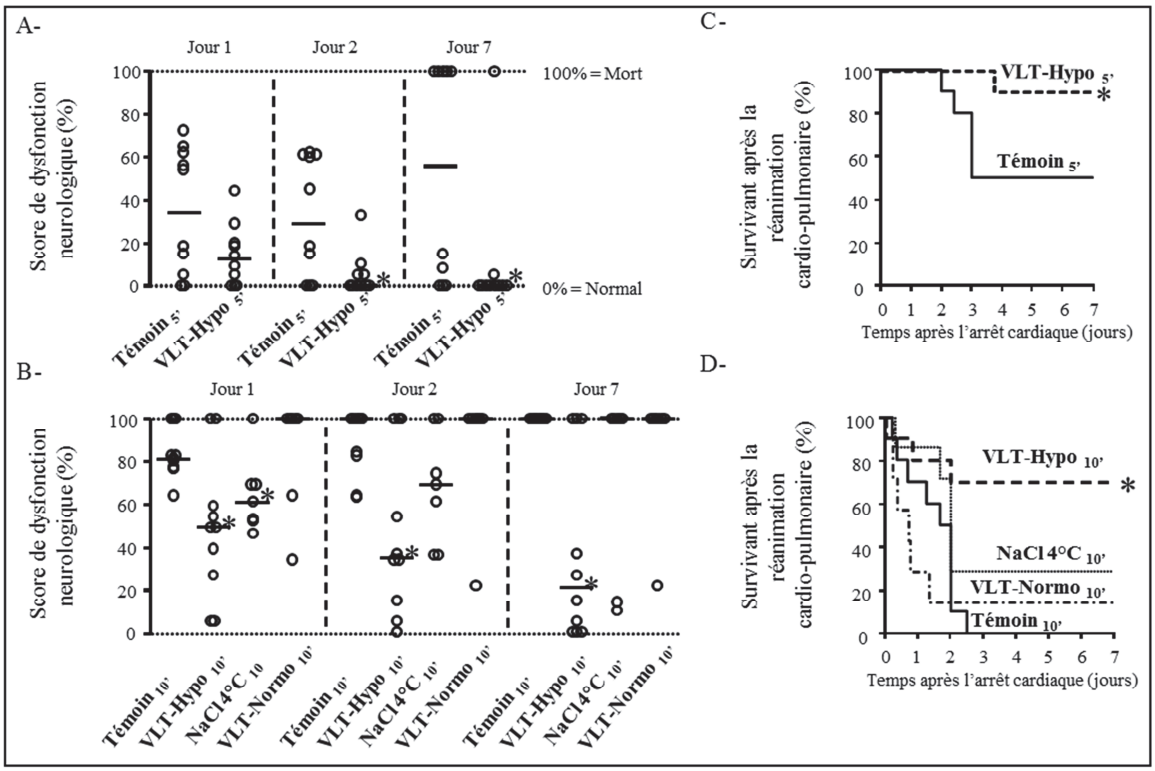

Figure 33 : Panneaux A et B, scores de dysfonction neurologique dans les différents groupes expérimentaux respectivement soumis à 5 ou 10 min d'arrêt cardiaque dans les jours suivant l'arrêt cardiaque. Panneaux C et D, courbes de survie de Kaplan-Meyer dans les différents groupes expérimentaux soumis respectivement à 5 min ou 10 min d'arrêt cardiaque, chez les animaux réanimés avec succès après l'arrêt cardiaque. *Panneaux A et B, les cercles représentent les résultats individuels et la ligne épaisse représente la médiane du groupe correspondant. Seuls les animaux ayant repris une circulation spontanée ont été inclus ; NaCl 4°C, refroidissement par perfusion intraveineuse de solutés refroidis et par application de couvertures froides ; VLT, ventilation liquide totale ; VLT-Hypo, VLT hypothermisante ; VLT-Normo, VLT normotherme ; *, p <0,05 vs groupe Témoin correspondant.*

e) Echanges gazeux et structure pulmonaire

Comme l'illustre la Figure 34, une importante acidose associée à une augmentation de la pCO_2 et une diminution de la pO_2 sanguine a été observée dans tous les groupes expérimentaux après l'arrêt cardiaque. A t=15 min après ce dernier, ces modifications n'étaient pas significativement différentes entre les groupes, à l'exception de la pO_2 qui était diminuée dans le groupe VLT-Hypo$_{5'}$ par rapport au groupe Témoin$_{5'}$. A t=180 min après l'arrêt cardiaque, les échanges gazeux étaient à l'inverse améliorés dans les groupes soumis à une VLT par rapport aux groupes témoins. À titre d'exemple, le pH sanguin et la pO_2 étaient

augmentés, tandis que la pCO_2 était diminuée dans les groupes VLT-Hypo$_{10'}$ vs Témoin$_{10'}$. Cela était observé avec des paramètres ventilatoires standardisés pour permettre une telle comparaison. Les analyses histologiques des poumons ont également montré la bonne tolérance de la VLT hypothermisante puisque les complications infectieuses et les lésions de congestion et d'œdème pulmonaire n'étaient pas plus intenses dans les groupes soumis à cette procédure que dans celles des groupes Témoins correspondants (Figure 6 de la publication ci-après).

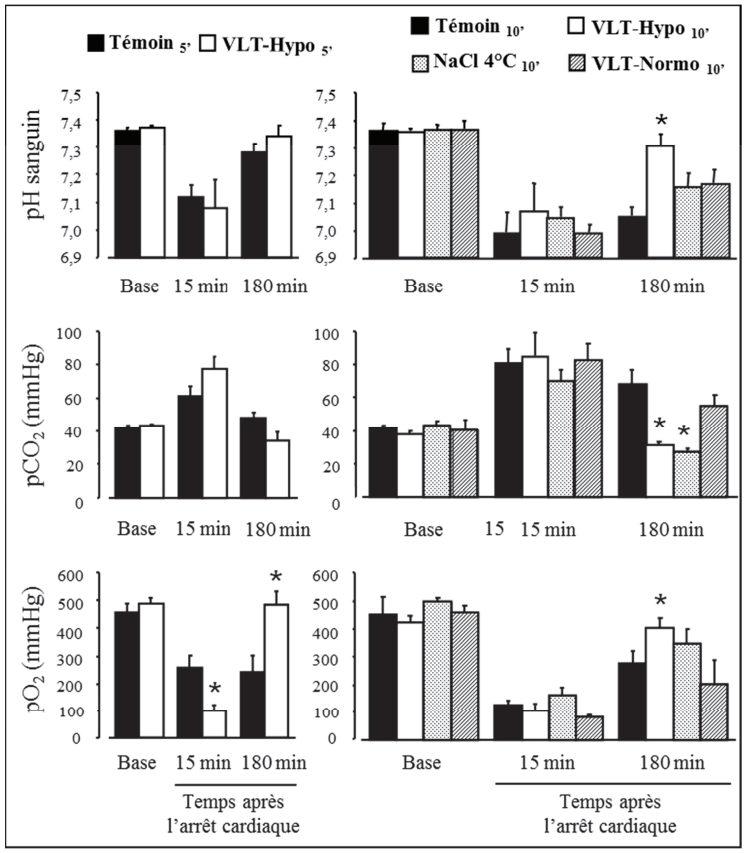

Figure 34 : pH sanguin, pCO_2 et pO_2 sanguines dans les différents groupes expérimentaux. *NaCl 4°C, refroidissement par perfusion intraveineuse de solutés refroidis et par application de couvertures froides ; VLT, ventilation liquide totale ; VLT-Hypo, VLT hypothermisante ; VLT-Normo, VLT normotherme ; *, p <0,05 vs groupe Témoin correspondant.*

4. Commentaires

La présente étude nous a permis d'apporter la preuve de concept qu'un refroidissement ultra-rapide induit par VLT permettait d'atténuer le syndrome post-arrêt cardiaque chez des lapins soumis à une fibrillation ventriculaire suivie d'une réanimation cardiopulmonaire. Cet effet bénéfique est directement en relation avec la rapidité d'induction de l'hypothermie puisqu'une hypothermie conventionnelle par refroidissement externe et perfusion de solutés refroidis n'a pas permis d'induire de protection significative. Un effet propre de la VLT est également peu probable puisque nous n'avons pas observé d'effet bénéfique avec un épisode de VLT normotherme.

Ces résultats renforcent la notion que le bénéfice procuré par une hypothermie dépend surtout de sa rapidité d'induction, comme cela a été montré dans plusieurs études expérimentales [6, 142, 157]. Dans la présente, le bénéfice procuré par la VLT hypothermisante était de surcroît observé avec une durée totale d'hypothermie de 3 h alors que les recommandations actuelles sont de maintenir cette hypothermie pendant 24 h chez l'homme. Nous avons choisi cette courte durée puisque d'autres études avaient suggéré qu'une hypothermie très précoce, telle une hypothermie intra-arrêt, n'avait pas besoin d'être prolongée pour être bénéfique [142].

En plus de ses effets bénéfiques sur la survie et sur la récupération neurologique, nous avons également observé que la VLT hypothermisante exerçait un effet cardioprotecteur tel que nous l'avions déjà observé dans un modèle d'occlusion coronaire. Cet effet a été observé après 10 min d'arrêt cardiaque puisque les lésions myocardiques étaient mineures dans les groupes soumis à seulement 5 min d'arrêt. Cet effet reste à confirmer dans le cas d'un arrêt cardiaque avec une insuffisance coronaire sous-jacente où la mortalité est principalement due à une défaillance hémodynamique majeure. Cela constitue le rationnel de l'étude suivante.

C. Effet de la ventilation liquide totale sur la défaillance hémodynamique post-arrêt cardiaque

Cette étude a fait l'objet de la publication suivante :
Darbera L, Chenoune M, Lidouren F, Kohlhauer M, Adam C, Bruneval P, Ghaleh B, Dubois-Randé J-L, Carli P, Vivien B, Ricard J-D, Berdeaux A, Tissier R, 2013. *Hypothermic liquid ventilation prevents early hemodynamic dysfunction and cardiovascular mortality after coronary artery occlusion complicated by cardiac arrest in rabbits.* Crit Care Med.

1. Introduction

Comme nous l'avons évoqué précédemment, une grande partie des arrêts cardiaques extra-hospitaliers surviennent dans un contexte de complication d'une insuffisance coronaire ou d'un infarctus du myocarde. Chez les patients réanimés, deux « vagues de mortalité » sont observées : la première, précoce, est associée à une défaillance hémodynamique majeure alors que la deuxième, plus tardive, est principalement associée à une déficience neurologique [20]. La prise en charge des patients combine actuellement la revascularisation de l'artère coronaire obstruée à des fins de cardioprotection, et l'hypothermie thérapeutique à des fins de neuroprotection [299]. Nous avons souhaité savoir si une hypothermie ultrarapide par VLT pouvait ou non potentialiser l'effet de la revascularisation et procurer une cardioprotection en plus de son effet neuroprotecteur bien établi. Dans ce but, nous avons mis au point un modèle d'arrêt cardiaque chez des lapins chroniquement instrumentés combinant un infarctus du myocarde et une fibrillation ventriculaire. L'objectif de ce travail a donc été d'évaluer la dysfonction hémodynamique et neurologique post-arrêt cardiaque dans ces conditions expérimentales.

2. Protocole expérimental

Cette étude a été conduite sur le modèle de lapins chroniquement instrumentés présenté plus haut. Deux semaines après l'implantation chirurgicale initiale, les animaux ont été réanesthésiés. Après 10 min d'occlusion coronaire et 8 minutes d'arrêt cardiaque, les lapins ont été réanimés comme décrit plus haut et aléatoirement répartis en trois groupes expérimentaux, comme illustré dans la Figure 35. Un groupe Témoin n'a fait l'objet d'aucune

procédure particulière durant le suivi. Les deux autres groupes ont été soumis à une hypothermie par VLT (groupe VLT) ou par une perfusion de solutés refroidis (NaCl 0,9% à 4°C, groupe NaCl 4°C). Dans ces deux derniers groupes, la température cible était 32°C. Tous les lapins ont été suivis pendant 8 h jusqu'à leur réveil. Les survivants ont été suivis pendant 7 jours au cours desquels les paramètres hémodynamiques et neurologiques ont été évalués.

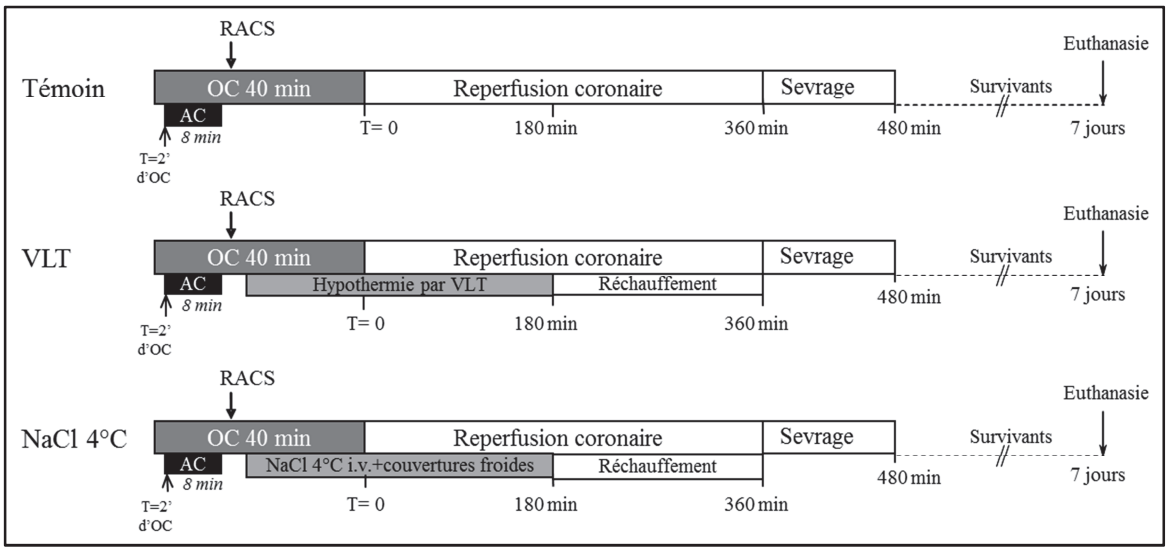

Figure 35 : Protocole expérimental. *OC, occlusion coronaire ; AC, arrêt cardiaque ; NaCl 4°C, refroidissement par perfusion intraveineuse de solutés refroidis et par applications de couvertures froides ; RACS, Restauration d'une activité circulatoire spontanée ; VLT, ventilation liquide totale.*

3. Principaux résultats

a) Effectifs

Quarante lapins ont été soumis au protocole expérimental décrit ci-dessus. Trente d'entre eux ont pu être réanimés et ont été répartis dans les trois groupes, à raison de 10 lapins par groupe.

b) Températures corporelles

Comme l'illustre la Figure 36, les températures oesophagienne, tympanique et rectale des lapins du groupe Témoin sont restées stables tout au long du protocole. La température cible de 32°C a été atteinte très rapidement chez les lapins refroidis par VLT (après respectivement 5, 5 et 35 minutes dans l'œsophage, le tympan et le rectum). Cette température cible a été atteinte plus tardivement après la reperfusion coronaire chez les lapins

du groupe NaCl 4°C (respectivement 50, 40 et 65 minutes dans l'œsophage, le tympan et le rectum).

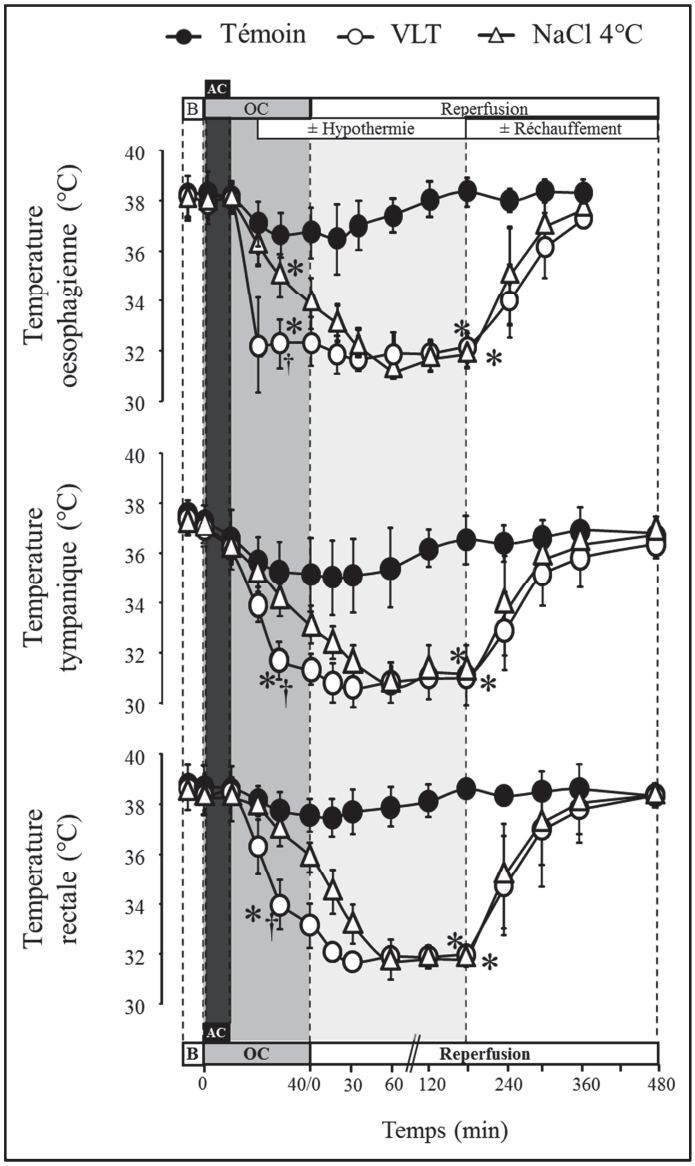

Figure 36 : Températures corporelles. *B, base ; OC, occlusion coronaire ; AC, arrêt cardiaque ; NaCl 4°C, refroidissement par perfusion intraveineuse de solutés refroidis et par applications de couvertures froides ; VLT, ventilation liquide totale ; *, p <0,05 vs groupe Témoin ; †, p <0,05 vs groupe NaCl 4°C.*

c) Survie et principales causes de mortalité

La mortalité précoce (avant 2 jours) était plus importante chez les lapins des groupes Témoin et NaCl 4°C (6 lapins dans chacun de ces groupes) par rapport au groupe VLT dans lequel seuls 2 lapins sont morts. Cette mortalité était principalement liée à une défaillance hémodynamique ou respiratoire. Secondairement, une déficience neurologique associée à une mortalité plus tardive a été observée chez les lapins des groupes Témoin et NaCl 4°C. Deux lapins du groupe témoin ont été euthanasiés au bout de 2 jours pour raison éthique (dysfonction neurologique entraînant une incapacité à se nourrir). Au terme des 7 jours de suivi, aucun lapin du groupe Témoin n'a survécu, 3/10 lapins du groupe NaCl 4°C ont survécu. L'hypothermie par VLT a permis une augmentation significative de la survie par rapport aux deux autres groupes avec 8/10 lapins survivant à 7 jours. D'une manière générale, la mortalité dans tous les groupes était surtout d'origine cardiaque et/ou respiratoire (Figure 37).

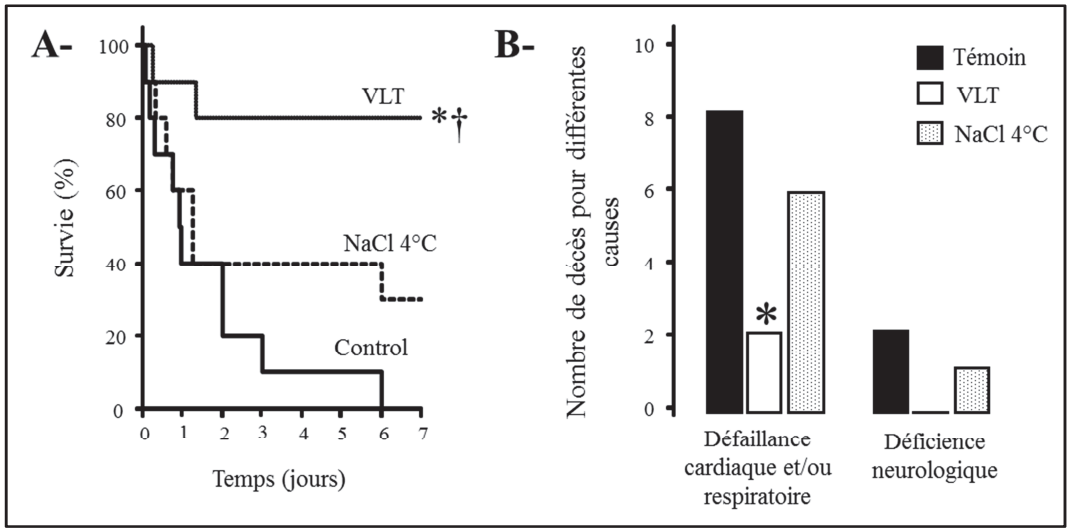

Figure 37 : Pourcentage de survie et causes de mort. *Panneau A : Courbes de survie de Kaplan-Meyer dans les différents groupes expérimentaux chez les animaux réanimés avec succès après l'arrêt cardiaque. Panneau B : Nombre de lapins morts de cause cardiorespiratoire ou neurologique dans chaque groupe expérimental. *, p <0,05 vs groupe Témoin ; †, p <0,05 vs groupe NaCl 4°C.*

d) Dysfonction hémodynamique et tailles d'infarctus

Comme l'illustre la Figure 38, les débits cardiaques et volumes d'éjection systoliques ont été fortement affectés par l'induction de l'occlusion coronaire chez tous les animaux. Ces paramètres ont atteint une valeur nulle au cours de l'arrêt cardiaque. Les lapins ont été

réanimés après des durées comparables dans les trois groupes expérimentaux (respectivement 2,9±0,8, 2 ,8±1,4 et 3,1±1,4 min dans les groupes Témoin, VLT et NaCl 4°C). La dose totale d'adrénaline nécessaire au maintien d'une pression artérielle moyenne de 80 mmHg a été significativement diminuée chez les animaux des groupes hypothermes par rapports aux animaux du groupe Témoin (respectivement 336±209, 305±153 et 751±488 μg/kg dans les groupes VLT, NaCl 4°C et Témoin). Cela explique l'augmentation des résistances périphériques dans le groupe Témoin après la réanimation. Durant cette même période, l'hypothermie rapide par VLT a permis un maintien relatif du débit cardiaque par rapport aux deux autres groupes. Le jour suivant l'arrêt cardiaque, les débits cardiaques, volumes d'éjection systolique et résistances périphériques ont retrouvé leurs valeurs initiales chez les lapins du groupe VLT mais pas dans les autres groupes.

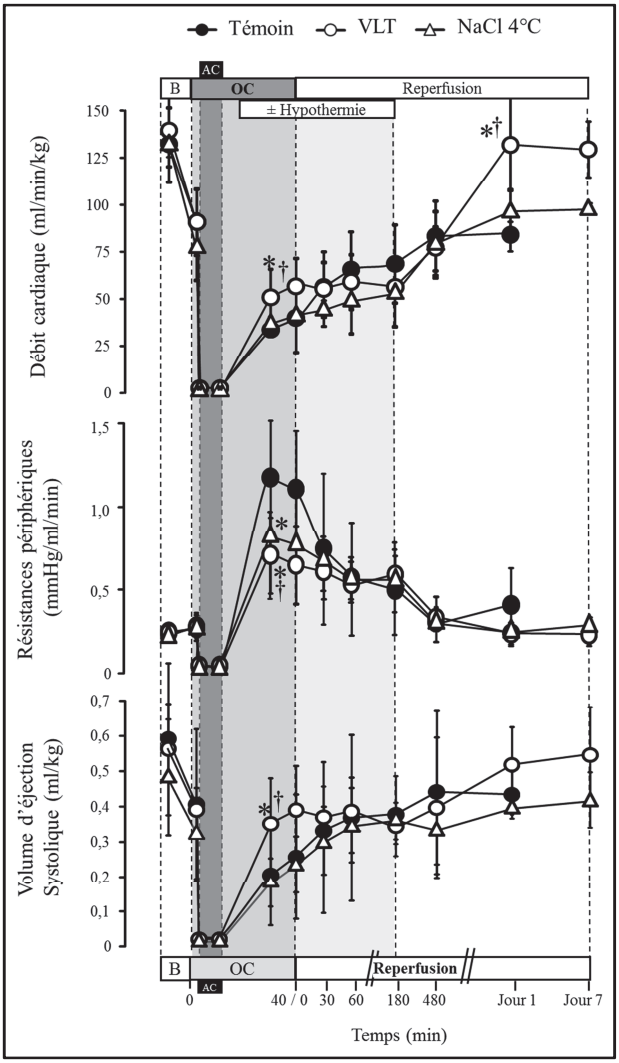

Figure 38 : Paramètres hémodynamiques. **, p <0,05 vs groupe Témoin ; †, p <0,05 vs groupe NaCl 4°C.*

Chez les lapins survivants après 7 jours de suivi, la fonction cardiaque a été évaluée et comparée à celle d'un groupe supplémentaire de lapins n'ayant subi ni arrêt cardiaque ni occlusion coronaire (groupe Sham). Comme le montre le Tableau 8, la pression ventriculaire gauche systolique maximale, la pression télédiastolique ventriculaire gauche et les maxima et minima de la dérivée première de cette pression en fonction du temps (dP/dt) n'étaient pas significativement différents entre le groupe Sham et les lapins survivants du groupe VLT. Ces paramètres étaient en revanche altérés chez les survivants du groupe NaCl 4°C, révélant une dysfonction cardiaque persistante dans ce groupe.

	Témoin	VLT	NaCl 4°C	Sham
Nombre d'animaux (n)	0	8	2	8
Dérivée première de la pression ventriculaire gauche maximale en fonction du temps (dP/dt max) (mmHg)	-	4908± 1130 †	1848±815	5535± 2318
Dérivée première de la pression ventriculaire gauche minimale en fonction du temps (dP/dt min) (mmHg)	-	-4270± 1166 †	-1317± 49 9	-5339± 1376 †
Pression ventriculaire gauche systolique maximale (Pmax) (mmHg)	-	102± 20 †	60±4	97± 17 †
Pression télédiastolique ventriculaire gauche (PTDVG) (mmHg)	-	6±2 †	14 ±6	4±1 †

Tableau 8 : Analyse de la fonction cardiaque. *†, p <0,05 vs groupe NaCl 4°C.*

Après euthanasie ou mort spontanée des animaux, le cœur de chaque lapin a été prélevé pour la mesure de la taille d'infarctus et pour l'étude histologique. Les aires à risques n'étaient pas significativement différentes entre les différents groupes. Comme le montre la Figure 39, l'hypothermie par VLT a induit une très forte réduction de la taille d'infarctus par rapport aux groupes NaCl 4°C et Témoin (respectivement 13±4 par rapport à 41±16 et 54±8 % de l'aire à risque). Aucun foyer de nécrose n'a été observé en dehors de l'aire à risque dans les cœurs des lapins du groupe VLT. Cela était associé à une concentration sanguine en troponines I moins élevée chez ces lapins par rapport aux lapins des autres groupes. À titre d'exemple, le taux sanguin moyen en troponines I au 1er jour après l'arrêt cardiaque était de 28±40 ng/ml dans le groupe VLT par rapport à 91±46 dans le groupe NaCl 4°C et 111±50 dans le groupe Témoin.

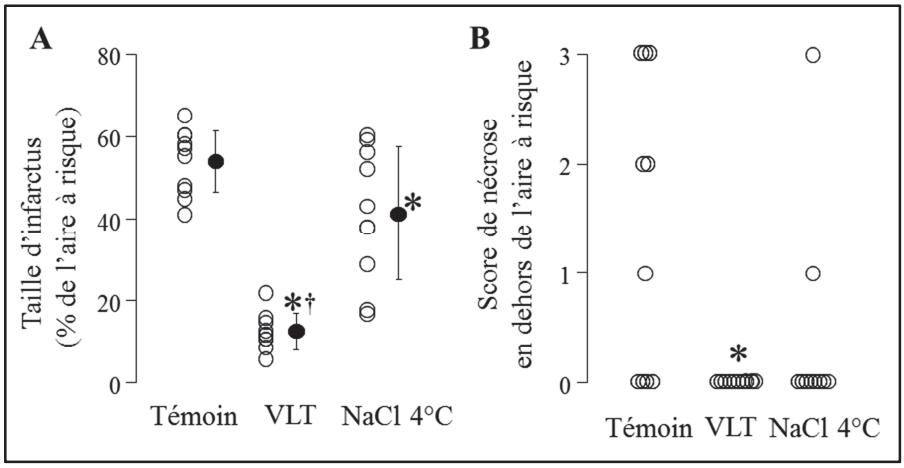

Figure 39 : Tailles d'infarctus et scores de nécrose en dehors de l'aire à risque. *Panneau A : Taille d'infarctus exprimée en pourcentage de l'aire à risque, les cercles vides représentent les valeurs individuelles, les cercles pleins représentent la valeur moyenne pour le groupe concerné ; panneau B : Score histologique de nécrose en dehors de l'aire à risque. Les cercles représentent les valeurs individuelles. *, p <0,05 vs groupe Témoin ; †, p <0,05 vs groupe NaCl 4°C.*

e) Dysfonction neurologique et histologie cérébrale

Les scores de dysfonction neurologique sont illustrés sur la Figure 40. Dès le lendemain de l'arrêt cardiaque, cette dysfonction était moindre dans le groupe VLT par rapport aux deux autres groupes. Alors que tous les lapins du groupe Témoin sont morts avant le 7ème jour, les lapins survivants dans le groupe VLT ont récupéré une fonction neurologique normale (score = 0 %). Les trois lapins survivants dans le groupe NaCl 4°C présentaient encore une légère dysfonction neurologique à J7.

L'analyse histologique a montré des lésions d'ischémie dans tous les cerveaux. Ces lésions étaient moindres dans les cerveaux des lapins du groupe VLT (Figure 41). En effet, la VLT a permis une prévention significative des lésions ischémiques cérébrales par rapport au groupe Témoin.

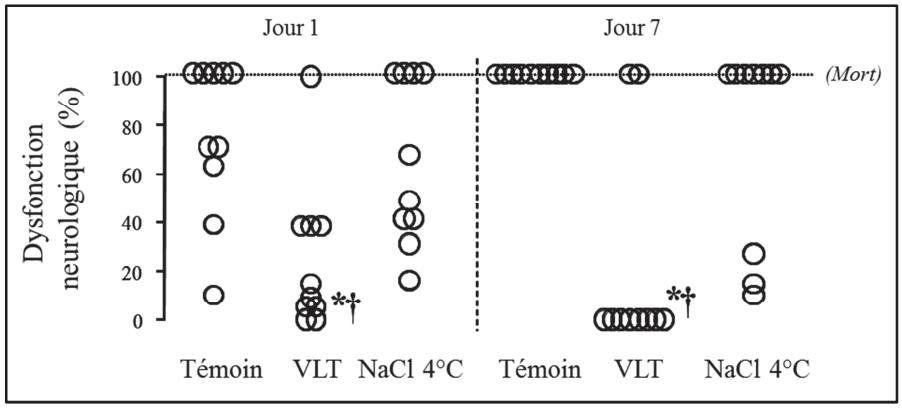

Figure 40 : Scores de dysfonction neurologique. *Les cercles représentent les valeurs individuelles. *, p <0,05 vs groupe Témoin ; †, p <0,05 vs groupe NaCl 4°C.*

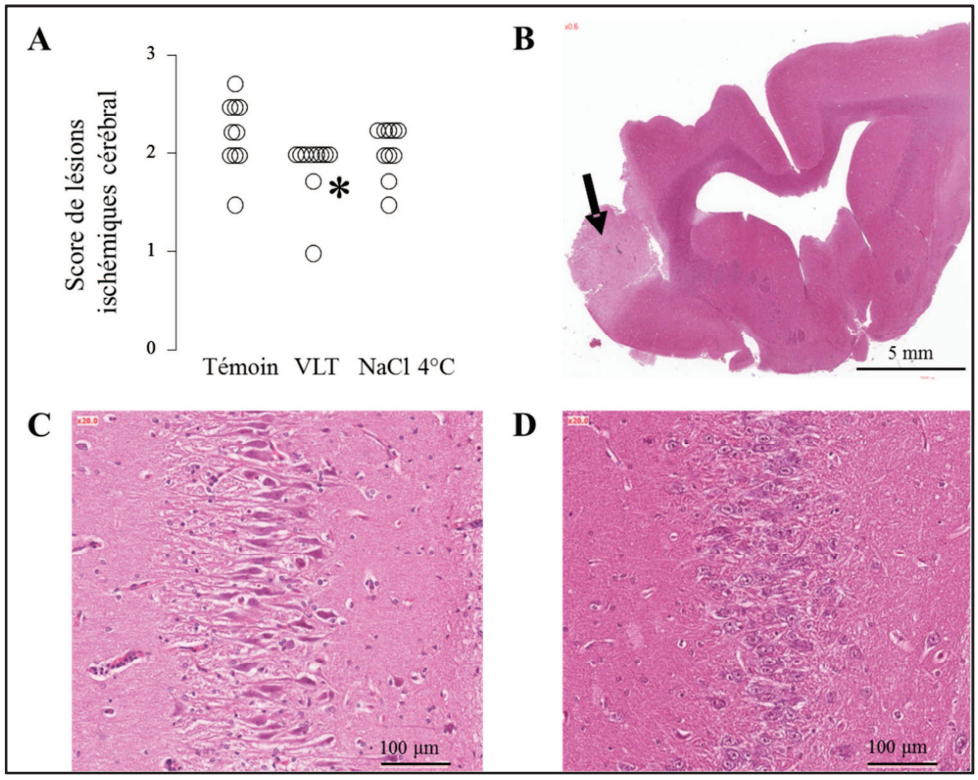

Figure 41 : Histologie cérébrale.

*Panneau A : Score de lésions ischémiques, les cercles représentent les valeurs individuelles. *, p <0,05 vs groupe Témoin. Panneau B : Présence d'un infarctus cérébral (montré par la flèche) sur une coupe de cerveau provenant d'un lapin du groupe Témoin. Panneau C : Aspect anormal d'un hippocampe provenant d'un lapin du groupe NaCl 4°C avec présence de neurones nécrotiques. Panneau D : Aspect normal d'un hippocampe provenant d'un lapin du groupe VLT.*

4. Commentaires

Dans cette étude, nous avons montré que l'hypothermie par VLT permettait d'améliorer la survie au décours d'un arrêt cardiaque expérimental associé à un infarctus du myocarde. Cela est dû non seulement à l'effet neuroprotecteur déjà observé dans l'étude précédente mais également à un fort pouvoir cardioprotecteur. En effet, au-delà de la simple réduction de la taille d'infarctus, la VLT a procuré une amélioration précoce et durable de la fonction cardiaque post-arrêt cardiaque prévenant ainsi la mortalité précoce due à une instabilité hémodynamique.

De nouveau, il apparait que ces effets bénéfiques sont liés avant tout à la rapidité de refroidissement puisqu'une hypothermie plus lente induite par perfusion de fluides froids et application de couvertures externes n'a permis d'observer ni une amélioration de la fonction cardiaque ni une diminution de la mortalité de cause cardiaque malgré une diminution significative de la taille d'infarctus.

Une tendance vers une amélioration neurologique a néanmoins été observée dans le groupe NaCl 4°C et pourrait probablement être mise en évidence sur un plus grand nombre d'animaux ou par variation de la durée de l'hypothermie. Knafelj et al. [73] ont également montré qu'un refroidissement externe n'induisait aucune action cardioprotectrice malgré une amélioration du score de performance cérébrale.

Dans ce dernier travail, la mortalité était précoce et principalement d'origine cardiaque ou respiratoire, contrairement à l'étude précédente dans laquelle les lapins présentaient une atteinte neurologique sévère sans dysfonction cardiaque ou respiratoire apparente. L'amélioration de la survie observée dans cette dernière étude était principalement liée à une préservation de l'intégrité cardiaque réduisant la mortalité précoce mais améliorant également les lésions neurologiques qui peuvent être les conséquences d'une hémodynamique perturbée. Ces résultats confirment la nécessité d'une technique de refroidissement extrêmement rapide, en particulier dans ce cas précis d'arrêt cardiaque sur cœur ischémique.

IV. DISCUSSION GENERALE

L'objectif principal de ce travail de thèse était de caractériser la protection cardiaque et neurologique procurée par une hypothermie thérapeutique ultra rapide induite par VLT dans l'arrêt cardiaque expérimental. Dans ce but, nous avons d'abord étudié le mécanisme d'action cardioprotecteur de la VLT contre l'infarctus du myocarde puis son effet neuro- et cardioprotecteur au décours d'un arrêt cardiaque expérimental chez le lapin en l'absence puis en la présence d'un infarctus.

Au cours de ces différents travaux, nous avons tout d'abord montré que la VLT induisait une hypothermie généralisée d'apparition extrêmement rapide. La température cible de 32°C était par exemple atteinte entre 2 et 10 minutes après son initiation au niveau du cœur, confirmant les résultats obtenus dans les travaux antérieurs du laboratoire [7, 184, 225]. Dans ces travaux, cette rapidité était associée à des réductions de taille d'infarctus atteignant -90% par rapport aux animaux non refroidis [184]. Au cours de la VLT, les différentes parties du corps sont par ailleurs refroidies à des vitesses légèrement différentes en fonction de leur vascularisation et de leur distance par rapport au poumon. Ainsi, l'œsophage est refroidi extrêmement rapidement dans nos études (< 5 min), de même que dans le tympan qui reflète la température du cerveau (< 6 min). Dans le rectum, la température cible était atteinte moins rapidement (~ 30 min). En comparaison, un refroidissement conventionnel par application de couvertures froides associée à la perfusion i.v. de fluide froid permettait d'atteindre la température cible de 32°C en 50, 40 et 60-90 min dans l'œsophage, le tympan et le rectum, respectivement. Ce délai dépasse classiquement 6 à 8 h chez l'homme avec de telles procédures compte tenu de la différence de masse corporelle [300]. La capacité hypothermisante de la VLT semble en revanche moins dépendante de la taille de l'animal puisqu'elle permet d'atteindre 32-33°C dans l'artère pulmonaire en 3-5 min chez des porcs de 20-30 kg [170, 291], soit une masse dix fois supérieure à celle de nos lapins.

Dans notre premier travail, nous nous sommes plus précisément interrogés sur le(s) mécanisme(s) d'action de l'hypothermie à partir d'éléments de signalisation intracellulaire identifiés au cours des préconditionnement et postconditionnement myocardiques [298]. Cela nous a conduit à confirmer que l'hypothermie conférée par la VLT était associée à un puissant effet cardioprotecteur contre l'infarctus du myocarde et le *no-reflow* [126]. Nous avons également observé que la stimulation des récepteurs aux opiacés et à l'adénosine n'était pas impliquée dans l'effet cardioprotecteur de l'hypothermie, montrant l'existence de médiateurs

initiateurs (*triggers*) différents au cours de l'hypothermie et des pré- et postconditionnements myocardiques. Les fenêtres d'action de ces stratégies sont également différentes puisque l'hypothermie agit principalement au cours du processus ischémique alors que les pré- et postconditionnements agissent soit en amont de ce processus, soit en limitant les lésions de reperfusion. La protéine ERK1/2 est par contre impliquée à la fois dans la signalisation de l'hypothermie et des pré- et postconditionnements mais selon des modalités différentes [223, 301, 302]. Son inhibition abolit l'effet de l'hypothermie [223] si elle est mise en jeu durant la phase ischémique mais pas durant la reperfusion, alors qu'elle inhibe l'effet des pré- et postconditionnements ischémiques à ce moment [301, 302]. L'existence de mécanismes différents est aussi suggérée par la possibilité d'addition des effets protecteurs de ces différentes approches cardioprotectrices. Il aurait d'ailleurs été intéressant dans notre étude mécanistique d'ajouter des groupes expérimentaux associant une hypothermie par VLT et l'administration de morphine ou de CPA. Cependant, l'ampleur de la protection permise par la VLT aurait rendu difficile la mise en évidence d'une telle additivité, voire d'une synergie dans nos conditions. Chez le rat, un effet synergique de l'hypothermie et du préconditionnement a été montré par Van den Doel et al. [117] dans un modèle d'infarctus du myocarde. Cela renforce l'hypothèse de mécanismes d'action profondément distincts entre les pré- et postconditionnements ischémiques et l'hypothermie. Par ailleurs, l'inhibition de l'ouverture du pore de perméabilité de transition mitochondrial au moment de la reperfusion est probablement un prérequis dans l'augmentation de la résistance cellulaire au stress oxydant et à la surcharge calcique provoqués par la reperfusion au cours des pré- et postconditionnements [303]. En revanche, l'hypothermie protège la structure mitochondriale et empêche l'ouverture du pore de perméabilité de transition pendant la phase ischémique en diminuant la production per-ischémique d'ERO et en préservant l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale avant la reperfusion [183].

Dans nos travaux ultérieurs, nous avons étudié l'effet de la VLT dans deux modèles différents d'arrêt cardiaque chez le lapin. Dans ces deux modèles, l'arrêt cardiaque a respectivement été induit sur un « cœur sain » puis sur un « cœur ischémique », c'est-à-dire soumis à une insuffisance coronaire concomitante. Dans le premier cas, la défaillance cardiaque était discrète et la mortalité s'expliquait avant tout par une déficience neurologique sans instabilité hémodynamique sévère. Les lapins refroidis par VLT ont présenté une dysfonction neurologique et des lésions cérébrales atténuées. Dans le deuxième modèle, l'infarctus du myocarde causé par l'occlusion coronaire a induit une dysfonction cardiaque sévère et provoqué une mortalité précoce par insuffisance cardiaque aigüe. En l'absence de

stratégie protectrice (conditions « Témoin »), la mortalité dans les 24 premières heures après l'arrêt cardiaque était ainsi deux fois plus élevée dans la seconde étude par rapport à la première (60% vs 30%). Ce premier modèle nous a donc permis d'apporter la preuve de concept de la faisabilité et de l'intérêt de la VLT après un arrêt cardiaque. Le second modèle nous a permis de caractériser le syndrome post-arrêt cardiaque et sa sévérité dans une situation mimant plus fidèlement l'arrêt cardiaque choquable tel qu'il se produit en clinique. Dans cette situation, c'est en grande partie par la préservation de la fonction cardiaque que l'hypothermie par VLT a joué un rôle protecteur et amélioré la survie. En plus de la protection neurologique observée dans le modèle précédent, nous avons constaté dans le second modèle une forte cardioprotection caractérisée par une amélioration des profils hémodynamiques dès les premiers jours suivant l'arrêt cardiaque associée à une préservation de la fonction cardiaque à 7 jours et une diminution des tailles d'infarctus.

Dans nos études portant sur l'effet de la VLT après un arrêt cardiaque, nous avons comparé son effet à celui d'un refroidissement conventionnel. Comme attendu, la vitesse du refroidissement conventionnel était plus faible que celle atteinte par la VLT et cela était associé à une absence d'effet significatif sur la survie et la récupération neurologique et cardiaque. Une réduction de la taille d'infarctus était en revanche observée. Avec le refroidissement conventionnel, il faut toutefois souligner que l'effet neuro- et cardioprotecteur de l'hypothermie a été possiblement atténué du fait de la courte durée de l'épisode d'hypothermie (3 - 4 h) par rapport à ce qui est actuellement conseillé chez l'homme (24 -36 h) [17]. Expérimentalement, Ye et al. ont néanmoins montré que la durée d'hypothermie n'était pas critique dans les modèles expérimentaux chez le rat [158]. Dans cette étude, des rats ont été soumis à un arrêt cardiaque de 8 min par fibrillation ventriculaire. Après la RACS, les rats ont été répartis entre 4 groupes : un groupe normotherme et 3 groupes hypothermes dans lesquels la température cible de 33°C a été maintenue pendant 2 h, 5 h ou 8 h. D'une manière générale, une amélioration de la survie et des fonctions neurologique et cardiaque a été observée chez les animaux des groupes hypothermes et la protection était d'autant plus grande que l'hypothermie était courte. Dans cette étude, l'hypothermie était induite par application de packs de glace et par l'utilisation d'un ventilateur. Du fait de la petite taille du rat, la température cible a été atteinte dans le sang en 9 min, ce qui représente une hypothermie rapide. Ces résultats seraient probablement différents avec des méthodes d'hypothermie plus lentes. Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet d'une durée d'hypothermie prolongée dans nos modèles, qu'elle soit induite par VLT ou par refroidissement conventionnel.

De manière surprenante, par rapport à la sévérité des atteintes neurologiques et cardiaques, nous n'avons pas observé de dysfonctions rénale et hépatique sévères. Une durée d'arrêt cardiaque supérieure (15 min) aurait probablement été nécessaire pour majorer la dysfonction multiviscérale. Toutefois, des études préliminaires réalisées au laboratoire ont montré que de telles durées d'arrêt cardiaque aboutissent à une dysfonction systémique extrêmement sévère associée à un état de mort cérébrale. Cela s'inscrit dans une perspective d'utilisation de la VLT comme moyen de préserver les organes de donneurs décédés en l'attente d'une transplantation.

Quelle que soit son application, le principal facteur limitant la translation clinique de la VLT reste actuellement la nécessité d'obtenir un respirateur liquidien adapté à un usage clinique. Dans nos travaux expérimentaux, la VLT était un procédé bien toléré par le système pulmonaire. Néanmoins, le prototype de ventilateur que nous avons utilisé n'était pas doté d'un système de contrôle précis des volumes et des pressions respiratoires, ce qui renforce le risque d'induire des baro- et volotraumas. Le laboratoire participe actuellement au développement de dispositifs sécurisés qui permettront de limiter ces risques. Le choix du PFC est également très important car la tolérance pulmonaire à ces liquides dépend de leurs propriétés physicochimiques qui sont souvent très différentes d'un PFC à l'autre. Par exemple, dans le modèle d'arrêt cardiaque sur cœur ischémique, le PFC que nous avons utilisé était le perfluorodécalin qui est autorisé pour un usage médical dans le lavage broncho-alvéolaire (Origen Biomedical, USA) contrairement aux PFC que nous utilisions précédemment. Ce PFC a la particularité d'être plus dense et moins volatile que les autres. Dans notre étude, l'analyse histologique des poumons a révélé la présence de macrophages spumeux jusqu'à 7 jours après le protocole, témoignant certainement de la persistance de liquide dans les poumons. Ce phénomène n'a pas été observé dans l'autre étude réalisée avec le FC-770 dont la pression de vapeur saturante est supérieure à celle du perfluorodécalin.

Afin d'envisager la translation clinique de la VLT, des travaux complémentaires devront par ailleurs être réalisés chez une espèce animale plus grande (le porc), avec un dispositif de ventilation liquide adapté et un PFC qui aurait une pression de vapeur plus élevée que le perfluorodécalin (ex : perfluorooctane ou perflubron). Différents PFC devront aussi être testés puisqu'une pression de vapeur trop élevée augmenterait les risques de collapsus alvéolaire au cours de l'évaporation des PFC, comme nous l'avons précédemment observé au laboratoire avec le Rimar 101 (RM 101, Miteni, Italie) ou le PP2 (F2 Chemicals, UK).

En conclusion, ce travail de thèse a eu pour but de caractériser précisément les effets d'une stratégie hypothermisante originale, la VLT. A l'heure actuelle, il n'existe aucune recommandation particulière en clinique sur l'usage préférentiel d'une modalité de refroidissement par rapport à une autre. Le choix d'une stratégie se fait donc généralement selon des critères d'habitudes locales, de coût, d'acceptabilité technique et de l'éventuelle démonstration d'un bénéfice additionnel par rapport aux autres approches. Cependant, aucune étude n'a véritablement montré chez l'homme la supériorité d'un dispositif par rapport à un autre. Expérimentalement, nous avons montré que la VLT était une méthode relativement peu invasive permettant un refroidissement extrêmement rapide associé à une protection spectaculaire contre les conséquences neurologiques et cardiaques de l'arrêt cardiaque expérimental. Cette protection est maximale pour des durées d'hypothermie relativement courtes, ce qui attribue à la VLT un avantage supplémentaire par rapport aux techniques conventionnelles d'hypothermie. Ce bénéfice a été montré dans la situation des arrêts cardiaques choquables, qui associent classiquement défaillance neurologique et cardiovasculaire. Il serait également intéressant d'évaluer l'effet de la VLT dans d'autres situations telles que l'arrêt cardiaque non choquable, pour lequel l'effet de l'hypothermie thérapeutique reste extrêmement débattu. Une question centrale reste en effet de définir la population pour laquelle la VLT pourrait procurer le plus grand bénéfice. Il faut d'ailleurs aussi considérer les applications de la VLT dépassant l'objectif d'amélioration de la réanimation des patients en considérant les bénéfices éventuels dans la situation du conditionnement d'organes en vue d'un prélèvement.

CONCLUSION

Dans ce travail de thèse, nous avons confirmé que la ventilation liquide totale permettait d'induire un refroidissement corporel généralisé extrêmement rapide. Nous avons notamment établi la preuve de concept de son bénéfice cardio- et neuroprotecteur au décours d'un arrêt cardiaque expérimental. Le bénéfice conféré était très supérieur à celui obtenu avec un refroidissement conventionnel par perfusion intraveineuse d'un grand volume de solutés refroidis et application de couvertures froides. Des études expérimentales sont à présent nécessaires pour étudier la validité de nouveaux dispositifs de ventilation liquide chez le gros animal et pour déterminer le PFC le mieux toléré pour une administration pulmonaire. La compréhension des mécanismes protecteurs mis en jeu lors de l'hypothermie thérapeutique permettrait par ailleurs de déterminer plus précisément les fenêtres de protection et de pouvoir mimer ou renforcer pharmacologiquement les effets de l'hypothermie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cour M, Loufouat J, Paillard M, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition to prevent the post-cardiac arrest syndrome: a pre-clinical study. *Eur Heart J.* 2011;32:226-235.

2. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Resuscitation.* 2008;79:350-379.

3. Kern KB. Optimal treatment of patients surviving out-of-hospital cardiac arrest. *JACC Cardiovasc Interv.* 2012;5:597-605.

4. Peberdy MA, Callaway CW, Neumar RW, et al. Part 9: post-cardiac arrest care: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation.* 2010;122:S768-786.

5. Deakin CD, Nolan JP, Soar J, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation.* 2010;81:1305-1352.

6. Nozari A, Safar P, Stezoski SW, et al. Critical time window for intra-arrest cooling with cold saline flush in a dog model of cardiopulmonary resuscitation. *Circulation.* 2006;113:2690-2696.

7. Tissier R, Couvreur N, Ghaleb B, et al. Rapid cooling preserves the ischaemic myocardium against mitochondrial damage and left ventricular dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2009;83:345-353.

8. Teodorescu C, Reinier K, Dervan C, et al. Factors associated with pulseless electric activity versus ventricular fibrillation: the Oregon sudden unexpected death study. *Circulation.* 2010;122:2116-2122.

9. Rea TD, Eisenberg MS, Sinibaldi G, et al. Incidence of EMS-treated out-of-hospital cardiac arrest in the United States. *Resuscitation.* 2004;63:17-24.

10. Atwood C, Eisenberg MS, Herlitz J, et al. Incidence of EMS-treated out-of-hospital cardiac arrest in Europe. *Resuscitation.* 2005;67:75-80.

11. Fichet J, Dumas F, Charbonneau H, et al. [What is the outcome of cardiac arrest survivors?]. *Presse Med.* 2010;39:694-700.

12. Pell JP, Sirel JM, Marsden AK, et al. Presentation, management, and outcome of out of hospital cardiopulmonary arrest: comparison by underlying aetiology. *Heart.* 2003;89:839-842.

13. Zheng ZJ, Croft JB, Giles WH, et al. Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998. *Circulation.* 2001;104:2158-2163.

14. Jabre P, Belpomme V, Azoulay E, et al. Family presence during cardiopulmonary resuscitation. *N Engl J Med.* 2013;368:1008-1018.

15. Cummins RO, Ornato JP, Thies WH, et al. Improving survival from sudden cardiac arrest: the "chain of survival" concept. A statement for health professionals from the

Advanced Cardiac Life Support Subcommittee and the Emergency Cardiac Care Committee, American Heart Association. *Circulation.* 1991;83:1832-1847.

16. Field JM, Hazinski MF, Sayre MR, et al. Part 1: executive summary: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation.* 2010;122:S640-656.

17. Nolan JP, Soar J, Zideman DA, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 1. Executive summary. *Resuscitation.* 2010;81:1219-1276.

18. Negovsky VA. The second step in resuscitation--the treatment of the 'post-resuscitation disease'. *Resuscitation.* 1972;1:1-7.

19. Chang WT, Ma MH, Chien KL, et al. Postresuscitation myocardial dysfunction: correlated factors and prognostic implications. *Intensive Care Med.* 2007;33:88-95.

20. Laver S, Farrow C, Turner D, et al. Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest. *Intensive Care Med.* 2004;30:2126-2128.

21. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C, Jr., et al. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation.* 1990;82:II2-12.

22. Crumrine RC, LaManna JC. Regional cerebral metabolites, blood flow, plasma volume, and mean transit time in total cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991;11:272-282.

23. Reimer KA, Jennings RB, Hill ML. Total ischemia in dog hearts, in vitro 2. High energy phosphate depletion and associated defects in energy metabolism, cell volume regulation, and sarcolemmal integrity. *Circ Res.* 1981;49:901-911.

24. Eigel BN, Hadley RW. Contribution of the Na(+) channel and Na(+)/H(+) exchanger to the anoxic rise of [Na(+)] in ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1999;277:H1817-1822.

25. Stromer H, de Groot MC, Horn M, et al. Na(+)/H(+) exchange inhibition with HOE642 improves postischemic recovery due to attenuation of Ca(2+) overload and prolonged acidosis on reperfusion. *Circulation.* 2000;101:2749-2755.

26. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22:391-397.

27. Huet O, Dupic L, Batteux F, et al. Postresuscitation syndrome: potential role of hydroxyl radical-induced endothelial cell damage. *Crit Care Med.* 2011;39:1712-1720.

28. Kaminski K, Bonda T, Wojtkowska I, et al. Oxidative stress and antioxidative defense parameters early after reperfusion therapy for acute myocardial infarction. *Acute Card Care.* 2008;10:121-126.

29. Brenner C, Moulin M. Physiological roles of the permeability transition pore. *Circ Res.* 2012;111:1237-1247.

30. Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, et al. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res.* 2012;111:1198-1207.

31. Tissier R, Chenoune M, Ghaleb B, et al. The small chill: mild hypothermia for cardioprotection? *Cardiovasc Res.* 2010;88:406-414.

32. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke.* 2009;40:e331-339.

33. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 2013;368:651-662.

34. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44:654-661.

35. Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1147:233-241.

36. Ayoub IM, Kolarova J, Yi Z, et al. Sodium-hydrogen exchange inhibition during ventricular fibrillation: Beneficial effects on ischemic contracture, action potential duration, reperfusion arrhythmias, myocardial function, and resuscitability. *Circulation.* 2003;107:1804-1809.

37. Taylor TG, Venable PW, Shibayama J, et al. Role of KATP channel in electrical depression and asystole during long-duration ventricular fibrillation in ex vivo canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302:H2396-2409.

38. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, et al. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest.* 1975;56:978-985.

39. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* 1982;66:1146-1149.

40. Ruiz-Bailen M, Aguayo de Hoyos E, Ruiz-Navarro S, et al. Reversible myocardial dysfunction after cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation.* 2005;66:175-181.

41. Gazmuri RJ, Weil MH, Bisera J, et al. Myocardial dysfunction after successful resuscitation from cardiac arrest. *Crit Care Med.* 1996;24:992-1000.

42. Laurent I, Monchi M, Chiche JD, et al. Reversible myocardial dysfunction in survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:2110-2116.

43. Kern KB, Hilwig RW, Rhee KH, et al. Myocardial dysfunction after resuscitation from cardiac arrest: an example of global myocardial stunning. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28:232-240.

44. Ames A, 3rd, Wright RL, Kowada M, et al. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol.* 1968;52:437-453.

45. Reffelmann T, Kloner RA. The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2006;101:359-372.

46. Ambrosio G, Weisman HF, Mannisi JA, et al. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation.* 1989;80:1846-1861.

47. Dumas F, White L, Stubbs BA, et al. Long-term prognosis following resuscitation from out of hospital cardiac arrest: role of percutaneous coronary intervention and therapeutic hypothermia. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60:21-27.

48. Galaup A, Gomez E, Souktani R, et al. Protection against myocardial infarction and no-reflow through preservation of vascular integrity by angiopoietin-like 4. *Circulation.* 2012;125:140-149.

49. Budd SL. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacol Ther.* 1998;80:203-229.

50. Wolfson SK, Jr., Safar P, Reich H, et al. Dynamic heterogeneity of cerebral hypoperfusion after prolonged cardiac arrest in dogs measured by the stable xenon/CT technique: a preliminary study. *Resuscitation.* 1992;23:1-20.

51. Lin HW, Defazio RA, Della-Morte D, et al. Derangements of post-ischemic cerebral blood flow by protein kinase C delta. *Neuroscience.* 2010;171:566-576.

52. Lemiale V, Huet O, Vigue B, et al. Changes in cerebral blood flow and oxygen extraction during post-resuscitation syndrome. *Resuscitation.* 2008;76:17-24.

53. Sundgreen C, Larsen FS, Herzog TM, et al. Autoregulation of cerebral blood flow in patients resuscitated from cardiac arrest. *Stroke.* 2001;32:128-132.

54. Adrie C, Laurent I, Monchi M, et al. Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome? *Curr Opin Crit Care.* 2004;10:208-212.

55. Vajdovich P. Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008;38:31-123, v.

56. Chalkias A, Xanthos T. Pathophysiology and pathogenesis of post-resuscitation myocardial stunning. *Heart Fail Rev.* 2012;17:117-128.

57. Niemann JT, Rosborough JP, Youngquist S, et al. Cardiac function and the proinflammatory cytokine response after recovery from cardiac arrest in swine. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29:749-758.

58. Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I, et al. Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome. *Circulation.* 2002;106:562-568.

59. Samborska-Sablik A, Sablik Z, Gaszynski W. The role of the immuno-inflammatory response in patients after cardiac arrest. *Arch Med Sci.* 2011;7:619-626.

60. Grimaldi D, Guivarch E, Neveux N, et al. Markers of intestinal injury are associated with endotoxemia in successfully resuscitated patients. *Resuscitation.* 2013;84:60-65.

61. Cerchiari EL, Safar P, Klein E, et al. Visceral, hematologic and bacteriologic changes and neurologic outcome after cardiac arrest in dogs. The visceral post-resuscitation syndrome. *Resuscitation.* 1993;25:119-136.

62. Adrie C, Monchi M, Laurent I, et al. Coagulopathy after successful cardiopulmonary resuscitation following cardiac arrest: implication of the protein C anticoagulant pathway. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:21-28.

63. Bottiger BW, Motsch J, Bohrer H, et al. Activation of blood coagulation after cardiac arrest is not balanced adequately by activation of endogenous fibrinolysis. *Circulation.* 1995;92:2572-2578.

64. Hekimian G, Baugnon T, Thuong M, et al. Cortisol levels and adrenal reserve after successful cardiac arrest resuscitation. *Shock.* 2004;22:116-119.

65. Sunde K, Pytte M, Jacobsen D, et al. Implementation of a standardised treatment protocol for post resuscitation care after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation.* 2007;73:29-39.

66. Cokkinos P. Post-resuscitation care: current therapeutic concepts. *Acute Card Care.* 2009;11:131-137.

67. Megarbane B, Leprince P, Deye N, et al. Emergency feasibility in medical intensive care unit of extracorporeal life support for refractory cardiac arrest. *Intensive Care Med.* 2007;33:758-764.

68. Reynolds JC, Lawner BJ. Management of the post-cardiac arrest syndrome. *J Emerg Med.* 2012;42:440-449.

69. Spaulding CM, Joly LM, Rosenberg A, et al. Immediate coronary angiography in survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *N Engl J Med.* 1997;336:1629-1633.

70. Dumas F, Cariou A, Manzo-Silberman S, et al. Immediate percutaneous coronary intervention is associated with better survival after out-of-hospital cardiac arrest: insights from the PROCAT (Parisian Region Out of hospital Cardiac ArresT) registry. *Circ Cardiovasc Interv.* 2010;3:200-207.

71. Bottiger BW, Arntz HR, Chamberlain DA, et al. Thrombolysis during resuscitation for out-of-hospital cardiac arrest. *N Engl J Med.* 2008;359:2651-2662.

72. Tissier R, Ghaleb B, Cohen MV, et al. Myocardial protection with mild hypothermia. *Cardiovasc Res.* 2012;94:217-225.

73. Knafelj R, Radsel P, Ploj T, et al. Primary percutaneous coronary intervention and mild induced hypothermia in comatose survivors of ventricular fibrillation with ST-elevation acute myocardial infarction. *Resuscitation.* 2007;74:227-234.

74. Varvarousi G, Goulas S, Agrogiannis G, et al. Epinephrine, vasopressin, and nitroglycerin improve neurologic outcome in porcine asphyxial cardiac arrest. *Am J Emerg Med.* 2012;30:1549-1554.

75. Chang ZY, Yeh MK, Chiang CH, et al. Erythropoietin protects adult retinal ganglion cells against NMDA-, trophic factor withdrawal-, and TNF-alpha-induced damage. *PLoS One.* 2013;8:e55291.

76. Zhi-Kun S, Hong-Qi Y, Zhi-Quan W, et al. Erythropoietin prevents PC12 cells from beta-amyloid-induced apoptosis via PI3KAkt pathway. *Transl Neurodegener.* 2012;1:7.

77. Jiang HL, Zhu YC, Chen XH, et al. [The myocardium protective effects of erythropoietin (EPO) in a rat model of asphyxia-induced cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation (CPR)]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2011;23:608-612.

78. Kitamura T, Iwami T, Nichol G, et al. Reduction in incidence and fatality of out-of-hospital cardiac arrest in females of the reproductive age. *Eur Heart J.* 2010;31:1365-1372.

79. Cao J, Zhu T, Lu L, et al. Estrogen induces cardioprotection in male C57BL/6J mice after acute myocardial infarction via decreased activity of matrix metalloproteinase-9 and increased Akt-Bcl-2 anti-apoptotic signaling. *Int J Mol Med.* 2011;28:231-237.

80. Hutchens MP, Fujiyoshi T, Komers R, et al. Estrogen protects renal endothelial barrier function from ischemia-reperfusion in vitro and in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303:F377-385.

81. Canal Castro C, Pagnussat AS, Orlandi L, et al. Coumestrol has neuroprotective effects before and after global cerebral ischemia in female rats. *Brain Res.* 2012;1474:82-90.

82. Semenas E, Sharma HS, Nozari A, et al. Neuroprotective effects of 17beta-estradiol after hypovolemic cardiac arrest in immature piglets: the role of nitric oxide and peroxidation. *Shock.* 2011;36:30-37.

83. Zhao CM, Yang XJ, Yang JH, et al. Effect of ischaemic postconditioning on recovery of left ventricular contractile function after acute myocardial infarction. *J Int Med Res.* 2012;40:1082-1088.

84. Yannopoulos D, Segal N, Matsuura T, et al. Ischemic post-conditioning and vasodilator therapy during standard cardiopulmonary resuscitation to reduce cardiac and brain injury after prolonged untreated ventricular fibrillation. *Resuscitation.* 2013.

85. Ivanes F, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning in acute myocardial infarction patients. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:811-820.

86. Huang CH, Tsai MS, Hsu CY, et al. Post-cardiac arrest myocardial dysfunction is improved with cyclosporine treatment at onset of resuscitation but not in the reperfusion phase. *Resuscitation.* 2011;82 Suppl 2:S41-47.

87. Centers for Disease Control and Prevention. Hypothermia-related deaths--United States, 2003-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2005;54:173-175.

88. Pool JL, Kessler LA. Mechanism and control of centrally induced cardiac irregularities during hypothermia. I. Clinical observations. *J Neurosurg.* 1958;15:52-64.

89. Bernard SA, Buist M. Induced hypothermia in critical care medicine: a review. *Crit Care Med.* 2003;31:2041-2051.

90. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med.* 2009;37:S186-202.

91. Torlinska T, Perz M, Madry E, et al. Effect of hypothermia on insulin-receptor interaction in different rat tissues. *Physiol Res.* 2002;51:261-266.

92. Bernard S. Hypothermia after cardiac arrest: expanding the therapeutic scope. *Crit Care Med.* 2009;37:S227-233.

93. Varon J, Acosta P. Therapeutic hypothermia: past, present, and future. *Chest.* 2008;133:1267-1274.

94. Kochanek PM, Drabek T, Tisherman SA. Therapeutic hypothermia: the Safar vision. *J Neurotrauma.* 2009;26:417-420.

95. Bigelow WG, McBirnie JE. Further experiences with hypothermia for intracardiac surgery in monkeys and groundhogs. *Ann Surg.* 1953;137:361-365.

96. Benson DW, Williams GR, Jr., Spencer FC, et al. The use of hypothermia after cardiac arrest. *Anesth Analg.* 1959;38:423-428.

97. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med.* 2002;346:557-563.

98. Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med.* 2002;346:549-556.

99. Marion DW, Penrod LE, Kelsey SF, et al. Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. *N Engl J Med.* 1997;336:540-546.

100. Sahuquillo J, Perez-Barcena J, Biestro A, et al. Intravascular cooling for rapid induction of moderate hypothermia in severely head-injured patients: results of a multicenter study (IntraCool). *Intensive Care Med.* 2009;35:890-898.

101. Clifton GL, Miller ER, Choi SC, et al. Lack of effect of induction of hypothermia after acute brain injury. *N Engl J Med.* 2001;344:556-563.

102. Harris OA, Colford JM, Jr., Good MC, et al. The role of hypothermia in the management of severe brain injury: a meta-analysis. *Arch Neurol.* 2002;59:1077-1083.

103. Georgiou AP, Manara AR. Role of therapeutic hypothermia in improving outcome after traumatic brain injury: a systematic review. *Br J Anaesth.* 2013.

104. McIntyre LA, Fergusson DA, Hebert PC, et al. Prolonged therapeutic hypothermia after traumatic brain injury in adults: a systematic review. *Jama.* 2003;289:2992-2999.

105. Polderman KH, Tjong Tjin Joe R, Peerdeman SM, et al. Effects of therapeutic hypothermia on intracranial pressure and outcome in patients with severe head injury. *Intensive Care Med.* 2002;28:1563-1573.

106. Colbourne F, Corbett D. Delayed and prolonged post-ischemic hypothermia is neuroprotective in the gerbil. *Brain Res.* 1994;654:265-272.

107. Colbourne F, Corbett D. Delayed postischemic hypothermia: a six month survival study using behavioral and histological assessments of neuroprotection. *J Neurosci.* 1995;15:7250-7260.

108. Jiang JY, Xu W, Yang PF, et al. Marked protection by selective cerebral profound hypothermia after complete cerebral ischemia in primates. *J Neurotrauma.* 2006;23:1847-1856.

109. van der Worp HB, Sena ES, Donnan GA, et al. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Brain.* 2007;130:3063-3074.

110. Kammersgaard LP, Rasmussen BH, Jorgensen HS, et al. Feasibility and safety of inducing modest hypothermia in awake patients with acute stroke through surface cooling: A case-control study: the Copenhagen Stroke Study. *Stroke.* 2000;31:2251-2256.

111. Milhaud D, Thouvenot E, Heroum C, et al. Prolonged moderate hypothermia in massive hemispheric infarction: clinical experience. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2005;17:49-53.

112. Polderman KH, van Zanten AR, Nipshagen MD, et al. Induced hypothermia in traumatic brain injury: effective if properly employed. *Crit Care Med.* 2004;32:313-314.

113. Hale SL, Kloner RA. Mild hypothermia as a cardioprotective approach for acute myocardial infarction: laboratory to clinical application. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011;16:131-139.

114. Miki T, Liu GS, Cohen MV, et al. Mild hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart: a practical intervention for acute myocardial infarction? *Basic Res Cardiol.* 1998;93:372-383.

115. Schwartz DS, Bremner RM, Baker CJ, et al. Regional topical hypothermia of the beating heart: preservation of function and tissue. *Ann Thorac Surg.* 2001;72:804-809.

116. Gotberg M, Olivecrona GK, Engblom H, et al. Rapid short-duration hypothermia with cold saline and endovascular cooling before reperfusion reduces microvascular obstruction and myocardial infarct size. *BMC Cardiovasc Disord.* 2008;8:7.

117. van den Doel MA, Gho BC, Duval SY, et al. Hypothermia extends the cardioprotection by ischaemic preconditioning to coronary artery occlusions of longer duration. *Cardiovasc Res.* 1998;37:76-81.

118. Hamamoto H, Leshnower BG, Parish LM, et al. Regional heterogeneity of myocardial reperfusion injury: effect of mild hypothermia. *Ann Thorac Surg.* 2009;87:164-171.

119. Hale SL, Dave RH, Kloner RA. Regional hypothermia reduces myocardial necrosis even when instituted after the onset of ischemia. *Basic Res Cardiol.* 1997;92:351-357.

120. Hale SL, Kloner RA. Myocardial temperature reduction attenuates necrosis after prolonged ischemia in rabbits. *Cardiovasc Res.* 1998;40:502-507.

121. Dave RH, Hale SL, Kloner RA. Hypothermic, closed circuit pericardioperfusion: a potential cardioprotective technique in acute regional ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:1667-1671.

122. Hale SL, Dae MW, Kloner RA. Hypothermia during reperfusion limits 'no-reflow' injury in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2003;59:715-722.

123. Dae MW, Gao DW, Sessler DI, et al. Effect of endovascular cooling on myocardial temperature, infarct size, and cardiac output in human-sized pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H1584-1591.

124. Maeng M, Mortensen UM, Kristensen J, et al. Hypothermia during reperfusion does not reduce myocardial infarct size in pigs. *Basic Res Cardiol.* 2006;101:61-68.

125. Otake H, Shite J, Paredes OL, et al. Catheter-based transcoronary myocardial hypothermia attenuates arrhythmia and myocardial necrosis in pigs with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:250-260.

126. Chenoune M, Lidouren F, Ghaleh B, et al. Rapid cooling of the heart with total liquid ventilation prevents transmural myocardial infarction following prolonged ischemia in rabbits. *Resuscitation.* 2010;81:359-362.

127. Kanemoto S, Matsubara M, Noma M, et al. Mild hypothermia to limit myocardial ischemia-reperfusion injury: importance of timing. *Ann Thorac Surg.* 2009;87:157-163.

128. Gotberg M, van der Pals J, Gotberg M, et al. Optimal timing of hypothermia in relation to myocardial reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2011;106:697-708.

129. Kandzari DE, Chu A, Brodie BR, et al. Feasibility of endovascular cooling as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention (results of the LOWTEMP pilot study). *Am J Cardiol.* 2004;93:636-639.

130. Dixon SR, Whitbourn RJ, Dae MW, et al. Induction of mild systemic hypothermia with endovascular cooling during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:1928-1934.

131. O'Neill WW on behalf of the COOL-MI Investigators. A prospective randomized trial of mild systemic hypothermia during PCI treatment of ST elevation myocardial infarction. Presented at the 15th annual Transcatheter Cardiovascular Therapeutics, Washington, September 2003. O'Neill WW, Dixon SR. The year in interventional cardiology. J Am Coll Cardiol 2004;43:875-890., 2003.

132. Grines CL on behalf of the ICE-IT Investigators. Intravascular cooling adjunctive to percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. Presented at the 16th annual Transcatheter Cardiovascular Therapeutics, Washnington DC, September 2004. O'Neill WW, Dixon SR, Grines CL: The year in interventional cardiology. J Am Coll Cardiol 2005;45:1117-1134., 2004.

133. Olivecrona GK, Gotberg M, Harnek J, et al. Mild hypothermia reduces cardiac post-ischemic reactive hyperemia. *BMC Cardiovasc Disord.* 2007;7:5.

134. Gotberg M, Olivecrona GK, Koul S, et al. A pilot study of rapid cooling by cold saline and endovascular cooling before reperfusion in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv.* 2010;3:400-407.

135. Zhao D, Abella BS, Beiser DG, et al. Intra-arrest cooling with delayed reperfusion yields higher survival than earlier normothermic resuscitation in a mouse model of cardiac arrest. *Resuscitation.* 2008;77:242-249.

136. Jia X, Koenig MA, Shin HC, et al. Improving neurological outcomes post-cardiac arrest in a rat model: immediate hypothermia and quantitative EEG monitoring. *Resuscitation.* 2008;76:431-442.

137. Janata A, Weihs W, Bayegan K, et al. Therapeutic hypothermia with a novel surface cooling device improves neurologic outcome after prolonged cardiac arrest in swine. *Crit Care Med.* 2008;36:895-902.

138. Tanimoto H, Ichinose K, Okamoto T, et al. Rapidly induced hypothermia with extracorporeal lung and heart assist (ECLHA) improves the neurological outcome after prolonged cardiac arrest in dogs. *Resuscitation.* 2007;72:128-136.

139. Bernard SA, Jones BM, Horne MK. Clinical trial of induced hypothermia in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *Ann Emerg Med.* 1997;30:146-153.

140. Zeiner A, Holzer M, Sterz F, et al. Mild resuscitative hypothermia to improve neurological outcome after cardiac arrest. A clinical feasibility trial. Hypothermia After Cardiac Arrest (HACA) Study Group. *Stroke.* 2000;31:86-94.

141. Felberg RA, Krieger DW, Chuang R, et al. Hypothermia after cardiac arrest: feasibility and safety of an external cooling protocol. *Circulation.* 2001;104:1799-1804.

142. Abella BS, Zhao D, Alvarado J, et al. Intra-arrest cooling improves outcomes in a murine cardiac arrest model. *Circulation.* 2004;109:2786-2791.

143. Hachimi-Idrissi S, Corne L, Huyghens L. The effect of mild hypothermia and induced hypertension on long term survival rate and neurological outcome after asphyxial cardiac arrest in rats. *Resuscitation.* 2001;49:73-82.

144. Che D, Li L, Kopil CM, et al. Impact of therapeutic hypothermia onset and duration on survival, neurologic function, and neurodegeneration after cardiac arrest. *Crit Care Med.* 2011;39:1423-1430.

145. Kim YM, Yim HW, Jeong SH, et al. Does therapeutic hypothermia benefit adult cardiac arrest patients presenting with non-shockable initial rhythms?: A systematic review and meta-analysis of randomized and non-randomized studies. *Resuscitation.* 2012;83:188-196.

146. Dumas F, Grimaldi D, Zuber B, et al. Is hypothermia after cardiac arrest effective in both shockable and nonshockable patients?: insights from a large registry. *Circulation.* 2011;123:877-886.

147. Lundbye JB, Rai M, Ramu B, et al. Therapeutic hypothermia is associated with improved neurologic outcome and survival in cardiac arrest survivors of non-shockable rhythms. *Resuscitation.* 2012;83:202-207.

148. Testori C, Sterz F, Behringer W, et al. Mild therapeutic hypothermia is associated with favourable outcome in patients after cardiac arrest with non-shockable rhythms. *Resuscitation.* 2011;82:1162-1167.

149. Leary M, Grossestreuer AV, Iannacone S, et al. Pyrexia and neurologic outcomes after therapeutic hypothermia for cardiac arrest. *Resuscitation.* 2013.

150. Lopez-de-Sa E, Rey JR, Armada E, et al. Hypothermia in comatose survivors from out-of-hospital cardiac arrest: pilot trial comparing 2 levels of target temperature. *Circulation.* 2012;126:2826-2833.

151. Nielsen N, Wetterslev J, al-Subaie N, et al. Target Temperature Management after out-of-hospital cardiac arrest--a randomized, parallel-group, assessor-blinded clinical trial--rationale and design. *Am Heart J.* 2012;163:541-548.

152. Hsu CY, Huang CH, Chang WT, et al. Cardioprotective effect of therapeutic hypothermia for postresuscitation myocardial dysfunction. *Shock.* 2009;32:210-216.

153. Zia A, Kern KB. Management of postcardiac arrest myocardial dysfunction. *Curr Opin Crit Care.* 2011;17:241-246.

154. Wolfrum S, Pierau C, Radke PW, et al. Mild therapeutic hypothermia in patients after out-of-hospital cardiac arrest due to acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing immediate percutaneous coronary intervention. *Crit Care Med.* 2008;36:1780-1786.

155. Jeung KW, Min YI, Heo T. Rapidly induced selective cerebral hypothermia using a cold carotid arterial flush during cardiac arrest in a dog model. *Resuscitation.* 2008;77:235-241.

156. Kuboyama K, Safar P, Oku K, et al. Mild hypothermia after cardiac arrest in dogs does not affect postarrest cerebral oxygen uptake/delivery mismatching. *Resuscitation.* 1994;27:231-244.

157. Kuboyama K, Safar P, Radovsky A, et al. Delay in cooling negates the beneficial effect of mild resuscitative cerebral hypothermia after cardiac arrest in dogs: a prospective, randomized study. *Crit Care Med.* 1993;21:1348-1358.

158. Ye S, Weng Y, Sun S, et al. Comparison of the durations of mild therapeutic hypothermia on outcome after cardiopulmonary resuscitation in the rat. *Circulation.* 2012;125:123-129.

159. Boddicker KA, Zhang Y, Zimmerman MB, et al. Hypothermia improves defibrillation success and resuscitation outcomes from ventricular fibrillation. *Circulation.* 2005;111:3195-3201.

160. Yu T, Barbut D, Ristagno G, et al. Survival and neurological outcomes after nasopharyngeal cooling or peripheral vein cold saline infusion initiated during cardiopulmonary resuscitation in a porcine model of prolonged cardiac arrest. *Crit Care Med.* 2010;38:916-921.

161. Song SS, Lyden PD. Overview of therapeutic hypothermia. *Curr Treat Options Neurol.* 2012;14:541-548.

162. Bouwes A, Robillard LB, Binnekade JM, et al. The influence of rewarming after therapeutic hypothermia on outcome after cardiac arrest. *Resuscitation.* 2012;83:996-1000.

163. Rival T, Mayeur N, Minville V, et al. [Practical means of temperature control]. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2009;28:358-364.

164. Heard KJ, Peberdy MA, Sayre MR, et al. A randomized controlled trial comparing the Arctic Sun to standard cooling for induction of hypothermia after cardiac arrest. *Resuscitation.* 2010;81:9-14.

165. Hachimi-Idrissi S, Corne L, Ebinger G, et al. Mild hypothermia induced by a helmet device: a clinical feasibility study. *Resuscitation.* 2001;51:275-281.

166. Kim F, Olsufka M, Carlbom D, et al. Pilot study of rapid infusion of 2 L of 4 degrees C normal saline for induction of mild hypothermia in hospitalized, comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *Circulation.* 2005;112:715-719.

167. Bernard S, Buist M, Monteiro O, et al. Induced hypothermia using large volume, ice-cold intravenous fluid in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest: a preliminary report. *Resuscitation.* 2003;56:9-13.

168. Miclescu A, Sharma HS, Wiklund L. Crystalloid vs. hypertonic crystalloid-colloid solutions for induction of mild therapeutic hypothermia after experimental cardiac arrest. *Resuscitation.* 2013.

169. Wang S, Wang S, Li C. Infusion of 4 degrees C normal saline can improve the neurological outcome in a porcine model of cardiac arrest. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;72:1213-1219; discussion 1219.

170. Riter HG, Brooks LA, Pretorius AM, et al. Intra-arrest hypothermia: both cold liquid ventilation with perfluorocarbons and cold intravenous saline rapidly achieve hypothermia, but only cold liquid ventilation improves resumption of spontaneous circulation. *Resuscitation.* 2009;80:561-566.

171. Hammer L, Vitrat F, Savary D, et al. Immediate prehospital hypothermia protocol in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *Am J Emerg Med.* 2009;27:570-573.

172. Kliegel A, Janata A, Wandaller C, et al. Cold infusions alone are effective for induction of therapeutic hypothermia but do not keep patients cool after cardiac arrest. *Resuscitation.* 2007;73:46-53.

173. Kliegel A, Losert H, Sterz F, et al. Cold simple intravenous infusions preceding special endovascular cooling for faster induction of mild hypothermia after cardiac arrest--a feasibility study. *Resuscitation.* 2005;64:347-351.

174. Deasy C, Bernard S, Cameron P, et al. Design of the RINSE trial: the rapid infusion of cold normal saline by paramedics during CPR. *BMC Emerg Med.* 2011;11:17.

175. Haugk M, Krizanac D, Stratil P, et al. Comparison of surface cooling and invasive cooling for rapid induction of mild therapeutic hypothermia in pigs--effectiveness of two different devices. *Resuscitation.* 2010;81:1704-1708.

176. Safar PJ, Kochanek PM. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. *N Engl J Med.* 2002;346:612-613.

177. Nagao K, Kikushima K, Watanabe K, et al. Early induction of hypothermia during cardiac arrest improves neurological outcomes in patients with out-of-hospital cardiac arrest who undergo emergency cardiopulmonary bypass and percutaneous coronary intervention. *Circ J.* 2010;74:77-85.

178. Lebreton G, Pozzi M, Luyt CE, et al. Out-of-hospital extra-corporeal life support implantation during refractory cardiac arrest in a half-marathon runner. *Resuscitation.* 2011;82:1239-1242.

179. Boller M, Lampe JW, Katz JM, et al. Feasibility of intra-arrest hypothermia induction: A novel nasopharyngeal approach achieves preferential brain cooling. *Resuscitation.* 2010;81:1025-1030.

180. Li Y, Ristagno G, Guan J, et al. Preserved heart rate variability during therapeutic hypothermia correlated to 96 hrs neurological outcomes and survival in a pig model of cardiac arrest. *Crit Care Med.* 2012;40:580-586.

181. Springborg JB, Springborg KK, Romner B. First Clinical Experience with Intranasal Cooling for Hyperthermia in Brain-Injured Patients. *Neurocrit Care.* 2013.

182. Castren M, Nordberg P, Svensson L, et al. Intra-arrest transnasal evaporative cooling: a randomized, prehospital, multicenter study (PRINCE: Pre-ROSC IntraNasal Cooling Effectiveness). *Circulation.* 2010;122:729-736.

183. Tissier R, Chenoune M, Pons S, et al. Mild hypothermia reduces per-ischemic reactive oxygen species production and preserves mitochondrial respiratory complexes. *Resuscitation.* 2013.

184. Tissier R, Hamanaka K, Kuno A, et al. Total liquid ventilation provides ultra-fast cardioprotective cooling. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:601-605.

185. Wong KC. Physiology and pharmacology of hypothermia. *West J Med.* 1983;138:227-232.

186. Ehrlich MP, McCullough JN, Zhang N, et al. Effect of hypothermia on cerebral blood flow and metabolism in the pig. *Ann Thorac Surg.* 2002;73:191-197.

187. Simkhovich BZ, Hale SL, Kloner RA. Metabolic mechanism by which mild regional hypothermia preserves ischemic tissue. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2004;9:83-90.

188. Jones RN, Reimer KA, Hill ML, et al. Effect of hypothermia on changes in high-energy phosphate production and utilization in total ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1982;14 Suppl 3:123-130.

189. Ning XH, Xu CS, Song YC, et al. Temperature threshold and modulation of energy metabolism in the cardioplegic arrested rabbit heart. *Cryobiology.* 1998;36:2-11.

190. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, et al. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1987;7:729-738.

191. Globus MY, Busto R, Lin B, et al. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intraischemic brain temperature modulation. *J Neurochem.* 1995;65:1250-1256.

192. Kil HY, Zhang J, Piantadosi CA. Brain temperature alters hydroxyl radical production during cerebral ischemia/reperfusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:100-106.

193. Vaagenes P, Ginsberg M, Ebmeyer U, et al. Cerebral resuscitation from cardiac arrest: pathophysiologic mechanisms. *Crit Care Med.* 1996;24:S57-68.

194. Maier CM, Sun GH, Cheng D, et al. Effects of mild hypothermia on superoxide anion production, superoxide dismutase expression, and activity following transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* 2002;11:28-42.

195. Khaliulin I, Clarke SJ, Lin H, et al. Temperature preconditioning of isolated rat hearts--a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Physiol.* 2007;581:1147-1161.

196. Ji X, Luo Y, Ling F, et al. Mild hypothermia diminishes oxidative DNA damage and pro-death signaling events after cerebral ischemia: a mechanism for neuroprotection. *Front Biosci.* 2007;12:1737-1747.

197. Kristian T, Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke.* 1998;29:705-718.

198. Xu L, Yenari MA, Steinberg GK, et al. Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:21-28.

199. Ning XH, Chen SH, Xu CS, et al. Hypothermic protection of the ischemic heart via alterations in apoptotic pathways as assessed by gene array analysis. *J Appl Physiol.* 2002;92:2200-2207.

200. Meybohm P, Gruenewald M, Zacharowski KD, et al. Mild hypothermia alone or in combination with anesthetic post-conditioning reduces expression of inflammatory cytokines in the cerebral cortex of pigs after cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care.* 2010;14:R21.

201. Callaway CW, Rittenberger JC, Logue ES, et al. Hypothermia after cardiac arrest does not alter serum inflammatory markers. *Crit Care Med.* 2008;36:2607-2612.

202. Yanagawa Y, Kawakami M, Okada Y. Moderate hypothermia alters interleukin-6 and interleukin-1alpha reactions in ischemic brain in mice. *Resuscitation.* 2002;53:93-99.

203. Fries M, Stoppe C, Brucken D, et al. Influence of mild therapeutic hypothermia on the inflammatory response after successful resuscitation from cardiac arrest. *J Crit Care.* 2009;24:453-457.

204. Fairchild KD, Singh IS, Patel S, et al. Hypothermia prolongs activation of NF-kappaB and augments generation of inflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C422-431.

205. Fairchild KD, Singh IS, Carter HC, et al. Hypothermia enhances phosphorylation of I{kappa}B kinase and prolongs nuclear localization of NF-{kappa}B in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289:C1114-1121.

206. Arai T, Kaneko H, Ohnishi H, et al. Hypothermia augments NF-kappaB activity and the production of IL-12 and IFN-gamma. *Allergol Int.* 2008;57:331-338.

207. Kuboki S, Okaya T, Schuster R, et al. Hepatocyte NF-kappaB activation is hepatoprotective during ischemia-reperfusion injury and is augmented by ischemic hypothermia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292:G201-207.

208. Diestel A, Roessler J, Berger F, et al. Hypothermia downregulates inflammation but enhances IL-6 secretion by stimulated endothelial cells. *Cryobiology.* 2008;57:216-222.

209. Webster CM, Kelly S, Koike MA, et al. Inflammation and NFkappaB activation is decreased by hypothermia following global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* 2009;33:301-312.

210. Suehiro E, Fujisawa H, Akimura T, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 in blood in association with activation of interleukin-6 after traumatic brain injury: influence of hypothermic therapy. *J Neurotrauma.* 2004;21:1706-1711.

211. Kimura A, Sakurada S, Ohkuni H, et al. Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Crit Care Med.* 2002;30:1499-1502.

212. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, et al. Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;48:388-399.

213. Post H, Schmitto JD, Steendijk P, et al. Cardiac function during mild hypothermia in pigs: increased inotropy at the expense of diastolic dysfunction. *Acta Physiol (Oxf).* 2010;199:43-52.

214. Stowe DF, Fujita S, An J, et al. Modulation of myocardial function and [Ca2+] sensitivity by moderate hypothermia in guinea pig isolated hearts. *Am J Physiol.* 1999;277:H2321-2332.

215. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. Smaller infarct after preconditioning does not predict extent of early functional improvement of reperfused heart. *Am J Physiol.* 1999;277:H1754-1761.

216. Aouam K, Tissier R, Bruneval P, et al. Preconditioning of salvaged myocardium in conscious rabbits with postinfarction dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:H2763-2769.

217. Hamamoto H, Sakamoto H, Leshnower BG, et al. Very mild hypothermia during ischemia and reperfusion improves postinfarction ventricular remodeling. *Ann Thorac Surg.* 2009;87:172-177.

218. Shao ZH, Chang WT, Chan KC, et al. Hypothermia-induced cardioprotection using extended ischemia and early reperfusion cooling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H1995-2003.

219. Ning XH, Chen SH, Xu CS, et al. Hypothermia preserves myocardial function and mitochondrial protein gene expression during hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H212-219.

220. Ning XH, Chi EY, Buroker NE, et al. Moderate hypothermia (30 degrees C) maintains myocardial integrity and modifies response of cell survival proteins after reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H2119-2128.

221. Shao ZH, Sharp WW, Wojcik KR, et al. Therapeutic hypothermia cardioprotection via Akt- and nitric oxide-mediated attenuation of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298:H2164-2173.

222. Mochizuki T, Yu S, Katoh T, et al. Cardioprotective effect of therapeutic hypothermia at 34 degrees C against ischaemia/reperfusion injury mediated by PI3K and nitric oxide in a rat isolated heart model. *Resuscitation.* 2012;83:238-242.

223. Yang X, Liu Y, Yang XM, et al. Cardioprotection by mild hypothermia during ischemia involves preservation of ERK activity. *Basic Res Cardiol.* 2011;106:421-430.

224. Ning XH, Xu CS, Song YC, et al. Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia. *Am J Physiol.* 1998;274:H786-793.

225. Darbera L, Chenoune M, Lidouren F, et al. Adenosine and opioid receptors do not trigger the cardioprotective effect of mild hypothermia. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2012;17:173-180.

226. Kawamura S, Suzuki A, Hadeishi H, et al. Cerebral blood flow and oxygen metabolism during mild hypothermia in patients with subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien).* 2000;142:1117-1121; discussion 1121-1112.

227. Nolan JP, Morley PT, Hoek TL, et al. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. An advisory statement by the Advancement Life support Task Force of the International Liaison committee on Resuscitation. *Resuscitation.* 2003;57:231-235.

228. Sakoh M, Gjedde A. Neuroprotection in hypothermia linked to redistribution of oxygen in brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H17-25.

229. Rosomoff HL, Gilbert R. Brain volume and cerebrospinal fluid pressure during hypothermia. *Am J Physiol.* 1955;183:19-22.

230. Takata K, Takeda Y, Sato T, et al. Effects of hypothermia for a short period on histologic outcome and extracellular glutamate concentration during and after cardiac arrest in rats. *Crit Care Med.* 2005;33:1340-1345.

231. Nakashima K, Todd MM. Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemic depolarization. *Stroke.* 1996;27:913-918.

232. Baumann E, Preston E, Slinn J, et al. Post-ischemic hypothermia attenuates loss of the vascular basement membrane proteins, agrin and SPARC, and the blood-brain barrier disruption after global cerebral ischemia. *Brain Res.* 2009;1269:185-197.

233. Lotocki G, de Rivero Vaccari JP, Perez ER, et al. Alterations in blood-brain barrier permeability to large and small molecules and leukocyte accumulation after traumatic brain injury: effects of post-traumatic hypothermia. *J Neurotrauma.* 2009;26:1123-1134.

234. Lee JE, Yoon YJ, Moseley ME, et al. Reduction in levels of matrix metalloproteinases and increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in response to mild hypothermia therapy in experimental stroke. *J Neurosurg.* 2005;103:289-297.

235. Nagel S, Su Y, Horstmann S, et al. Minocycline and hypothermia for reperfusion injury after focal cerebral ischemia in the rat: effects on BBB breakdown and MMP expression in the acute and subacute phase. *Brain Res.* 2008;1188:198-206.

236. Dai DW, Wang DS, Li KS, et al. [Effect of local mild hypothermia on expression of aquaporin-4 following intracerebral hemorrhage in rats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2006;86:906-910.

237. Lee SM, Zhao H, Maier CM, et al. The protective effect of early hypothermia on PTEN phosphorylation correlates with free radical inhibition in rat stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29:1589-1600.

238. Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. *Mol Neurobiol.* 2006;34:249-270.

239. Atkins CM, Oliva AA, Jr., Alonso OF, et al. Hypothermia treatment potentiates ERK1/2 activation after traumatic brain injury. *Eur J Neurosci.* 2007;26:810-819.

240. Choi JS, Park J, Suk K, et al. Mild Hypothermia Attenuates Intercellular Adhesion Molecule-1 Induction via Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase-1/2 in a Focal Cerebral Ischemia Model. *Stroke Res Treat.* 2011;2011:846716.

241. Schmitt KR, Diestel A, Lehnardt S, et al. Hypothermia suppresses inflammation via ERK signaling pathway in stimulated microglial cells. *J Neuroimmunol.* 2007;189:7-16.

242. Sawe N, Steinberg G, Zhao H. Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke. *J Neurosci Res.* 2008;86:1659-1669.

243. Yang D, Guo S, Zhang T, et al. Hypothermia attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial cell apoptosis via alterations in apoptotic pathways and JNK signaling. *FEBS Lett.* 2009;583:2500-2506.

244. Diestel A, Roessler J, Pohl-Schickinger A, et al. Specific p38 inhibition in stimulated endothelial cells: a possible new anti-inflammatory strategy after hypothermia and rewarming. *Vascul Pharmacol.* 2009;51:246-252.

245. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, et al. Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* 1967;2:319-323.

246. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2000;342:1334-1349.

247. Kaisers U, Kelly KP, Busch T. Liquid ventilation. *Br J Anaesth.* 2003;91:143-151.

248. Kylstra JA, Tissing MO, van der M. Of mice as fish. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 1962;8:378-383.

249. Clark LC, Jr., Gollan F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science.* 1966;152:1755-1756.

250. Lynch JE, Cheek JM, Chan EY, et al. Adjuncts to mechanical ventilation in ARDS. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;18:20-27.

251. Fuhrman BP, Paczan PR, DeFrancisis M. Perfluorocarbon-associated gas exchange. *Crit Care Med.* 1991;19:712-722.

252. Koen PA, Wolfson MR, Shaffer TH. Fluorocarbon ventilation: maximal expiratory flows and CO2 elimination. *Pediatr Res.* 1988;24:291-296.

253. Weis CM, Wolfson MR, Shaffer TH. Liquid-assisted ventilation: physiology and clinical application. *Ann Med.* 1997;29:509-517.

254. Robert R, Micheau P, Cyr S, et al. A prototype of volume-controlled tidal liquid ventilator using independent piston pumps. *Asaio J.* 2006;52:638-645.

255. Tredici S, Komori E, Funakubo A, et al. A prototype of a liquid ventilator using a novel hollow-fiber oxygenator in a rabbit model. *Crit Care Med.* 2004;32:2104-2109.

256. Clark LC, Jr. Introduction to fluorocarbons. *Int Anesthesiol Clin.* 1985;23:1-9.

257. Kylstra JA, Schoenfisch WH. Alveolar surface tension in fluorocarbon-filled lungs. *J Appl Physiol.* 1972;33:32-35.

258. Ricard JD, Dreyfuss D, Laissy JP, et al. Dose-response effect of perfluorocarbon administration on lung microvascular permeability in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:1378-1382.

259. Valls i Soler A, Wauer RR. 2nd European symposium on liquid ventilation. *Eur J Med Res.* 2001;6:115-138.

260. Lowe KC. Perfluorinated blood substitutes and artificial oxygen carriers. *Blood Rev.* 1999;13:171-184.

261. Costantino ML, Micheau P, Shaffer TH, et al. Clinical design functions: round table discussions on the bioengineering of liquid ventilators. *Asaio J.* 2009;55:206-208.

262. Sekins KM, Nugent L, Mazzoni M, et al. Recent innovations in total liquid ventilation system and component design. *Biomed Instrum Technol.* 1999;33:277-284.

263. Larrabe JL, Alvarez FJ, Cuesta EG, et al. Development of a time-cycled volume-controlled pressure-limited respirator and lung mechanics system for total liquid ventilation. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2001;48:1134-1144.

264. Morris KP, Cox PN, Mazer CD, et al. Distribution of pulmonary blood flow in the perfluorocarbon-filled lung. *Intensive Care Med.* 2000;26:756-763.

265. Haeberle HA, Nesti F, Dieterich HJ, et al. Perflubron reduces lung inflammation in respiratory syncytial virus infection by inhibiting chemokine expression and nuclear factor-kappa B activation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1433-1438.

266. Merz U, Klosterhalfen B, Hausler M, et al. Partial liquid ventilation reduces release of leukotriene B4 and interleukin-6 in bronchoalveolar lavage in surfactant-depleted newborn pigs. *Pediatr Res.* 2002;51:183-189.

267. Kylstra JA, Rausch DC, Hall KD, et al. Volume-controlled lung lavage in the treatment of asthma, bronchiectasis, and mucoviscidosis. *Am Rev Respir Dis.* 1971;103:651-665.

268. Steinhorn DM, Leach CL, Fuhrman BP, et al. Partial liquid ventilation enhances surfactant phospholipid production. *Crit Care Med.* 1996;24:1252-1256.

269. Al-Rahmani A, Awad K, Miller TF, et al. Effects of partial liquid ventilation with perfluorodecalin in the juvenile rabbit lung after saline injury. *Crit Care Med.* 2000;28:1459-1464.

270. Hirschl RB, Tooley R, Parent A, et al. Evaluation of gas exchange, pulmonary compliance, and lung injury during total and partial liquid ventilation in the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1996;24:1001-1008.

271. Leach CL, Greenspan JS, Rubenstein SD, et al. Partial liquid ventilation with perflubron in premature infants with severe respiratory distress syndrome. The LiquiVent Study Group. *N Engl J Med.* 1996;335:761-767.

272. Gauger PG, Pranikoff T, Schreiner RJ, et al. Initial experience with partial liquid ventilation in pediatric patients with the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1996;24:16-22.

273. Pranikoff T, Gauger PG, Hirschl RB. Partial liquid ventilation in newborn patients with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1996;31:613-618.

274. Hirschl RB, Pranikoff T, Gauger P, et al. Liquid ventilation in adults, children, and full-term neonates. *Lancet.* 1995;346:1201-1202.

275. Greenspan JS, Fox WW, Rubenstein SD, et al. Partial liquid ventilation in critically ill infants receiving extracorporeal life support. Philadelphia Liquid Ventilation Consortium. *Pediatrics.* 1997;99:E2.

276. Avoine O, Bosse D, Beaudry B, et al. Total liquid ventilation efficacy in an ovine model of severe meconium aspiration syndrome. *Crit Care Med.* 2011;39:1097-1103.

277. Greenspan JS, Wolfson MR, Rubenstein SD, et al. Liquid ventilation of preterm baby. *Lancet.* 1989;2:1095.

278. Greenspan JS, Wolfson MR, Rubenstein SD, et al. Liquid ventilation of human preterm neonates. *J Pediatr.* 1990;117:106-111.

279. Overbeck MC, Pranikoff T, Hirschl RB. Partial liquid ventilation provides effective gas exchange in a large animal model. *J Crit Care.* 1996;11:37-42.

280. Overbeck MC, Pranikoff T, Yadao CM, et al. Efficacy of perfluorocarbon partial liquid ventilation in a large animal model of acute respiratory failure. *Crit Care Med.* 1996;24:1208-1214.

281. Hernan LJ, Fuhrman BP, Kaiser RE, et al. Perfluorocarbon-associated gas exchange in normal and acid-injured large sheep. *Crit Care Med.* 1996;24:475-481.

282. Papo MC, Paczan PR, Fuhrman BP, et al. Perfluorocarbon-associated gas exchange improves oxygenation, lung mechanics, and survival in a model of adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1996;24:466-474.

283. Reickert CA, Rich PB, Crotti S, et al. Partial liquid ventilation and positive end-expiratory pressure reduce ventilator-induced lung injury in an ovine model of acute respiratory failure. *Crit Care Med.* 2002;30:182-189.

284. Hirschl RB, Croce M, Gore D, et al. Prospective, randomized, controlled pilot study of partial liquid ventilation in adult acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:781-787.

285. Kacmarek RM, Wiedemann HP, Lavin PT, et al. Partial liquid ventilation in adult patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:882-889.

286. Wolfson MR, Shaffer TH. Pulmonary applications of perfluorochemical liquids: ventilation and beyond. *Paediatr Respir Rev.* 2005;6:117-127.

287. Wolfson MR, Hirschl RB, Jackson JC, et al. Multicenter comparative study of conventional mechanical gas ventilation to tidal liquid ventilation in oleic acid injured sheep. *Asaio J.* 2008;54:256-269.

288. Pohlmann JR, Brant DO, Daul MA, et al. Total liquid ventilation provides superior respiratory support to conventional mechanical ventilation in a large animal model of severe respiratory failure. *Asaio J.* 2011;57:1-8.

289. Yang SS, Jeng MJ, McShane R, et al. Cold perfluorochemical-induced hypothermia protects lung integrity in normal rabbits. *Biol Neonate.* 2005;87:60-65.

290. Shaffer TH, Forman DL, Wolfson MR. Physiological effects of ventilation with liquid fluorocarbon at controlled temperatures. *Undersea Biomed Res.* 1984;11:287-298.

291. Staffey KS, Dendi R, Brooks LA, et al. Liquid ventilation with perfluorocarbons facilitates resumption of spontaneous circulation in a swine cardiac arrest model. *Resuscitation.* 2008;78:77-84.

292. Houmes RJ, Verbrugge SJ, Hendrik ER, et al. Hemodynamic effects of partial liquid ventilation with perfluorocarbon in acute lung injury. *Intensive Care Med.* 1995;21:966-972.

293. Modell JH, Calderwood HW, Ruiz BC, et al. Liquid ventilation of primates. *Chest.* 1976;69:79-81.

294. Leonard RC. Liquid ventilation. *Anaesth Intensive Care.* 1998;26:11-21.

295. Baker AJ, Zornow MH, Grafe MR, et al. Hypothermia prevents ischemia-induced increases in hippocampal glycine concentrations in rabbits. *Stroke.* 1991;22:666-673.

296. Tamura Y, Monden M, Shintani M, et al. Neuroprotective effects of hibernation-regulating substances against low-temperature-induced cell death in cultured hamster hippocampal neurons. *Brain Res.* 2006;1108:107-116.

297. Dunwiddie TV, Diao L. Regulation of extracellular adenosine in rat hippocampal slices is temperature dependent: role of adenosine transporters. *Neuroscience.* 2000;95:81-88.

298. Downey JM, Krieg T, Cohen MV. Mapping preconditioning's signaling pathways: an engineering approach. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1123:187-196.

299. Lemiale V, Dumas F, Mongardon N, et al. Intensive care unit mortality after cardiac arrest: the relative contribution of shock and brain injury in a large cohort. *Intensive Care Med.* 2013;39:1972-1980.

300. Rana M, J WS, Saygili E, et al. Comparative evaluation of the usability of 2 different methods to perform mild hypothermia in patients with out-of-hospital cardiac arrest. *Int J Cardiol.* 2011;152:321-326.

301. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, et al. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:H971-976.

302. Yang XM, Proctor JB, Cui L, et al. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1103-1110.

303. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, et al. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation.* 2005;111:194-197.